

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 978 177**

(51) Int. Cl.:

A61K 51/00 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61K 41/00 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2010 PCT/US2010/058519**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11068845**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2010 E 10835036 (4)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 2506881**

(54) Título: **Combinación de radio inmunoterapia y conjugados anticuerpo-fármaco para mejorar la terapia contra el cáncer**

(30) Prioridad:

02.12.2009 US 629404
03.12.2009 US 266356 P
06.01.2010 US 292656 P
12.04.2010 US 322997 P
14.04.2010 US 323952 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GOVINDAN, SERENGULAM V. y
GOLDENBERG, DAVID M.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 978 177 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

Combinación de radio inmunoterapia y conjugados anticuerpo-fármaco para mejorar la terapia contra el cáncer

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico para uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en donde el tratamiento comprende administrar a un sujeto dicho anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico y un anticuerpo mucina anticáncer pancreático PAM4 o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido; un anticuerpo de mucina anticáncer de páncreas PAM4 o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido para uso en el tratamiento de cáncer de páncreas, en el que el tratamiento comprende administrar a un sujeto dicho anticuerpo de mucina anticáncer de páncreas PAM4 o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado a un radionúclido y un anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico; y una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, en la que la composición farmacéutica comprende un anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico y un anticuerpo de mucina anti-cáncer de páncreas PAM4 o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúcleido. La combinación del anticuerpo mucina contra el cáncer de páncreas PAM4 o su fragmento de unión a antígeno conjugado con un radionúclido (RAIT) y el anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humanizado o su fragmento de unión a antígeno conjugado con un agente citotóxico (ADC) exhibe un efecto sinérgico y es más eficaz para inducir la muerte de las células cancerosas que RAIT o ADC solos, o la suma de los efectos de RAIT y ADC administrados individualmente.

Técnica relacionada

30 [0002] El cáncer de páncreas es un crecimiento maligno del páncreas que se produce principalmente en las células de los conductos pancreáticos. Esta enfermedad es la novena forma más común de cáncer, sin embargo, es la cuarta y quinta causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. El cáncer de páncreas casi siempre es mortal, con una tasa de supervivencia a cinco años inferior al 3%.

35 [0003] Los síntomas más comunes del cáncer de páncreas incluyen ictericia, dolor abdominal y pérdida de peso, que, junto con otros factores de presentación, son de naturaleza inespecífica. Por lo tanto, diagnosticar el cáncer de páncreas en una etapa temprana del crecimiento del tumor suele ser difícil y requiere un estudio diagnóstico extenso, que a menudo incluye cirugía exploratoria. La ecografía endoscópica y la tomografía computarizada son los mejores medios no invasivos disponibles en la actualidad para el diagnóstico del cáncer de páncreas. Sin embargo, es difícil la detección fiable de tumores pequeños, así como la diferenciación del cáncer de páncreas de la pancreatitis focal.

40 Actualmente, la gran mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas se diagnostican en una etapa tardía, cuando el tumor ya se ha extendido fuera de la cápsula para invadir los órganos circundantes y/o ha hecho metástasis extensamente. Gold y col., Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39:147-54 (2001). La detección tardía de la enfermedad es común y el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas es poco común en el ámbito clínico.

45 [0004] Los procedimientos de tratamiento actuales disponibles para el cáncer de páncreas no han conducido a una cura, ni a un tiempo de supervivencia sustancialmente mejorado. La resección quirúrgica ha sido la única modalidad que ofrece posibilidades de supervivencia. Sin embargo, debido a la gran carga tumoral, sólo entre el 10% y el 25% de los pacientes son candidatos para una "resección curativa". Para aquellos pacientes que se someten a un tratamiento quirúrgico, la tasa de supervivencia a cinco años sigue siendo baja, con un promedio de sólo alrededor del 10%.

55 [0005] Los anticuerpos, en particular los anticuerpos monoclonales (MAbs) y los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos modificados genéticamente, se han probado ampliamente y han demostrado ser valiosos en la detección y el tratamiento de diversos trastornos humanos, incluidos cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, y enfermedades cardiovasculares [Filpula y McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9: 231-245]. La utilidad clínica de un anticuerpo o de un agente derivado de anticuerpo depende principalmente de su capacidad para unirse a un antígeno objetivo específico asociado con un trastorno particular. La selectividad es valiosa para administrar un agente terapéutico, como fármacos, toxinas, citocinas, hormonas, antagonistas hormonales, enzimas, inhibidores de enzimas, oligonucleótidos inhibidores (p. ej., ARNi, ARNip), inmunomoduladores, radionúclidos, agentes antiangiogénicos o agentes proapoptóticos, a un tumor objetivo. Los anticuerpos radiomarcados se han utilizado con cierto éxito en numerosas neoplasias malignas, incluido el cáncer de ovario, el cáncer de colon, el cáncer medular de tiroides y los linfomas.

60 [0006] Aunque se han aprobado diversos anticuerpos para uso terapéutico humano, incluyendo alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, ibritumomab, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab, existe una

necesidad en el campo de terapias basadas en anticuerpos más eficaces para pacientes difíciles de tratar cánceres, como el cáncer de páncreas.

5 [0007] Gold DV et al. (Int. J. Cancer: 109, 618-626 (2004)) informan sobre radio inmunoterapia combinada con anticuerpo PAM4 marcado con ⁹⁰itrio-DOTA y radio sensibilización con Gemcitabina para el tratamiento de un xenoinjerto de cáncer de páncreas humano.

10 [0008] El documento US 7.282.567 B2 está relacionado con anticuerpos monoespecíficos, monovalentes y multivalentes, y con anticuerpos multivalentes y multiespecíficos, incluido el anticuerpo PAM4 asociado a tumores.

15 [0009] Gold DV et al. (Clinical Cancer Research, 1 de septiembre de 2003, vol. 9, no. 10, Pt 2, pp. 3929S-37S) informe sobre radioinmunoterapia de dosis bajas (⁹⁰Y-PAM4) combinada con gemcitabina para el tratamiento del cáncer de páncreas experimental.

20 [0010] Gold DV et al. (Int. J. Cancer: 57, 204-210 (1994)) informan sobre la caracterización del anticuerpo monoclonal PAM4 reactivo con una mucina de cáncer de páncreas.

25 [0011] Gold DV et al. (Int. J. Cancer: 72, 477-485 (1997)) informan sobre la selección de radio inmunoconjungados para la terapia de carcinoma de colon micrometastásico o bien establecido.

30 [0012] Al-Ejeh F et al. (Plos ONE, febrero de 2009, vol. 4, no. 2, páginas e4630.1-e4630.13) informan que la quimioterapia tiene sinergia con la radio inmunoterapia dirigida al autoantígeno La en tumores.

35 [0013] Cardillo TM et al. (Clinical Cancer Research, vol. 7, no. 10, pp. 3186-3192, octubre de 2001) informan sobre la ventaja terapéutica del anticuerpo PAM4 marcado con ⁹⁰itrio frente a ¹³¹yodo en el cáncer de páncreas experimental.

40 [0014] Govindan SV et al. (Clinical Cancer Research, vol. 15, no. 10, pp. 6052-6061, octubre de 2009) informan sobre la terapia dirigida a CEACAM5 de xenoinjertos de cáncer de colon y páncreas humano con potentes inmunoconjungados de Labetuzumab-SN-38.

45 [0015] Moon S-J y col. (J. Med. Chem. 2008, 51, págs. 6916-6926) informan sobre conjugados de anticuerpos de 7-etyl-10-hidroxicamptotecina (SN-38) para quimioterapia dirigida contra el cáncer.

50 [0016] El documento US 2004/120949 A1 está relacionado con el uso combinado de anticuerpos conjugados con compuestos citotóxicos y radioterapia en la terapia del cáncer.

55 [0017] El documento US 2005/0025709 A1 está relacionado con péptidos de D-aminoácidos y su uso.

60 [0018] El documento US 4.867.962 A está relacionado con métodos para aumentar la cantidad relativa de agentes terapéuticos o de diagnóstico unidos a anticuerpos administrados a tejidos diana in vivo en comparación con la cantidad de dichos agentes administrados a tejidos no diana.

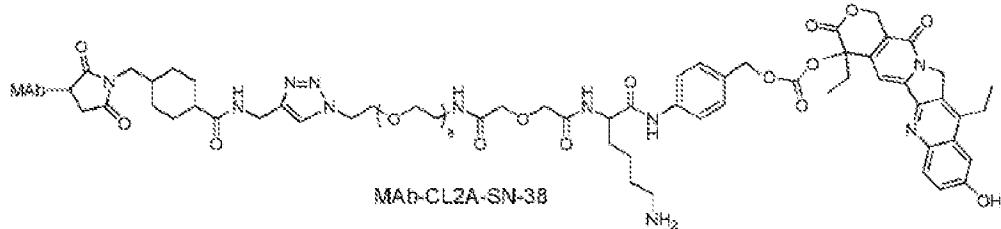
65 [0019] El documento US 2003/0232011 A1 está relacionado con un método para tratar el cáncer, en el que se usa más de un agente terapéutico, teniendo cada uno de los agentes terapéuticos diferentes capacidades de destrucción de tumores, y en el que los agentes terapéuticos se administran a los sitios del tumor. utilizando métodos combinados de focalización y prefocalización.

RESUMEN

50 [0020] El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; se pueden tomar formas de realización preferidas de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

55 [0021] Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, para su uso en un método de tratamiento del cáncer de páncreas, que comprende:

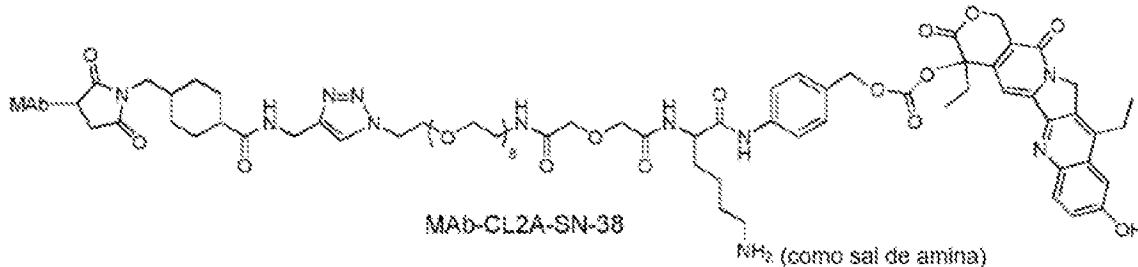
- 60 a) administrar a un sujeto con cáncer de páncreas el anticuerpo anti-Trop-2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo comprende las secuencias de cadena ligera CDR CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 9) y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO: 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante el enlazador CL2A, en donde la estructura del inmunoconjunto es MAb-CL2A-SN-38



b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo mucina anticáncer pancreático PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo mucina anticáncer pancreático o un fragmento del mismo comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad luminosa (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO: 1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO: 3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 6), y en donde el radionucleido es ⁹⁰Y.

15 [0022] Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante un anticuerpo mucina anticáncer pancreático PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, para uso en un método de tratamiento del cáncer de páncreas que comprende:

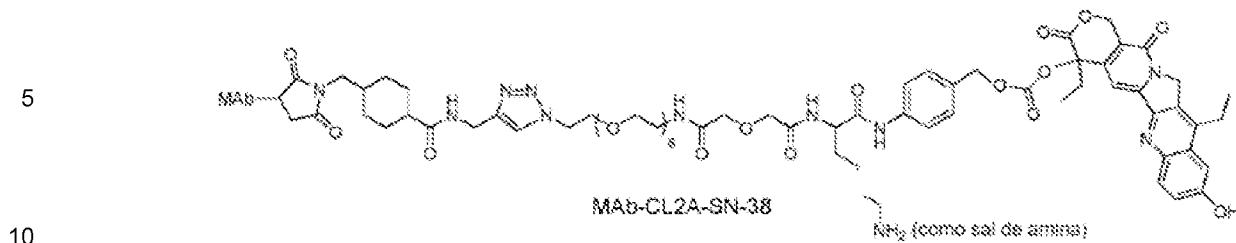
20 a) administrar a un sujeto con cáncer de páncreas un anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO. 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante el enlazador CL2A, en el que la estructura del inmunoconjugado es MAb-CL2A-SN-38



b) administrar a dicho sujeto el anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas o su fragmento de unión a antígeno conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas o su fragmento comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad luminosa (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO: 1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO: 3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 6), y en donde el radionucleido es ⁹⁰Y.

[0023] Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante una composición farmacéutica, que comprende

55 a) un anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 9) y las secuencias de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO. 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante el enlazador CL2A, en el que la estructura del inmunoconjugado es MAb-CL2A-SN-38



; y

15 b) un anticuerpo mucina contra el cáncer de páncreas PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo mucina contra el cáncer de páncreas o un fragmento del mismo comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad ligera (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO: 1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO: 3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 6), y en donde el radionúclido es ⁹⁰Y, y en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar el cáncer de páncreas.

20 [0024] En una forma de realización del primer, segundo y tercer aspecto, el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo mucina anticáncer pancreático o fragmento del mismo se administran de forma secuencial o simultánea.

25 [0025] En una forma de realización del primer, segundo y tercer aspecto, el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo mucina anticáncer pancreático o fragmento del mismo se conjugan entre sí.

30 [0026] En una forma de realización del primer, segundo y tercer aspecto, el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo mucina anticáncer de páncreas o fragmento del mismo se conjugan entre sí mediante la técnica de acoplamiento y bloqueo (DNL).

35 [0027] En una forma de realización del primer, segundo y tercer aspecto, el anticuerpo mucina contra el cáncer de páncreas o un fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento del mismo.

[0028] En una forma de realización del primer, segundo y tercer aspecto, el anticuerpo mucina anticáncer pancreático se une al 80 % o más del adenocarcinoma pancreático invasivo humano, neoplasia mucinosa papilar intraductal, lesiones PanIN-1A, PanIN-1B y PanIN-2 y no se une al tejido pancreático humano normal.

40 [0029] En diversas formas de realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a la terapia de combinación con anticuerpos radiomarcados y anticuerpos conjugados con fármaco. La terapia combinada se utiliza en el tratamiento del cáncer de páncreas. En formas de realización preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, la combinación de anticuerpos radiomarcados y conjugados con fármaco es más eficaz que el anticuerpo radiomarcado solo, el anticuerpo conjugado con fármaco solo o la suma de los efectos de los anticuerpos radiomarcados y conjugados con fármaco administrados individualmente.

45 [0030] Preferiblemente, los anticuerpos de uso se unen específicamente a células cancerosas, con poca o ninguna unión a células normales o no neoplásicas. Más preferiblemente, los anticuerpos se unen a las primeras etapas del cáncer, como PanIN-1A y 1B y PanIN-2 en el caso del cáncer de páncreas. Lo más preferiblemente, los anticuerpos se unen a 80 a 90 % o más de adenocarcinoma de páncreas invasivo humano, neoplasia mucinosa papilar intraductal, lesiones PanIN-1A, PanIN-1B y PanIN-2, pero no al tejido pancreático humano normal.

50 [0031] En una forma de realización específica de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo radiomarcado puede ser un anticuerpo PAM4 humanizado (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 7.282.567), que comprende la región determinante de la complementariedad de la luz (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6). Como se analiza más adelante, se conocen varios radionucleidos terapéuticos de uso para el tratamiento del cáncer y cualquiera de dichos radionucleidos conocidos puede conjugarse con el anticuerpo de interés. En una forma de realización más preferida, el anticuerpo radiomarcado es ⁹⁰Y-hPAM4 (clivatuzumab tetraxetan).

55 [0032] De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo conjugado con fármaco es un anticuerpo RS7 humanizado (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 7.238.785), que comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2

(WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO: 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 12). Como se analiza más adelante, se conocen varios fármacos quimioterapéuticos de uso para el tratamiento del cáncer y cualquiera de dichos fármacos conocidos puede conjugarse con el anticuerpo de interés. De acuerdo con la invención tal como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo conjugado con fármaco es SN-38-hRS7.

5 [0033] En ejemplos alternativos, los anticuerpos pueden ser anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o humanos que se unen al mismo determinante antigenóico (epítopo) que un anticuerpo PAM4 que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad ligera (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO :1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6); o que se unen al mismo epítopo que un anticuerpo RS7 que comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12). Los anticuerpos que se unen al mismo determinante antigenóico pueden identificarse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante estudios de unión competitiva.

10 20 [0034] En formas de realización preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo radiomarcado y el anticuerpo conjugado con fármaco se administran como restos de anticuerpo separados, ya sea de forma secuencial o simultánea. Sin embargo, en formas de realización alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo radiomarcado y el anticuerpo conjugado con fármaco, o fragmentos de los mismos, pueden administrarse como un anticuerpo biespecífico. En formas de realización alternativas preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico puede producirse mediante la técnica de acoplamiento y bloqueo (DNL), como se analiza con más detalle a continuación.

25 [0035] Aunque de acuerdo con la invención, tal como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se conjugan respectivamente con un radionúclido y un fármaco quimioterapéutico, el experto se dará cuenta de que se conocen otros agentes terapéuticos anticancerígenos en la técnica y se pueden usar además del radionúclido y/o fármaco en cuestión. Otros agentes terapéuticos conocidos incluyen toxinas, inmunomoduladores (tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral), hormonas, antagonistas hormonales, enzimas, oligonucleótidos (tales como ARNip o ARNi), agentes terapéuticos fotoactivos, agentes antiangiogénicos y agentes proapoptóticos. Los agentes terapéuticos pueden comprender una o más copias del mismo agente terapéutico o también combinaciones de diferentes agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos pueden conjugarse con los anticuerpos en cuestión o administrarse por separado antes, simultáneamente con o después de los anticuerpos en cuestión.

30 40 [0036] En una forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, el agente terapéutico es un agente citotóxico, tal como un fármaco o una toxina. También se prefiere que el fármaco se seleccione del grupo que consiste en mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas, gemcitabina, triazenos, análogos del ácido fólico, antraciclinas, taxanos, inhibidores de la COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antibióticos, inhibidores de enzimas., epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, alcaloides de la vinca, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, antagonistas hormonales, endostatina, taxoles, camptotecinas, SN-38, doxorubicinas y sus análogos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antimitóticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de mTOR, inhibidores de la proteína de choque térmico (HSP90), inhibidores de proteosoma, inhibidores de HDAC, agentes proapoptóticos, metotrexato, CPT-11 y una combinación de los mismos.

45 55 [0037] En otra forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, el agente terapéutico es una toxina seleccionada del grupo que consiste en ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas y combinaciones de las mismas. O un inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste en una citoquina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y combinaciones de los mismos.

60 65 [0038] En otras formas de realización preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, el agente terapéutico es un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ^{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 , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au y ^{211}Pb . También se prefieren los radionúcleidos que se desintegran sustancialmente con partículas emisoras de Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, 1-125, 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 radionúcleidos que se desintegran sustancialmente con la generación de partículas alfa. Dichos radionúcleidos incluyen, entre otros: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionúcleidos emisores de

partículas alfa útiles son preferentemente de 2.000 a 10.000 keV, más preferentemente de 3.000 a 8.000 keV y lo más preferentemente de 4.000 a 7.000 keV. Otros posibles radioisótopos de uso incluyen ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}TI , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb y similares. En otras formas de realización, el agente terapéutico es un agente terapéutico fotoactivo seleccionado del grupo que consiste en cromógenos y colorantes.

[0039] Alternativamente, el agente terapéutico es una enzima seleccionada del grupo que consiste en malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa., glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucomilasa y acetilcolinesterasa. Tales enzimas se pueden usar, por ejemplo, en combinación con profármacos que se administran en forma relativamente no tóxica y la enzima convierte en el sitio diana en un agente citotóxico. En otras alternativas, un fármaco puede convertirse en una forma menos tóxica mediante enzimas endógenas en el sujeto, pero puede reconvertirse en una forma citotóxica mediante la enzima terapéutica.

[0040] En otras formas de realización alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, se pueden utilizar adicionalmente anticuerpos anti-TAA distintos de PAM4 y/o RS7. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno asociado a tumor seleccionado del grupo que consiste en CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA (CEACAM5), CEACAM6, Lea, el antígeno de Lewis Le(y), CSAP, factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), glicoproteína epitelial-1 (EGP-1), glicoproteína epitelial-2 (EGP-2), CD80, factor de crecimiento placentario (PIGF), anhidrasa carbónica IX, tenascina, IL -6, HLA-DR, CD40, CD74 (p. ej., milatuzumab), CD138 (syndecan-1), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, TAG-72, EGFR, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de angiogénesis (p. ej., VEGF y PIGF), productos de oncogenes (p. ej., bcl-2, Kras, p53), cMET, HER2/neu y antígenos asociados con cáncer gástrico y cáncer colorrectal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0041]

FIG. 1. Imágenes de fusión PET/CT de un paciente con cáncer de páncreas metastásico inoperable tratado con ^{90}Y -hPAM4 fraccionado más gemcitabina, antes de la terapia (lado izquierdo) y después de la terapia (lado derecho). El círculo indica la ubicación de la lesión primaria, que muestra una disminución significativa en la intensidad de la PET/CT después del tratamiento.

FIG. 2. Imágenes PET en 3D de un paciente con cáncer de páncreas metastásico inoperable tratado con ^{90}Y -hPAM4 fraccionado más gemcitabina, antes de la terapia (lado izquierdo) y después de la terapia (lado derecho). Las flechas señalan las ubicaciones de la lesión primaria (a la derecha) y las metástasis (a la izquierda), cada una de las cuales muestra una disminución significativa en la intensidad de la imagen PET después del tratamiento con hPAM4 radiomarcado más gemcitabina.

FIG. 3. Actividad terapéutica de un tratamiento único de tumores CaPan1 establecidos ($\sim 0,4 \text{ cm}^3$) con 0,15 μCi de ^{90}Y hPAM4 IgG, o 0,25 o 0,50 μCi de ^{90}Y -IMP-288 predirigido a TF10.

FIG. 4. Efecto de la potenciación con gemcitabina de la terapia PT-RAIT.

FIG. 5. Efecto de la combinación de cetuximab con gemcitabina y PT-RAIT.

FIG. 6. Eficacia terapéutica de (Q)-hRS7 demostrada en un modelo de xenoinjerto humano Calu-3 para inhibir el crecimiento tumoral **(A)** y aumentar la MST **(B)**. Se inocularon ratones desnudos por vía subcutánea con 1×10^7 células Calu-3. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente $0,15 \text{ cm}^3$, los ratones fueron tratados con una dosis intravenosa única de 50 μg o dos inyecciones de 25 μg administradas con siete días de diferencia. Los animales de control recibieron solución salina.

FIG. 7 ilustra **(A)** la estructura de SN-38 bifuncional (CL2A-SN-38); **(B)** un esquema sintético para preparar CL2ASN-38; y **(C)** un esquema de conjugación para unir CL2A-SN-38 a un anticuerpo.

FIG. 8 compara la eficacia terapéutica de hRS7-SN-38 solo, ^{90}Y -hPAM4 solo y la combinación de hRS7-SN-38 y ^{90}Y -hPAM4, a 75 μCi o 130 μCi .

FIG. 9 ilustra la toxicidad, medida como % de pérdida de peso, de RAIT solo y ADC solo versus la combinación de RAIT más ADC.

FIG. 10 compara los efectos de RAIT y ADC simultáneos con la administración secuencial de los dos tratamientos.

FIG. 11 muestra los efectos de RAIT y ADC realizados con el mismo anticuerpo (hPAM4).

FIG. 12 indica las eficacias comparativas de diferentes conjugados de anticuerpos de SN-38.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

[0043] Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa más o menos 10%. Por ejemplo, "alrededor de 100" incluiría cualquier número entre 90 y 110.

5 [0044] Un anticuerpo, como se describe en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada mediante procesos recombinatorios de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una inmunológicamente activa (es decir, que se une específicamente) porción de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo.

10 [0045] Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, sFv y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que reconoce el anticuerpo de longitud completa. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye fragmentos aislados que consisten en regiones variables de anticuerpos, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en regiones variables de las cadenas pesada y ligera y moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que se encuentran regiones variables ligeras y pesadas. conectados por un enlazador peptídico ("proteínas scFv").

15 [0046] Un anticuerpo químérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables que incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, 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 de los de otras especies, como un gato o un perro.

20 [0047] Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo de roedor, se transfieren desde las cadenas variables pesada y ligera del anticuerpo de roedor a dominios variables pesados y ligeros humanos (por ejemplo, secuencias de regiones estructurales). Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. En determinadas formas de realización, se puede sustituir un número limitado de residuos de aminoácidos de la región estructural del anticuerpo original (de roedor) en las secuencias de la región estructural del anticuerpo humano.

25 [0048] Un anticuerpo humano es, por ejemplo, un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigenica. En esta técnica, se introducen elementos de los loci de las cadenas pesadas y ligeras humanas en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones específicas de los loci de las cadenas pesadas y ligeras endógenas murinas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos particulares, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. 30 Green et al., Nature Genet, describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immune. 6:579 (1994). También se puede construir un anticuerpo completamente 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 35 partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes del dominio variable del anticuerpo se clonian en marco en un gen de la proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamento y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del 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 40 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 en 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 generarse mediante células B activadas *in vitro*. Véase la patente de EE.UU. N°s 5.567.610 y 5.229.275.

45 [0049] Un agente terapéutico es un compuesto, molécula o átomo que se administra por separado, simultáneamente o secuencialmente con un resto de anticuerpo o se conjuga con un resto de anticuerpo, es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un subfragmento, y es útil en el tratamiento de una enfermedad. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fármacos, toxinas, nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, agentes proapoptóticos, agentes antiangiogénicos, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos. Los agentes terapéuticos de uso se describen con más detalle a continuación.

50 [0050] Un inmunoconjungado es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión conjugado con al menos un agente terapéutico y/o de diagnóstico.

55 [0051] Un anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente a al menos dos dianas que tienen una estructura diferente, por ejemplo, dos antígenos diferentes, dos epítopos diferentes en el mismo antígeno o un hapteno y/o un antígeno o epítopo. Los anticuerpos multiespecíficos y multivalentes son construcciones que tienen más de un sitio de unión y los sitios de unión son de diferente especificidad.

[0052] Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente a dos objetivos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos (bsAb) y los fragmentos de anticuerpos biespecíficos (bsFab) pueden tener al menos un brazo que se une específicamente a, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado dirigible que porta un efecto terapéutico o de diagnóstico. agente. Se puede producir una variedad de proteínas de fusión biespecíficas mediante ingeniería molecular.

5

Anticuerpo PAM4

[0053] Varios ejemplos de la divulgación se refieren a anticuerpos que reaccionan con una selectividad muy alta con el cáncer de páncreas en contraposición a los tejidos pancreáticos normales o benignos. Los anticuerpos anticáncer de páncreas y sus fragmentos se generan preferentemente contra una preparación de mucina cruda procedente de un tumor del páncreas humano, aunque se pueden utilizar mucinas parcialmente purificadas o incluso purificadas. Un ejemplo no limitante de dichos anticuerpos es el anticuerpo PAM4.

10

[0054] El anticuerpo PAM4 murino (mPAM4) se desarrolló empleando mucina de cáncer de páncreas derivada del carcinoma de páncreas humano RIP-1 xenoinjertado como inmunógeno. (Gold et al., Int. J. Cancer, 57:204-210, 1994). Los estudios de reactividad cruzada de anticuerpos y de tinción inmunohistoquímica indican que el anticuerpo PAM4 reconoce un epítopo único y novedoso en un antígeno de cáncer de páncreas diana. Los estudios de tinción inmunohistoquímica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 7.282.567), han demostrado que el MAb PAM4 se une a un antígeno expresado por células cancerosas de mama, páncreas y otras células cancerosas, con unión limitada al tejido humano normal; sin embargo, la expresión más alta suele ser en células de cáncer de páncreas. Por tanto, los anticuerpos PAM4 son relativamente específicos del cáncer de páncreas y se unen preferentemente a las células de cáncer de páncreas. El anticuerpo PAM4 reacciona con un epítopo diana que puede internalizarse. Este epítopo se expresa principalmente por antígenos asociados con el cáncer de páncreas y no con pancreatitis focal o tejido pancreático normal. Los estudios de localización y terapia utilizando un MAb PAM4 radiomarcado en modelos animales han demostrado eficacia terapéutica y focalización en tumores (*Id.*).

15

[0055] El anticuerpo PAM4 exhibe varias propiedades que lo convierten en un buen candidato para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico clínico. El anticuerpo PAM4 aparentemente reconoce un epítopo de un antígeno de cáncer de páncreas que es distinto de los epítulos reconocidos por anticuerpos contra el cáncer de páncreas no PAM4 (CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, CEACAM5, CEACAM6, B72.3, anti-Le^a, y otros antígenos anti-Lewis) (*Id.*). Los anticuerpos adecuados para su uso en combinación o junto con el anticuerpo PAM4 incluyen, por ejemplo, CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, anti-CEACAM5, anti-CEACAM6, anti-Le^a, anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD74, anti-CD138 y anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y), o anticuerpos contra el antígeno p específico del colon (CSAp), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, EGP-1, EGP-2, HER2/neu, EGFR, factores de angiogénesis (p. ej., VEGF y PIGF), factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de plaquetas e IL-6, así como productos de oncogenes (bcl-2, Kras, p53), cMET y anticuerpos contra sustancias de necrosis tumoral, tales como los descritos en las patentes de Epstein et al. (Patentes de Estados Unidos N°s 6.071.491, 6.017.514, 5.019.368 y 5.882.626). Dichos anticuerpos serían útiles para complementar la reactividad del anticuerpo PAM4 con el cáncer de páncreas. Estos y otros agentes terapéuticos podrían actuar sinérgicamente con el anticuerpo PAM4, cuando se administran antes, junto con o después de la administración del anticuerpo PAM4.

30

[0056] Formas de realización preferidas de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden implicar el uso de un anticuerpo PAM4 humanizado. Debido a que el huésped humano puede reconocer los anticuerpos monoclonales no humanos como una proteína extraña y las inyecciones repetidas pueden provocar reacciones de hipersensibilidad dañinas, la humanización de secuencias de anticuerpos murinos puede reducir la respuesta inmune adversa que los pacientes pueden experimentar. Para los anticuerpos monoclonales de origen murino, esto a menudo se denomina respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). Preferiblemente, algunos residuos humanos en las regiones estructurales del anticuerpo PAM4 humanizado o fragmentos del mismo se reemplazan por sus homólogos murinos. También se prefiere que se use una combinación de secuencias estructurales de dos anticuerpos humanos diferentes para V_H. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano.

35

[0056] Formas de realización preferidas de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden implicar el uso de un anticuerpo PAM4 humanizado. Debido a que el huésped humano puede reconocer los anticuerpos monoclonales no humanos como una proteína extraña y las inyecciones repetidas pueden provocar reacciones de hipersensibilidad dañinas, la humanización de secuencias de anticuerpos murinos puede reducir la respuesta inmune adversa que los pacientes pueden experimentar. Para los anticuerpos monoclonales de origen murino, esto a menudo se denomina respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). Preferiblemente, algunos residuos humanos en las regiones estructurales del anticuerpo PAM4 humanizado o fragmentos del mismo se reemplazan por sus homólogos murinos. También se prefiere que se use una combinación de secuencias estructurales de dos anticuerpos humanos diferentes para V_H. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano.

40

Anticuerpo RS7

45

[0057] El anticuerpo RS7 es una IgG₁ murina generada contra una preparación de membrana cruda de un carcinoma pulmonar de células escamosas primario humano. (Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990). El anticuerpo RS7 reconoce una glicoproteína de 46-48 kDa, caracterizada como grupo 13. (Stein et al., Int. J. Cancer Supp. 8:98-102, 1994) El antígeno fue designado como EGP-1 (glucoproteína epitelial-1), pero también se lo conoce como Trop-2.

50

[0058] Trop-2 es una proteína transmembrana de tipo I y se ha clonado a partir de células tanto humanas (Fornaro et al., Int J Cancer 1995; 62:610-8) como de ratón (Sewedy et al., Int J Cancer 1998; 75:324-30). Además de su papel como transductor de señales de calcio asociado a tumores (Ripani et al., Int J Cancer 1998;76:671-6), se demostró que la expresión de Trop-2 humano es necesaria para la tumorigénesis y la invasividad de las células de cáncer de

55

colon que podría reducirse eficazmente con un anticuerpo policlonal contra el dominio extracelular de Trop-2 (Wang et al., Mol Cancer Ther 2008;7:280-5).

[0059] El creciente interés en Trop-2 como diana terapéutica para cánceres sólidos (Cubas et al., Biochim Biophys Acta 2009;1796:309-14) está atestiguado por informes adicionales que documentaron la importancia clínica de Trop-2 sobreexpresado en mama (Huang et al., Clin Cancer Res 2005;11:4357-64), colorrectal (Ohmachi et al., Clin Cancer Res 2006;12:3057-63; Fang et al., Int J Colorectal Dis 2009;24: 875-84), y carcinomas de células escamosas orales (Fong et al., Modern Pathol 2008;21:186-91). Es particularmente notable la evidencia más reciente de que las células basales de la próstata que expresan altos niveles de Trop-2 están enriquecidas para una actividad similar a un tallo in vitro e in vivo (Goldstein et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2008;105:20882-7).

[0060] Los estudios de citometría de flujo y tinción inmunohistoquímica han demostrado que el MAb RS7 detecta antígeno en una variedad de tipos de tumores, con unión limitada al tejido humano normal. (Stein et al., 1990) EGP-1 se expresa principalmente en carcinomas tales como carcinomas de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata. Los estudios de localización y terapia utilizando MAb RS7 murino radiomarcado en modelos animales han demostrado eficacia terapéutica y focalización de tumores (Stein et al., 1990; Stein et al., 1991).

[0061] Se ha demostrado una fuerte tinción de RS7 en tumores de pulmón, mama, vejiga, ovario, útero, estómago y próstata. (Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993) Los casos de cáncer de pulmón comprendían tanto carcinomas de células escamosas como adenocarcinomas. (*Id.*) Ambos tipos de células se tiñeron fuertemente, lo que indica que el anticuerpo RS7 no distingue entre clases histológicas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

[0062] El MAb RS7 se internaliza rápidamente en las células diana (Stein et al., 1993). La constante de tasa de internalización para RS7 MAb es intermedia entre las constantes de tasa de internalización de otros dos MAb de internalización rápida, que han demostrado ser útiles para la producción de immunotoxinas. (*Id.*) Está bien documentado que la internalización de conjugados de inmunotoxina es un requisito para la actividad antitumoral. (Pastan et al., Cell 47:641, 1986) La internalización de inmuconjungados de fármacos se ha descrito como un factor importante en la eficacia antitumoral. (Yang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci EE.UU. 85: 1189, 1988) Por tanto, el anticuerpo RS7 exhibe varias propiedades importantes para aplicaciones terapéuticas.

Preparación de anticuerpos

[0063] MAbs se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y 2.9.1-2.9.3. Véase también Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992). 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.

Anticuerpos quiméricos

[0064] Un anticuerpo quimérico 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 la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos exhiben una inmunogenicidad disminuida y una mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Las técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina murina se describen, por ejemplo, en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 6: 3833 (1989). Las técnicas para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Como ejemplo, Leung et al., Hybridoma 13:469 (1994), produjeron una quimera LL2 combinando secuencias de ADN que codifican los dominios V_k y V_H de LL2 murino, un anticuerpo monoclonal anti-CD22, con los respectivos dominios de regiones constantes humanas k e IgG1.

Anticuerpos humanizados

[0065] Las técnicas para producir MAb humanizados son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522 (1986), Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. EE.UU. 89: 4285 (1992), Sandhu, Crit. Biotech 12: 437 (1992)., J. Immun 150: 2844 (1993)). Un anticuerpo monoclonal quimérico o murino 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 estructurales (FR) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se reemplazan con secuencias de FR humanas. Como la simple transferencia de CDR de ratón a FR humanas a menudo da como resultado una reducción o incluso una pérdida de la afinidad del anticuerpo, podría ser necesaria una modificación adicional para restaurar la afinidad original del anticuerpo murino. Esto se puede lograr mediante la sustitución de uno o más residuos humanos en las regiones FR con sus homólogos murinos para obtener un anticuerpo

que posea una buena afinidad de unión a su epítopo. Véase, por ejemplo, Tempest et al., Biotechnology 9:266 (1991) y Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988). Los residuos preferidos para la sustitución incluyen residuos de FR que están ubicados dentro de 1, 2 o 3 angstroms de una cadena lateral de un residuo de CDR, que están ubicados adyacentes a una secuencia de CDR o que se predice que interactuarán con un residuo de CDR.

Antigueros humanos

[0066] Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos completamente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana (por ejemplo, Mancini et al., 2004, New Microbiol. 27:315-28; Conrad y Scheller, 2005, Comb Chem. High Throughput Screen 8:117-26; También se puede construir un anticuerpo completamente 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). Se espera que tales anticuerpos completamente humanos presenten incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos químéricos o humanizados y funcionen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos.

[0067] En una alternativa, la técnica de presentación en fagos se puede usar para generar anticuerpos humanos (por ejemplo, DantasBarbosa et al., 2005, Genet. Mol. Res. 4:126-40). Los anticuerpos humanos pueden generarse a partir de humanos normales o de humanos que presentan un estado patológico particular, como el cáncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio de anticuerpos circulantes puede estar sesgado hacia anticuerpos contra antígenos asociados a enfermedades.

[0068] En un ejemplo no limitante de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. Generalmente, el ARN total se obtuvo de linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*). Se clonaron Fab recombinantes a partir de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de presentación en fagos (*Id.*). Los ARN se convirtieron en ADNc y se usaron para preparar bibliotecas de ADNc de Fab usando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de la biblioteca se realizó según 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, Nueva York, 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 en fagos. Dichas bibliotecas pueden seleccionarse mediante métodos estándar de presentación en fagos, como se conoce en la técnica. La presentación en 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).

[0069] Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante células B activadas *in vitro*. Véanse las patentes de EE.UU. números 5.567.610 y 5.229.275. El experto en la técnica se dará cuenta de que estas técnicas son ejemplares y que se puede utilizar cualquier método conocido para producir y seleccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos.

[0070] En otra alternativa, se pueden usar animales transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier objetivo inmunogénico, usando protocolos de inmunización estándar. Green et al., Nature Genet, describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Inmune. 6:579 (1994). Un ejemplo no limitante de dicho sistema es el XenoMouse® (por ejemplo, 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 inactivados y reemplazados por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunológico del ratón permanece intacto.

[0071] El XenoMouse® se transformó con YAC (cromosomas artificiales de levadura) configurados en línea germinal que contenían porciones de los loci IgH e Igkappa humanos, incluida la mayoría de las secuencias de la región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de regiones variables humanas puede usarse para generar células B productoras de anticuerpos, que pueden procesarse para dar hibridomas mediante técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos mediante la respuesta inmune normal, que pueden recolectarse y/o producirse mediante técnicas estándar analizadas anteriormente. Hay disponibles una variedad de cepas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpo. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, al tiempo que conservan las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto se dará cuenta de que las composiciones y métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema XenoMouse® sino que pueden utilizar cualquier animal transgénico que haya sido modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

Anticuerpos conocidos y antígenos diana

[0072] Como se analizó anteriormente, los anticuerpos inmunoconjugados son útiles para el tratamiento del cáncer de páncreas. Sin embargo, el experto se dará cuenta de que la divulgación no está tan limitada y puede aplicarse a otros tipos de cáncer o incluso a otros estados patológicos. Los ejemplos no limitantes incluyen enfermedades malignas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades

5 autoinmunes, enfermedades de disfunción immune (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante de órganos) o enfermedades neurológicas. Los antígenos diana ejemplares de uso para el tratamiento de dichas enfermedades pueden incluir anhidrasa carbónica IX, CCCL19, CCCL21, CSA β , CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, IGF-1R., CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, 10 CD74., CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CXCR4, AFP, PSMA, CEACAM5, CEACAM6, B7, ED-B de fibronectina, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (ILGF-1), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, NCA-95, NCA-90, Ia, HM1.24, EGP-1, EGP-2, HLA-DR, tenascina, 15 Le(y), RANTES, T101, TAC, antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, TNF- α , receptor TRAIL (R1 y R2), VEGFR, EGFR, PIGF, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogén.

20 [0073] En ciertos ejemplos, tales como el tratamiento de tumores, los anticuerpos de uso pueden dirigirse a antígenos asociados a tumores. Estos marcadores antigenicos pueden ser sustancias producidas por un tumor o pueden ser sustancias que se acumulan en el sitio del tumor, en las superficies de las células tumorales o dentro de las células tumorales. Entre dichos marcadores asociados a tumores se encuentran los descritos por Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", en Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer", página 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979) y en la patente de EE.UU. N°s 4.150.149; 4.361.544; y 4.444.744. Los informes 25 sobre antígenos asociados a tumores (TAA) incluyen Mizukami et al., (2005, Nature Med. 11:992-97); Hatfield et al., (2005, Curr. Cancer Drug Targets 5:229-48); Vallbohmer et al. (2005, J. Clin. Oncol. 23:3536-44); y Ren et al. (2005, Ann. Surg. 242:55-63).

30 [0074] Herberman, supra, ha clasificado los marcadores asociados a tumores en varias categorías que incluyen antígenos oncofetales, antígenos placentarios, antígenos asociados a virus oncovírgenes o tumorales, antígenos asociados a tejidos, antígenos asociados a órganos, hormonas ectópicas y antígenos normales o variantes de los mismos. Ocasionalmente, se usa ventajosamente una subunidad de un marcador asociado a tumores para generar anticuerpos que tienen una mayor especificidad tumoral, por ejemplo, la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG) o la región gamma del antígeno carcinoembionario (CEA), que estimulan la producción. de 35 anticuerpos que tienen una reactividad cruzada muy reducida con sustancias no tumorales como se describe en la patente de EE.UU. N°s 4.361.644 y 4.444.744.

40 [0075] Otro marcador de interés es el activador transmembrana y el interactor CAML (TACI). Véase Yu et al. Nat. Immunol. 1:252-256 (2000). Brevemente, TACI es un marcador de neoplasias malignas de células B (p. ej., linfoma). TACI y el antígeno de maduración de células B (BCMA) están unidos por el homólogo del factor de necrosis tumoral, un ligando inductor de proliferación (APRIL). APRIL estimula la proliferación *in vitro* de células B y T primarias y aumenta el peso del bazo debido a la acumulación de células B *in vivo*. APRIL también compite con TALL-I (también llamado BLyS o BAFF) por la unión al receptor. BCMA y TACI solubles previenen específicamente la unión de APRIL y bloquean la proliferación de células B primarias estimulada por APRIL. BCMA-Fc también inhibe la producción de 45 anticuerpos contra la hemocianina de lapa californiana y Pneumovax en ratones, lo que indica que la señalización de APRIL y/o TALL-I a través de BCMA y/o TACI son necesarias para la generación de inmunidad humoral. Por lo tanto, APRIL-TALL-I y BCMA-TACI forman una vía de dos ligandos y dos receptores implicada en la estimulación de la función de las células B y T.

50 [0076] Cuando la enfermedad implica un linfoma, leucemia o un trastorno autoinmune, los antígenos diana pueden seleccionarse del grupo que consiste en CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD154, B7, MUC1, Ia, Ii, HM1.24, HLA-DR, tenascina, VEGF, PIGF, fibronectina ED-B, un oncogén, un producto oncogén, CD66a-d, antígenos de necrosis, IL-2, T101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5).

55 [0077] El experto se dará cuenta de que se puede utilizar cualquier anticuerpo o fragmento conocido en la técnica que tenga especificidad de unión para un antígeno diana asociado con un estado o afección patológica. Dichos anticuerpos conocidos incluyen, entre otros, hR1 (anti-IGF-1R, solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 12/772.645, presentada el 12/03/10) hPAM4 (mucina contra el cáncer de páncreas, patente de EE.UU. n.º 7.282.567), hA20 (anti-CD20, patente de EE.UU. n.º 7.251.164), hA19 (anti-CD19, patente de EE.UU. n.º 7.109.304), hIMMU31 (anti-AFP, patente de EE.UU. n.º 7.300.655), hLL1 (anti-CD74, patente de EE.UU. n.º 7.312.318), hLL2 (antiCD22, patente de EE.UU. n.º 7.074.403), hMu-9 (anti-CSAp, patente de EE.UU. n.º 7.387.773), 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 7.662.378, solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 12/846.062, presentada el 29/7/10), hRS7 (anti-

EGP-1, patente nº 7.238.785), hMN-3 (anti-CEACAM6, patente de EE.UU. nº 7.541.440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, patente de EE.UU. nº 7.138.496).

- 5 [0078] Se conocen en la técnica varios otros anticuerpos de uso (por ejemplo, patentes de EE.UU. N°s 5.686.072; 5.874.540; 6.107.090; 6.183.744; 6.306.393; 6.653.104; 6.730.300; 6.899.864; 6.926.893; 6.962.702; 7.238.786; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.585.491; 7.642.239 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20060193865).
- 10 [0079] Los anticuerpos de uso pueden obtenerse comercialmente a partir de una amplia variedad de fuentes conocidas. Por ejemplo, una variedad de líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Una gran cantidad de anticuerpos contra diversos objetivos de enfermedades, incluidos, entre otros, antígenos asociados a tumores, se han depositado en la ATCC y/o se han publicado secuencias de regiones variables y están disponibles para su uso en los métodos y composiciones reivindicados. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 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; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.15; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 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; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953; 5.525.338. Estos son sólo ejemplos y en la técnica se conoce una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto se dará cuenta de que se pueden obtener secuencias de anticuerpos o hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad mediante una simple búsqueda en las bases de datos de ATCC, NCBI y/o USPTO de anticuerpos contra una diana de interés asociada a una enfermedad seleccionada. Los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, escindirse, ligarse en un vector de expresión, transfectarse en una célula huésped adaptada y usarse para la producción de proteínas, usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

Fragментos de anticuerpos

- 40 [0080] Los fragmentos de anticuerpo son porciones de unión a antígeno de un anticuerpo, tales como F(ab')₂, Fab', F(ab)₂, Fab, Fv, sFv, scFv y similares. Mediante técnicas conocidas se pueden generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos. Los fragmentos F(ab')₂, por ejemplo, pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Estos y otros métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patente de EE.UU. N°s 4.036.945 y 4.331.647 y referencias contenidas en las mismas. Véase también Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., en METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, página 422 (Academic Press 1967), y Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión Fab' (Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281) para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab' monoclonales con la especificidad deseada.
- 50 [0081] Una molécula Fv de cadena única (scFv) comprende un dominio V_L y un dominio VH. Los dominios V_L y VH se asocian para formar un sitio de unión objetivo. Estos dos dominios están además unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico (L). Una molécula scFv se indica como V_L-L-VH si el dominio V_L es la parte N-terminal de la molécula scFv, o como VH-L-V_L si el dominio VH es la parte N-terminal de la molécula scFv. Los métodos para preparar moléculas scFv y diseñar conectores peptídicos adecuados se describen en las patentes de EE.UU. n° 4.704.692, patente de EE.UU. 4.946.778, R. Raag y M. Whitlow, "Single Chain Fvs". FASEB Vol 9:73-80 (1995) y R. E. Bird y B. W. Walker, Single Chain Antibody Variable Regions, TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991).
- 60 [0082] Otros fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de dominio único, se conocen en la técnica, y pueden usarse en las construcciones reivindicadas. Los anticuerpos de dominio único (VHH) pueden obtenerse, por ejemplo, de camellos, alpacas o llamas mediante técnicas de inmunización estándar. (Ver, por ejemplo, Muyldermans et al., TIBS 26:230-235, 2001; Yau et al., J Immunol Methods 281:161-75, 2003; Maass et al., J Immunol Methods 324:13-25, 2007). El VHH puede tener una potente capacidad de unión a antígeno y puede interactuar con nuevos epítopos que son inaccesibles a los pares VH-V_L convencionales. (Muyldermans et al., 2001). La IgG sérica de alpaca contiene aproximadamente un 50% de anticuerpos IgG (HCAb) de cadena pesada de camélido únicamente (Maass et al., 2007). Las alpacas se pueden inmunizar con antígenos conocidos, como el TNF-α, y se pueden aislar

VHH que se unen al antígeno diana y lo neutralizan (Maass et al., 2007). Se han identificado cebadores de PCR que amplifican prácticamente todas las secuencias codificantes de VHH de alpaca y pueden usarse para construir bibliotecas de presentación en fagos de VHH de alpaca, que pueden usarse para el aislamiento de fragmentos de anticuerpos mediante técnicas de biopanning estándar bien conocidas en la técnica (Maass et al., 2007).

[0083] También se puede preparar un fragmento de anticuerpo mediante hidrólisis proteolítica de un anticuerpo de longitud completa o mediante expresión en *E. coli* u otro huésped del ADN que codifica el fragmento. Se puede obtener un fragmento de anticuerpo mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos de longitud completa mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se puede producir un fragmento de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de aproximadamente 100 kD denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir un fragmento monovalente Fab' de aproximadamente 50 Kd. Alternativamente, una escisión enzimática usando papaína produce directamente dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc.

[0084] Otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras y pesadas, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

20 Técnicas generales de clonación y producción de anticuerpos.

[0085] Diversas técnicas, tales como la producción de anticuerpos químéricos o humanizados, pueden implicar procedimientos de clonación y construcción de anticuerpos. Las secuencias V_k (cadena ligera variable) y V_H (cadena pesada variable) de unión al antígeno para un anticuerpo de interés se pueden obtener mediante una variedad de procedimientos de clonación molecular, como RT-PCR, 5'-RACE y detección de bibliotecas de ADNc. Los genes V de un MAb de una célula que expresa un MAb murino pueden clonarse mediante amplificación por PCR y secuenciarse. Para confirmar su autenticidad, los genes V_L y V_H clonados pueden expresarse en cultivo celular como un Ab químérico como describen Orlandi et al., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833 (1989)). A partir de las secuencias del gen V, se puede diseñar y construir un MAb humanizado como describen Leung et al. (Mol. Immunol., 32:1413 (1995)).

[0086] Se puede preparar ADNc a partir de cualquier línea de hibridoma conocida o línea celular transfectada que produzca un MAb murino mediante técnicas generales de clonación molecular (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a edición (1989)). La secuencia V_k para el MAb puede amplificarse usando los cebadores VK1BACK y VK1FOR (Orlandi et al., 1989) o el conjunto de cebadores extendido descrito por Leung et al. (BioTechniques, 15: 286 (1993)). Las secuencias V_H se pueden amplificar usando el par de cebadores VH1BACK/VH1FOR (Orlandi et al., 1989) o los cebadores que se hibridan con la región constante de IgG murina descrita por Leung et al. (Hybridoma, 13:469 (1994)). Los genes V humanizados pueden construirse mediante una combinación de síntesis de moldes de oligonucleótidos largos y amplificación por PCR como lo describen Leung et al. (Mol. Immunol., 32: 1413 (1995)).

[0087] Productos de PCR para V_k se pueden subclonar en un vector de estadificación, tal como un vector de estadificación basado en pBR327, VKpBR, que contiene un promotor de Ig, una secuencia de péptido señal y sitios de restricción convenientes. Los productos de PCR para V_H se pueden subclonar en un vector de estadificación similar, como el VH_pBS basado en pBluescript. Los casetes de expresión que contienen las secuencias V_k y V_H junto con las secuencias del promotor y del péptido señal pueden escindirse de VKpBR y VH_pBS y ligarse en vectores de expresión apropiados, tales como pKh y pG1g, respectivamente (Leung et al., Hybridoma, 13:469 (1994)). Los vectores de expresión pueden cotransfектarse en una célula apropiada y los fluidos sobrenadantes pueden controlarse para determinar la producción de un MAb químérico, humanizado o humano. Alternativamente, los casetes de expresión V_k y V_H pueden escindirse y subclonarse en un único vector de expresión, tal como pdHL2, como describen Gillies et al. (J. Immunol. Methods 125:191 (1989) y también se muestra en Losman et al., Cancer, 80:2660 (1997)).

[0088] En una forma de realización alternativa, los vectores de expresión se pueden transfecutar en células huésped que han sido preadaptadas para la transfección, el crecimiento y la expresión en medio libre de suero. Las líneas celulares ejemplares que pueden usarse incluyen las líneas celulares Sp/EEE, Sp/ESF y Sp/ESF-X (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s 7.531.327; 7.537.930 y 7.608.425). Estas líneas celulares ejemplares se basan en la línea celular de mieloma Sp2/0, transfectadas con un gen Bcl-EEE mutante, expuestas a metotrexato para amplificar secuencias genéticas transfectadas y preadaptadas a una línea celular libre de suero para la expresión de proteínas.

60 Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

[0089] Como se analiza en los ejemplos siguientes, en formas de realización preferidas el anticuerpo radiomarcado y el anticuerpo conjugado con fármaco se administran como anticuerpos separados, ya sea de forma secuencial o simultánea. Sin embargo, en formas de realización alternativas, los dos inmuconjugados se pueden administrar como un único anticuerpo biespecífico o multiespecífico. Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos

biespecíficos o multiespecíficos, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. número 7.405.320. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse 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 antigénico diferente (Milstein y Cuello, *Nature*, 1983; 305:537-540).

5 [0090] Otro método para producir anticuerpos biespecíficos utiliza reticulantes heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. *Nature*. 1985; 314:628-631; Perez, et al. *Nature*. 1985; 316:354-356). También se pueden producir anticuerpos biespecíficos mediante la reducción de cada uno de los 10 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). Otros métodos incluyen mejorar la eficacia de generar hibridomas híbridos mediante la transferencia genética de distintos 15 marcadores seleccionables a través de vectores lanzadera derivados de retrovirus en hibridomas parentales respectivos, 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 pesada y ligera de un anticuerpo diferente.

20 [0091] Los dominios V_H y V_L afines se pueden unir con un enlazador peptídico de composición y longitud apropiadas (que normalmente consta de más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv monocatenario (scFv), como se analizó anteriormente. La reducción de la longitud del enlazador 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 resulta en la formación de multímeros funcionales. Las 25 cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que están unidas con conectores entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con conectores entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, se prefieren los trímeros (denominados triacuerpos) y los tetrámeros (denominados tetracuerpos), pero los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición y de la orientación de los dominios V (V_H -enlazador- V_L o V_L -enlazador- V_H), además de la longitud del enlazador.

30 [0092] Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan diversas dificultades en términos de bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o complejidad de la técnica. Más recientemente, se ha utilizado una técnica conocida como "dock and lock" (DNL), analizada con más detalle a continuación, para producir combinaciones de prácticamente cualquier anticuerpo, fragmento de anticuerpo y otras moléculas efectoras deseadas. Cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para preparar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos se puede utilizar en la práctica de los métodos actualmente reivindicados.

35 Dock-and-Lock (DNL)

40 [0093] Se pueden producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos u otras construcciones usando la tecnología de acoplamiento y bloqueo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y 7.666.400). El método DNL aprovecha las interacciones proteína/proteína específicas que se producen entre las subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y el dominio de anclaje (DA) de las proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAP) (Baillie et al., *FEBS Letters*. 2005; 579: 3264. Wong y Scott, *Nat. Rev. Mol. Biol.* La PKA, que desempeña un papel central en una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas desencadenada por la unión del segundo mensajero AMPc a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., *J. Biol. Chem.* 1968; 243:3763). La estructura de la 45 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). 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 (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:222). La unión de AMPc a las subunidades R conduce a la liberación de 50 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 mediante su acoplamiento con AKAP (Scott et al., *J. Biol. Chem.* 1990;265:21561)

55 [0094] 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), se han identificado 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, con diversas estructuras en especies que van desde levaduras hasta humanos (Wong y Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5: 959). La DA 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 la DA son bastante variadas entre las AKAP individuales, y las afinidades de unión informadas para los dímeros RII varían de 2 a 90 nM (Alto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2003;100:4445). Los AKAP solo se unirán a subunidades R diméricas. Para la RII α humana, la DA se une a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos amino terminales (Colledge y Scott, *Trends Cell Biol.* 1999; 6:216). Por lo tanto, el dominio de dimerización y el dominio de unión a AKAP de la RII α humana están ambos ubicados dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos N-terminal (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999;6:222; Newlon et al., *EMBO J.* 2001;20:1651), que en el presente documento se denomina DDD.

[0095] Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD de RII α humano y el DA de AKAP como un excelente par de módulos enlazadores para acoplar dos entidades cualesquiera, denominadas en lo sucesivo **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría ser bloqueado aún más en una estructura unida de manera estable mediante la introducción de residuos de cisteína tanto en DDD como en DA en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque "acoplar y bloquear" 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 denominado en lo sucesivo **a**. Debido a que la secuencia DDD efectuaría la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto por **a**₂. La entidad **B** se construye uniendo una secuencia DA a un precursor de **B**, lo que da como resultado un segundo componente denominado en lo sucesivo **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a**₂ creará un sitio de acoplamiento para unirse a la secuencia DA contenida en **b**, facilitando así una asociación fácil de **a**₂ y **b** para formar un complejo trimérico binario compuesto de **a**₂**b**. Este evento de unión se vuelve irreversible con una reacción posterior para asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, lo que ocurre de manera muy eficiente según el principio de concentración local efectiva porque las interacciones de unión iniciales deberían traer los grupos tiol reactivos colocados tanto en el DDD como en el DA, en proximidad (Chmura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2001;98:8480) para ligar sitio específico. Utilizando diversas combinaciones de enlazadores, módulos adaptadores y precursores, se puede producir y utilizar una amplia variedad de construcciones de DNL de diferente estequiometría, incluyendo, entre otras, construcciones de DNL diméricas, triméricas, tetraméricas, pentaméricas y hexaméricas (véanse, por ejemplo, los EE.UU. N°s 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866;

[0096] Al unir DDD y DA lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que dichas ligaciones específicas de sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y potencialmente puede aplicarse 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 DA y DDD descrito en los Ejemplos siguientes, prácticamente cualquier proteína o péptido puede incorporarse en una construcción DNL. Sin embargo, la técnica no es limitante y se pueden utilizar otros métodos de conjugación.

[0097] Se conocen diversos métodos para producir proteínas de fusión, incluida la síntesis, hibridación y/o amplificación de ácidos nucleicos, para producir un ácido nucleico bicatenario sintético que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión mediante técnicas de biología molecular estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a edición, 1989). En tales formas de realización preferidas, el resto DA y/o DDD puede unirse al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efector. Sin embargo, el experto se dará cuenta de que el sitio de unión de un resto DA o DDD a un resto efector puede variar, dependiendo de la naturaleza química del resto efector y la(s) parte(s) del resto efector implicadas en su actividad fisiológica. La unión específica de sitio de una variedad de restos efectores se puede realizar usando técnicas conocidas en la técnica, tales como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

40 Orientación previa

[0098] Según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, el radionúclido y el fármaco se unen directamente a los anticuerpos de interés y se administran como inmunoconjungados. Sin embargo, alternativamente, el radionucleido y/o fármaco se pueden conjugar con una construcción seleccionable que comprende uno o más haptenos. El hapteno es reconocido por al menos un brazo de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que también se une a un antígeno asociado a un tumor u otro antígeno asociado a una enfermedad. En este caso, el radionucleido y/o fármaco se unen indirectamente a los anticuerpos, mediante la unión de la construcción dirigible. Este proceso se conoce como orientación previa.

[0099] La orientación previa es un proceso de varios pasos desarrollado originalmente para resolver el lento aclaramiento sanguíneo de los anticuerpos dirigidos directamente, lo que contribuye a una toxicidad indeseable para los tejidos normales, como la médula ósea. Con la orientación previa, se une un radionúclido u otro agente diagnóstico o terapéutico a una pequeña molécula de administración (construcción objetivo) que se elimina de la sangre en cuestión en minutos. Primero se administra un anticuerpo biespecífico o multiespecífico de orientación previa, que tiene sitios de unión para la construcción objetivo, así como un antígeno diana, se deja que el anticuerpo libre se elimine de la circulación y luego se administra la construcción objetivo.

[0100] Los métodos de orientación previa se describen, por ejemplo, en Goodwin et al., patente de EE.UU. n° 4.863.713; Goodwin y col., J. Nucl. Med. 29:226, 1988; Hnatowich y col., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr y col., J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klibanov y col., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn y col., J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter y col., Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli y col., Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli y col., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; Patente de EE.UU. n° 5.256.395; Stickney y col., Cancer Res. 51:6650, 1991; Yuan y col., Cancer Res. 51:3119, 1991; Patente de EE.UU. N°s 6.077.499; 7.011.812; 7.300.644; 7.074.405; 6.962.702; 7.387.772; 7.052.872; 7.138.103; 6.090.381; 6.472.511; 6.962.702; y 6.962.702.

[0101] Un método de orientación previa para tratar o diagnosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto puede proporcionarse mediante: (1) administración al sujeto de un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo; (2) opcionalmente administrar al sujeto una composición aclaradora y permitir que la composición elimine el anticuerpo de la circulación; y (3) administrar al sujeto la construcción objetivo, que contiene uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico quelados o unidos químicamente.

Inmunoconjungados

[0102] Según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, el radionúclido y el fármaco se unen directamente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para formar un inmunoconjungado. Los inmunoconjungados que comprenden radionúclidos pueden formarse mediante unión covalente directa del radionúclido a un grupo funcional del anticuerpo, como en la bien conocida radioyodación de residuos de tirosina. Alternativamente, el radionucleido se puede conjugar con un resto quelante que está unido al anticuerpo o fragmento del mismo. Los métodos para la conjugación covalente de restos quelantes, fármacos y otros agentes terapéuticos con anticuerpos y otras proteínas se conocen en la técnica y se puede utilizar cualquier método conocido.

[0103] Agentes terapéuticos pueden estar unidos, por ejemplo, a grupos SH reducidos y/o a cadenas laterales de carbohidratos. Se puede unir un agente terapéutico a la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante la formación de enlaces disulfuro. Alternativamente, dichos agentes se pueden unir usando un reticulante heterobifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu y col., Int. J. Cancer 56: 244 (1994). Las técnicas generales para dicha conjugación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Alternativamente, el agente terapéutico se puede conjugar mediante un resto carbohidrato en la región Fc del anticuerpo. El grupo carbohidrato se puede utilizar para aumentar la carga del mismo agente que está unido a un grupo tiol, o el resto de carbohidrato se puede utilizar para unirse a un agente terapéutico o de diagnóstico diferente.

[0104] Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para conjugar grupos funcionales con anticuerpos a través de una fracción carbohidrato de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46: 1101 (1990); y Shih et al., patente de EE.UU. nº 5.057.313. El método general implica hacer reaccionar un anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidada con un polímero portador que tiene al menos una función amina libre. Esta reacción da como resultado un enlace inicial de base de Schiff (imina), que puede estabilizarse mediante reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

[0105] La región Fc puede estar ausente si el componente de anticuerpo del inmunoconjungado es un fragmento de anticuerpo. Sin embargo, es posible introducir un resto de carbohidrato en la región variable de cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de longitud completa. Véase, por ejemplo, Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); Patentes de EE.UU. Nros 5.443.953 y 6.254.868. El resto de carbohidrato modificado se utiliza para unir el agente terapéutico o de diagnóstico.

[0106] Los métodos de conjugación y uso de agentes quelantes para unir radionucleidos a proteínas son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº 7.563.433). Quelantes ejemplares incluyen, entre otros, DTPA (tal como Mx-DTPA), DOTA, TETA, NETA o NOTA. Los quelatos pueden estar directamente unidos a anticuerpos o péptidos, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 4.824.659. Los restos quelantes particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos monometilo y ciclohexilo. Otros quelatos de tipo anillo, como los poliéteres macrocíclicos, son de interés para la unión estable de radionucleidos.

[0107] En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los radionucleidos pueden unirse a proteínas o péptidos mediante reacción con un reactivo que tiene una cola larga, al que se pueden unir una multiplicidad de grupos quelantes para unir iones. Tal cola puede ser un polímero tal como polilisina, polisacárido u otras cadenas derivatizadas o derivatizables que tienen grupos colgantes a los que se pueden unir grupos quelantes tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se sabe que son útiles para este fin.

[0108] Un método alternativo para unir restos quelantes, fármacos u otros grupos funcionales a una molécula objetivo implica el uso de reacciones químicas de clic. El enfoque de la química del clic se concibió originalmente como un método para generar rápidamente sustancias complejas uniendo pequeñas subunidades de forma modular. (Ver, por ejemplo, Kolb et al., 2004, Angew Chem Int Ed 40:3004-31; Evans, 2007, Aust J Chem 60:384-95.) Se conocen en la técnica diversas formas de reacción química de clic, tales como la reacción catalizada por cobre de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen (Tomoe et al., 2002, J Organic Chem 67:3057-64), que a menudo se denomina "reacción de

clic". Otras alternativas incluyen reacciones de cicloadición como la de Diels-Alder, reacciones de sustitución nucleofílica (especialmente en pequeños anillos tensos como compuestos de epoxi y aziridina), formación química de carbonilo de compuestos de urea y reacciones que involucran dobles enlaces carbono-carbono, como los alquinos en tiol-ino. reacciones.

5 [0109] La reacción de cicloadición de azida alquino Huisgen utiliza un catalizador de cobre en presencia de un agente reductor para catalizar la reacción de un grupo alquino terminal unido a una primera molécula. En presencia de una 10 segunda molécula que comprende una fracción de azida, la azida reacciona con el alquino activado para formar un 1,2,3-triazol 1,4-disustituido. La reacción catalizada por cobre ocurre a temperatura ambiente y es suficientemente 15 específica como para que a menudo no sea necesaria la purificación del producto de reacción. (Rostovstev et al., 2002, Angew Chem Int Ed 41:2596; Tornoe et al., 2002, J Org Chem 67:3057.) Los grupos funcionales azida y alquino son en gran medida inertes frente a biomoléculas en medio acuoso, lo que permite la reacción a ocurrir en soluciones complejas. El triazol formado es químicamente estable y no está sujeto a escisión enzimática, lo que hace que el producto de química clic sea altamente estable en sistemas biológicos. Aunque el catalizador de cobre es tóxico para las células vivas, la reacción química de clic a base de cobre se puede utilizar *in vitro* para la formación de inmunoconjungados.

20 [0110] Se ha propuesto una reacción de clic sin cobre para la modificación covalente de biomoléculas. (Ver, por ejemplo, Agard et al., 2004, J Am Chem Soc 126:15046-47.) La reacción sin cobre utiliza tensión de anillo en lugar del catalizador de cobre para promover una reacción de cicloadición de [3 + 2] azida-alquino. (*Id.*) Por ejemplo, el ciclooctino es una estructura de anillo de 8 carbonos que comprende un enlace alquino interno. La estructura de anillo cerrado induce una deformación sustancial del ángulo de enlace del acetileno, que es altamente reactivo con los 25 grupos azida para formar un triazol. Por tanto, los derivados de ciclooctina se pueden utilizar para reacciones de clic sin cobre (*Id.*).

25 [0111] Ning et al. informaron de otro tipo de reacción de clic sin cobre. (2010, Angew Chem Int Ed 49:3065-68), que implica cicloadición de alquino-nitrona promovida por cepa. Para abordar la lenta velocidad de la reacción del ciclooctino original, se unen grupos aceptores de electrones adyacentes al triple enlace (*Id.*). Ejemplos de tales 30 ciclooctinos sustituidos incluyen ciclooctinos difluorados, 4-dibenzociclooctinol y azaciclooctino (*Id.*). Una reacción alternativa sin cobre implicó cicloadición de aquino-nitrona promovida por cepa para dar isoxazolinas N-alquiladas (*Id.*). Se informó que la reacción tenía una cinética de reacción excepcionalmente rápida y se usó en un protocolo de tres pasos en un solo recipiente para la modificación específica del sitio de péptidos y proteínas (*Id.*) Las nitronas se 35 prepararon mediante la condensación de aldehídos apropiados con *N*-metilhidroxilamina y la reacción de cicloadición tuvo lugar en una mezcla de acetonitrilo y agua (*Id.*). Estas y otras reacciones químicas de clic conocidas pueden usarse para unir restos quelantes o fármacos a anticuerpos *in vitro*.

Métodos de tratamiento terapéutico

40 [0112] La invención, tal como se define en las reivindicaciones, se refiere al uso de un anticuerpo humano RS7 anti-Trop-2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con SN-38 mediante el enlazador CL2A y de un anticuerpo de mucina anticáncer pancreático PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con ⁹⁰Y para su uso en métodos de tratamiento del cáncer de páncreas en un sujeto, que comprende administrar el anticuerpo 45 anti-Trop-2 RS7 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con SN-38 mediante el enlazador CL2A y el anticuerpo mucina anti-cáncer de páncreas PAM4. o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con ⁹⁰Y.

50 [0113] Los inmunoconjungados se pueden complementar con la administración, ya sea concurrente o secuencialmente, de al menos otro agente terapéutico. Las terapias multimodales pueden incluir terapia con otros anticuerpos, como anti-CD22, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD74, anti-CD80, anti-CD23, anti-CD45, anti-CD46, anti-MIF, anticuerpos anti-EGP-1, anti-CEACAM5, anti-CEACAM6, mucina anticáncer de páncreas, anti-IGF-1R o anti-HLA-DR (incluida la cadena invariante) en forma de anticuerpos desnudos, proteínas de fusión o como inmunoconjungados. Los expertos en la técnica conocen diversos anticuerpos de uso, tales como anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD22. Véase, por ejemplo, Ghetie et al., Cancer Res. 48:2610 (1988); Hekman y col., Cancer Immunol. Immunother. 32:364 (1991); Longo, Curr. Opin. Oncol. 8:353 (1996), Patentes de EE.UU. N°s 5.798.554; 55 6.187.287; 6.306.393; 6.676.924; 7.109.304; 7.151.164; 7.230.084; 7.230.085; 7.238.785; 7.238.786; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.612.180; 7.501.498.

60 [0114] En una forma de realización no limitante de la invención como se define en las reivindicaciones, la presente invención contempla el tratamiento con el anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con SN-38 mediante el enlazador CL2A y el anticuerpo PAM4 mucina contra el cáncer de páncreas o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con ⁹⁰Y antes, en combinación con o después de otros 65 anticuerpos asociados al tumor pancreático tales como CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, anticuerpos anti-Le^a y anticuerpos contra otros antígenos de Lewis (p. ej., Le(y)), así como anticuerpos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA o CEACAM5), CEACAM6, antígeno p específico del colon (CSAp), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, HLA-DR, CD40, CD74, CD138, HER2/neu, EGFR, EGP-1, EGP-2, factores de

angiogénesis (p. ej., VEGF, PIGF), factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de plaquetas e IL-6, así como productos de oncogenes (p. ej., bcl-2, Kras, p53), cMET y anticuerpos contra la necrosis tumoral. sustancias. Estos anticuerpos de tumores sólidos pueden estar desnudos o conjugados, entre otros, con fármacos, toxinas, isótopos, radionúclidos o inmunomoduladores. Se pueden construir y utilizar muchas combinaciones de anticuerpos diferentes, ya sea en forma desnuda o conjugada. Alternativamente, se pueden emplear diferentes combinaciones de anticuerpos para la administración en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como un fármaco citotóxico o con radiación, administradas de forma consecutiva, simultánea o secuencial.

[0115] En otra forma de terapia multimodal, los sujetos reciben inmunoconjugados junto con quimioterapia contra el cáncer estándar. Por ejemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200 a 400 mg/m² de etopósido y 150 a 200 mg/m² de carmustina) es un régimen que se utiliza para tratar el linfoma no Hodgkin. Patti et al., Eur. J. Haematol. 51: 18 (1993). Otros regímenes quimioterapéuticos combinados adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas", en CANCER MEDICINE, VOLUMEN 2, 3^a edición, Holland et al. (eds.), páginas 2028-2068 (Lea y Febiger 1993). A modo de ilustración, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento del linfoma no Hodgkin (LNH) de grado intermedio incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazina y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico útil de segunda generación es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), mientras que un régimen adecuado de tercera generación es MACOP-B (metotrexato, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Otros fármacos útiles incluyen butirato de fenilo, bendamustina y briostatina-1.

[0116] En una terapia multimodal preferida, tanto los fármacos quimioterapéuticos como las citoquinas se coadministran con un anticuerpo o inmunoconjunto. Las citocinas, los fármacos quimioterapéuticos y los anticuerpos o inmunoconjuntos se pueden administrar en cualquier orden o juntos.

[0117] Los inmunoconjuntos se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante las cuales el inmunoconjunto se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 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.

[0118] El inmunoconjunto de la presente invención usado de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones puede formularse para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se infunde durante un período de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, durante un período de menos de aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25 a 50 mg se podrían infundir en 30 minutos, preferiblemente incluso 15 minutos, y el resto se podría infundir durante las siguientes 2 a 3 horas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0119] Se pueden emplear métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción del conjugado terapéutico. Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber el inmunoconjunto. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de polí(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 velocidad de liberación de un inmunoconjunto o anticuerpo de dicha matriz depende del peso molecular del inmunoconjunto o anticuerpo, la cantidad de inmunoconjunto o anticuerpo dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman y col., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood et al., *supra*. Otras formas de dosificación sólidas se describen en Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5.^a edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18.^a edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de los mismos.

[0120] El inmunoconjunto usado de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones también puede administrarse a un mamífero por vía subcutánea o incluso por otras vías parenterales. Además, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante bolos únicos o múltiples. Preferiblemente, el anticuerpo se infunde durante un período de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, durante un período de menos de aproximadamente 3 horas.

[0121] Más generalmente, la dosis de un inmunoconjunto administrado de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones para humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo,

la condición médica general y el historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoconjuguado, proteína de fusión de anticuerpos, que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 25 mg/kg como una única infusión intravenosa, 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 mg, o de 41 a 824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis se puede repetir según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante 4 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.

[0122] Alternativamente, se puede administrar un anticuerpo como una dosis cada 2 o 3 semanas, repetida hasta un total de al menos 3 dosis. O bien, los anticuerpos se pueden administrar dos veces por semana durante 4 a 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, se puede reducir la pauta posológica, es decir, cada 2 o 3 semanas durante 2 o 3 meses. Sin embargo, se ha determinado que se pueden administrar dosis incluso más altas, como 20 mg/kg una vez a la semana o una vez cada 2-3 semanas mediante infusión intravenosa lenta, para ciclos de dosificación repetidos. Opcionalmente, el programa de dosificación se puede repetir en otros intervalos y la dosis se puede administrar a través de varias vías parenterales, con el ajuste apropiado de la dosis y el programa.

[0123] De acuerdo con la divulgación instantánea, los anticuerpos divulgados son útiles para la terapia del cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o neoplasias malignas linfoides. A continuación se indican ejemplos más particulares de tales cánceres e incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, 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 riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cáncer de cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto distintos del sitio de la malignidad o tumor original) y células malignas o tumores secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de metástasis, la migración de células malignas o tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

[0124] Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, entre otros: leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma suprarrenocortical, cáncer hepatocelular (primario) en adultos, cáncer de hígado (primario) en adultos, leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, Leucemia linfocítica en adultos, Linfoma no Hodgkin en adultos, cáncer primario de hígado en adultos, sarcoma de tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de pelvis renal y uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular (primario) infantil, cáncer de hígado (primario) infantil, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores extracraneales de células germinales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de las vías visuales infantiles, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer primario de hígado infantil, rabdomiosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de las vías visuales infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma endocrino de células de los islotes de páncreas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, 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 ocular, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carciñoide 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 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, labio y cáncer de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer escamoso primario oculto metastásico de cuello, cáncer escamoso primario metastásico de cuello, cáncer escamoso primario metastásico de cuello, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma,

linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer escamoso de cuello metastásico primario oculto, cáncer de orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas,

5 paraproteinemias, policitemia vera, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor pituitario, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer primario de hígado, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y de uréter, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcomas de sarcoidosis, síndrome de Sézary, 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

10 pineales primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréter, cáncer de pelvis renal y de uréter de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y de pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, glioma de las vías visuales y hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms, y

15 cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

[0125] Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar 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 sospechadas de progresión previa a neoplasia o cáncer, en particular, donde se ha producido un crecimiento de células no neoplásicas que consiste en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de dichas condiciones de crecimiento anormal, ver Robbins y Angell, Basic Pathology, 2^a ed., WB Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79 (1976)).

[0126] La displasia es frecuentemente un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios. Es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de las células. La displasia ocurre característicamente cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que pueden tratarse incluyen, entre otros, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia auriculodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia 30 ectodérmica congénita, displasia craneofacialisaria, displasia craneocarpotarsiana, displasia craneometafisaria, displasia dentinaria, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimelia, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia faciodigitogenital, displasia fibrosa familiar de mandíbulas, displasia de pliegue blanco familiar, displasia fibromuscular, displasia fibrosa del hueso, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, 35 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 oftalmomandibulomelica, displasia cementaria periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia espondiloepifisaria pseudoacondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y 40 displasia ventricular radial.

[0127] Los trastornos preneoplásicos adicionales que pueden tratarse incluyen, entre otros, trastornos disprólerativos benignos (por ejemplo, tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, piel de granjero, queilitis solar y queratosis solar.

[0128] En formas de realización preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, la invención se usa para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres.

[0129] Enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas adicionales incluyen, entre otras, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), 55 mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas 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, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de 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.

Otros agentes terapéuticos

- [0130] De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, se puede administrar una amplia variedad de reactivos terapéuticos adicionales de forma concurrente o secuencial, o conjugados ventajosamente con los anticuerpos de la invención, por ejemplo, fármacos, toxinas, oligonucleótidos, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas hormonales, enzimas, inhibidores de enzimas, radionúclidos, inhibidores de la angiogénesis, etc. Los agentes terapéuticos citados en este documento son aquellos agentes que también son útiles para la administración por separado con un anticuerpo como se describe anteriormente. Los agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como alcaloides de la vinca, antraciclinas, gencitabina, epipodofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, SN-38, inhibidores de la COX-2, antimitóticos, agentes antiangiogénicos y proapoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos, inhibidores de proteosomas, inhibidores de mTOR, inhibidores de HDAC, inhibidores de tirosina quinasa y otros. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer útiles para administrar de forma concurrente o secuencial, o para la preparación de inmunoconjungados y proteínas de fusión de anticuerpos incluyen mostazas nitrogenadas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos del ácido fólico, inhibidores de la COX-2, antimetabolitos, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, inhibidores de mTOR, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de proteosoma, inhibidores de HDAC, camptotecinas, hormonas y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7^a Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como ediciones revisadas de estas publicaciones. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como fármacos experimentales.
- [0131] En una forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados de camptotecinas y compuestos relacionados, tales como SN-38, pueden conjugarse con hPAM4 u otros anticuerpos contra el cáncer de páncreas, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. Nº de serie 12/026.811, presentada el 6 de febrero de 2008; y 11/388.032, presentada el 23 de marzo de 2006. En otra forma de realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la gencitabina se administra al sujeto junto con ⁹⁰Y-hPAM4 y/o SN-38-hRS7.
- [0132] Una toxina puede ser de origen animal, vegetal o microbiano. Una toxina, tal como la exotoxina de Pseudomonas, también puede formar complejo o formar la porción de agente terapéutico de un inmunoconjungado de los anticuerpos. Otras toxinas adecuadamente empleadas en la preparación de tales conjugados u otras proteínas de fusión incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antiviral de hierba carmín, onconasa, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), Goldenberg, CA - A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994), Sharkey y Goldenberg, CA - A Cancer Journal for Clinicians 56:226 (2006). Los expertos en la técnica conocen toxinas adicionales adecuadas para su uso y se describen en las patentes de EE.UU. nº 6.077.499.
- [0133] Un inmunomodulador, tal como una citoquina, también puede conjugarse con, o formar la porción de agente terapéutico del inmunoconjungado, o puede administrarse con, pero sin conjugar, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "inmunomodulador" incluye una citoquina, una linfocina, una monocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona fólico estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroideas (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, un crecimiento transformador (TGF), TGF-α, TGF-β, factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), eritropoyetina, trombopoietina, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-α, TNF-β, una sustancia inhibidora de Müller, gonadotropina de ratón péptido asociado, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, interleucina (IL), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-α, interferón-β, interferón-γ, factor S1, IL-1, IL-1cc, 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 e IL-25, LIF, kit-ligando, FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina y LT, y similares.
- [0134] El inmunoconjungado puede comprender uno o más isótopos radiactivos útiles para tratar tejido enfermo. Los radionucleidos terapéuticos particularmente útiles incluyen, entre otros, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁴²Pr, ¹⁵³Sm, Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au y ²¹¹Pb. El radionucleido terapéutico tiene preferentemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferentemente en el intervalo de 60 a 200 keV para un emisor Auger, de 100 a 2.500 keV para un emisor beta y de 4.000 a 6.000 keV para un emisor alfa. Las energías máximas de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferentemente de 20 a 5.000 keV, más preferentemente de 100 a 4.000 keV y lo más preferentemente de 500 a 2.500 keV. También se prefieren los radionucleidos que se desintegran sustancialmente con partículas emisoras de Auger. Por ejemplo,

Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Las energías de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferentemente <1.000 keV, más preferentemente <100 keV y lo más preferentemente <70 keV. También se prefieren radionucleidos 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 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionucleidos emisores de partículas alfa útiles son preferentemente de 2.000 a 10.000 keV, más preferentemente de 3.000 a 8.000 keV y lo más preferentemente de 4.000 a 7.000 keV.

[0135] Por ejemplo, el ⁶⁷Cu, considerado uno de los radioisótopos más prometedores para la radioinmunoterapia debido a su vida media de 61,5 horas y su abundante suministro de partículas beta y rayos gamma, puede conjugarse con un anticuerpo utilizando el agente quelante, ácido p-bromoacetamido-bencil-tetraetilaminotetraacético (TETA). Chase, supra. Alternativamente, ⁹⁰Y, que emite una partícula beta energética, puede acoplarse a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión, usando ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), o más preferiblemente usando DOTA. Los métodos para conjugar ⁹⁰Y con anticuerpos o construcciones dirigibles se conocen en la técnica y se puede utilizar cualquiera de dichos métodos conocidos. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 7.259.249. Véase también Lindén et al., Clin Cancer Res. 11:5215-22, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 46:620-33, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 44:2000-18, 2003).

[0136] Radioisótopos terapéuticos potenciales adicionales incluyen ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ²²⁴Ac, ¹²⁶I, ¹³³I, ⁷⁷Br, ^{113m}In, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ^{121m}Te, ^{125m}Te, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁹⁹Au, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, ¹⁶⁹Yb y similares.

[0137] En otra forma de realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se puede usar un radiosensibilizador en combinación con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo desnudo o conjugado. Por ejemplo, el radiosensibilizador se puede utilizar en combinación con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado. La adición del radiosensibilizador puede dar como resultado una eficacia mejorada en comparación con el tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado solo. Los radiosensibilizadores se describen en DM Goldenberg (ed.), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press (1995). Otros radiosensibilizadores típicos de interés para su uso con esta tecnología incluyen gencitabina, 5-fluorouracilo y cisplatino, y se han utilizado en combinación con irradiación externa en la terapia de diversos cánceres, incluido el cáncer de páncreas. Por lo tanto, hemos estudiado la combinación de gencitabina en lo que se cree que son dosis radiosensibilizantes (200 mg/m² una vez a la semana durante 4 semanas) de gencitabina combinada con dosis fraccionadas de ⁹⁰Y-hPAM4, y hemos observado evidencia objetiva de reducción del cáncer de páncreas después de un ciclo único de esta combinación que demostró ser bien tolerado (sin toxicidades de grado 3-4 según el estándar NCI-CTC v. 3).

[0138] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen un portador cargado con un añadido de boro para la terapia de activación de neutrones térmicos normalmente se verán afectados de manera similar. Sin embargo, será ventajoso esperar hasta que el inmunoconjunto no objetivo se aclare antes de realizar la irradiación con neutrones. La eliminación se puede acelerar utilizando un anticuerpo antiidiotípico que se une al anticuerpo anticáncer de páncreas. Véase la patente de EE.UU. 4.624.846 para una descripción de este principio general. Por ejemplo, se pueden unir sumandos de boro, como los carboranos, a anticuerpos. Los carboranos se pueden preparar con funciones carboxilo en cadenas laterales colgantes, como es bien conocido en la técnica. La unión de los carboranos a un vehículo, como el aminodextrano, se puede lograr mediante la activación de los grupos carboxilo de los carboranos y la condensación con aminas en el vehículo. Luego, el conjugado intermedio se conjuga con el anticuerpo. Despues de la administración del conjugado de anticuerpo, se activa un sumando de boro mediante irradiación de neutrones térmicos y se convierte en átomos radiactivos que se desintegran mediante emisión alfa para producir efectos altamente tóxicos de corto alcance.

50 Excipientes farmacéuticamente adecuados

[0139] Los anticuerpos, fragmentos de los mismos o inmunoconjungados que se administrarán a un sujeto pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente adecuados, uno o más ingredientes adicionales o alguna combinación de estos. El anticuerpo se puede formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante las cuales el inmunoconjunto se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 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.

[0140] El inmunoconjunto se puede formular para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de

formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

5 Kits

[0141] La presente divulgación también se refiere a kits que pueden contener componentes adecuados para tratar o diagnosticar tejido enfermo en un paciente. Los kits ejemplares pueden contener al menos un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína de fusión como se describe en el presente documento. Si la composición que contiene componentes para administración no está formulada para administración a través del tubo digestivo, tal como 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 tales como administración parenteral, es una jeringa que se usa para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También se pueden utilizar dispositivos de inhalación. En determinadas formas de realización, se puede proporcionar un anticuerpo contra el cáncer de páncreas o un fragmento de unión a antígeno del mismo en forma de una jeringa precargada o una pluma de autoinyección que contiene una formulación líquida estéril o una preparación liofilizada de anticuerpo (p. ej., Kivitz et al., Clin. Ther. 2006, 28:1619-29).

[0142] Los componentes del kit pueden empaquetarse juntos o separarse en dos o más recipientes. En algunas formas de realización, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles de una composición que son adecuadas para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que pueden usarse incluyen, entre otros, una bolsa, bandeja, caja, tubo o similares. Los componentes del kit se pueden empaquetar y mantener de forma estéril dentro de los recipientes. Otro componente que se puede incluir son las instrucciones de uso del kit.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Terapia de un paciente con carcinoma de páncreas metastásico e inoperable

[0143] El anticuerpo PAM4 humanizado (hPAM4) se preparó y se marcó radioactivamente como se describe en la patente de EE.UU. nº 7.282.567. El paciente 118-001, CWG, era un hombre de 63 años con adenocarcinoma de páncreas en estadio IV con múltiples metástasis hepáticas, diagnosticado en noviembre de 2007. Aceptó someterse a radioinmunoterapia combinada y quimioterapia con gemcitabina como primera estrategia de tratamiento, y luego fue recibió un primer ciclo de terapia de 6,5 mCi/m² de ⁹⁰Y-hPAM4, combinado con 200 mg/m² de gemcitabina, donde la gemcitabina se administró una vez a la semana en las semanas 1 a 4 y ⁹⁰Y-hPAM4 se administró una vez a la semana en las semanas 2 a 4 (3 dosis). Dos meses después, se repitió el mismo ciclo de terapia, porque no se observaron toxicidades importantes después del primer ciclo. Ya 4 semanas después del primer ciclo de tratamiento, sorprendentemente se observó evidencia por TC de una reducción en los diámetros del tumor primario y 2 de las 3 metástasis hepáticas, y esto fue consistente con disminuciones significativas en los valores SUV de las exploraciones con FDG-PET, con 3 de los 4 tumores volvieron a los niveles de SUV de fondo normales en este momento (**FIG. 1** y **FIG. 2**). El nivel de CA-19.9 previo a la terapia del paciente de 1297 cayó a un nivel bajo de 77, lo que respalda aún más la eficacia de la terapia. La **Tabla 1** muestra los efectos de la radioinmunoterapia combinada con ⁹⁰Y-hPAM4 y quimioterapia con gemcitabina en este paciente. Fue sorprendente e inesperado que dosis tan bajas del radionúclido conjugado con el anticuerpo combinadas con dosis tan bajas y no tóxicas de gemcitabina mostraran tal actividad antitumoral incluso después de un solo ciclo de esta terapia.

Tabla 1. Efectos de la radioinmunoterapia combinada con ⁹⁰Y-hPAM4 y quimioterapia con gemcitabina en el carcinoma de páncreas metastásico

Ubicación del tumor	Diámetro más largo de línea base (cm)	Diámetro más largo 4 sem. después del tratamiento (cm)	PET de referencia (SUV)	4 semanas después del tratamiento PET (SUV)
Cola pancreática (primaria)	4,5	4,3	9,2	4,2
L hepática reunida	1,9	1,9	4,1	fondo
R post hepático conocido	1,7	1,6	3,7	fondo
R hepática central reunida	1,9	1,2	3,2	fondo

Ejemplo 2. Terapia de xenoinjertos de cáncer de páncreas con gemcitabina y péptido marcado con ⁹⁰Y dirigido previamente utilizando TF10

65 Resumen

[0144] Actualmente se está examinando ^{90}Y -hPAM4 IgG en ensayos de fase I/II en combinación con gemcitabina en pacientes con cáncer de páncreas en estadio III/IV. Divulgamos un nuevo enfoque para la orientación previa de radionúclidos que es capaz de administrar una cantidad similar de radiactividad a los xenoinjertos de cáncer de páncreas, pero con menos toxicidad hematológica, lo que sería más adecuado para su combinación con gemcitabina. El anticuerpo biespecífico TF10 se preparó mediante la técnica DNL como se describe a continuación. A ratones desnudos con $\sim 0,4 \text{ cm}^3$ sc de cáncer de páncreas humano CaPan1 se les administró TF10, seguido 1 día después con un péptido hapteno marcado con ^{90}Y (IMP-288). A este tratamiento se agregaron varias dosis y esquemas de gemcitabina y se monitoreó la progresión del tumor hasta 28 semanas. 0,7 mCi de PT-RAIT solo produjo solo una pérdida transitoria del 60 % en los recuentos sanguíneos, y los animales que recibieron 0,9 mCi de PT-RAIT solo y 0,7 mCi de PT-RAIT + 6 mg de gemcitabina (equivalente humano $\sim 1000 \text{ mg/m}^2$) no tuvieron evidencia histológica de toxicidad renal después de 9 meses. Una dosis única de 0,25 o 0,5 mCi de PT-RAIT sola puede eliminar completamente el 20% y el 80% de los tumores, respectivamente. PT-RAIT fraccionado mensual (0,25 mCi/dosis administrada al inicio de cada ciclo de gemcitabina) agregado a un régimen estándar de gemcitabina (6 mg semanales x 3; 1 semana de descanso; repetir 3 veces) aumentó significativamente el tiempo medio para que los tumores alcanzaran $3,0 \text{ cm}^3$ sobre PT-RAIT solo. Otros planes de tratamiento que examinaron regímenes de dosis de radiosensibilización no citotóxica de gemcitabina agregada a PT-RAIT también mostraron mejoras significativas en la respuesta al tratamiento con respecto a PT-RAIT solo. Los resultados muestran que PT-RAIT es un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer de páncreas. Estos datos indican que la combinación de PT-RAIT con gemcitabina mejorará las respuestas terapéuticas.

Métodos

[0145] Se preparó el anticuerpo biespecífico TF10 como se describe a continuación. Para la orientación previa, se administró TF10 a ratones desnudos que portaban la línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano, CaPan1. Después de dejar tiempo suficiente para que TF10 se eliminara de la sangre (16 h), se administró el péptido HSG divalente radiomarcado. El péptido HSG de pequeño peso molecular ($\sim 1,4 \text{ kD}$) se elimina de la sangre en cuestión de minutos y entra en el espacio extravascular donde puede unirse al brazo anti-HSG del bsMAb TF10 predirigido. En unas pocas horas, $>80\%$ del péptido HSG radiomarcado se excreta en la orina, dejando el péptido localizado en el tumor y una pequeña cantidad en los tejidos normales.

Resultados

[0146] FIG. 3 ilustra la actividad terapéutica derivada de un único tratamiento de tumores CaPan1 establecidos ($\sim 0,4 \text{ cm}^3$) con 0,15 mCi de ^{90}Y -hPAM4 IgG, o 0,25 o 0,50 mCi de ^{90}Y -IMP-288 predirigido a TF10. Se observó una actividad antitumoral similar para la dosis predirigida de 0,5 μCi frente a la dosis de 0,15 mCi de la IgG directamente radiomarcada, pero la toxicidad hematológica fue grave a este nivel del conjugado directo (no se muestra), mientras que la dosis predirigida fue sólo moderadamente tóxica (no mostrada). De hecho, la MTD para la orientación previa con ^{90}Y -IMP-288 es de al menos 0,9 mCi en ratones desnudos.

[0147] FIG. 4 muestra que la combinación de gemcitabina y PT-RAIT tiene un efecto sinérgico en la terapia antitumoral. Se administraron dosis equivalentes humanas de 1000 mg/m^2 (6 mg) de gemcitabina (GEM) por vía intraperitoneal a ratones semanalmente durante 3 semanas y luego, después de descansar durante 1 semana, este régimen se repitió 2 veces. Se administró PT-RAIT (0,25 μCi de ^{90}Y -IMP-288 predirigido a TF10) 1 día después de la primera dosis de GEM en cada uno de los 3 ciclos de tratamiento. GEM por sí solo no tuvo un impacto significativo en la progresión del tumor (supervivencia basada en el tiempo para progresar a $3,0 \text{ cm}^3$). PT-RAIT solo mejoró la supervivencia en comparación con los animales no tratados, pero el régimen combinado de GEM con PT-RAIT aumentó la supervivencia media en casi 10 semanas. Debido a que la toxicidad hematológica no limita la dosis de PT-RAIT, pero es una de las limitaciones de la terapia con gemcitabina, estos estudios sugieren que PT-RAIT podría agregarse a una terapia GEM estándar con el potencial de mejorar las respuestas. El importante efecto sinérgico de gemcitabina más PT-RAIT fue sorprendente e inesperado.

[0148] Un estudio adicional examinó el efecto del momento de administración sobre la potenciación del efecto antitumoral de gemcitabina más PT-RAIT. Se administró una dosis única de 6 mg de GEM un día antes o 1 día después de 0,25 mCi de ^{90}Y -IMP-288 predirigido a TF 10 (no se muestra). Este estudio confirmó lo que ya se sabe con GEM, es decir, que es mejor realizar la radiosensibilización antes de la radiación. El porcentaje de supervivencia de los ratones tratados mostró poca diferencia en el tiempo de supervivencia entre PT-RAIT solo y PT-RAIT con gemcitabina administrada 22 horas después del péptido radiomarcado. Sin embargo, la administración de gemcitabina 19 horas antes del PT-RAIT resultó en un aumento sustancial de la supervivencia (no mostrado).

[0149] Una dosis única de PT-RAIT (0,25 mCi) combinada con cetuximab (1 mg semanal ip; 7 semanas) o con cetuximab + GEM (6 mg semanalmente x 3) en animales portadores de CaPan1 mostró la combinación GEM + cetuximab con PT-RAIT proporcionando una mejor respuesta inicial (FIG. 5), pero la respuesta asociada solo con cetuximab solo agregado a PT-RAIT fue aleatoria (FIG. 5), ya que fue tan buena o mejor que PT-RAIT + GEM. Debido a que la supervivencia general en este estudio fue excelente, con sólo 2 tumores en cada grupo progresaron

a >2,0 cm³ después de 24 semanas cuando finalizó el estudio, estos resultados indican un papel potencial para cetuximab cuando se agrega a PT-RAIT.

Ejemplo 3. Efecto de la radioinmunoterapia fraccionada predirigida (PT-RAIT) para la terapia del cáncer de páncreas

[0150] Evaluamos la terapia fraccionada con péptido ⁹⁰Y-DOTA-di-HSG (IMP-288) y TF10. Se realizaron estudios utilizando TF10 e IMP-288 radiomarcado en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano sc CaPan1, 0,32-0,54 cm³. Para la terapia, se administró ⁹⁰Y-IMP-288 predirigido a TF10 [A] una vez (0,6 mCi en la semana 0) o [B] fraccionado (0,3 mCi en las semanas 0 y 1), [C] (0,2 mCi en las semanas 0, 1 y 2) o [D] (0,2 mCi en las semanas 0, 1 y 4).

[0151] Se observó regresión tumoral (>90%) en la mayoría de los ratones, 9/10, 10/10, 9/10 y 8/10 en los grupos [A], [B], [C] y [D], respectivamente. En el grupo [A], la regresión tumoral máxima en el 50 % de los ratones se alcanzó a las 3,7 semanas, en comparación con 6,1, 8,1 y 7,1 semanas en [B], [C] y [D], respectivamente. Algunos tumores mostraron un nuevo crecimiento. En la semana 14, la mejor respuesta terapéutica se observó en el grupo fraccionado (2x0,3 mCi), con 6/10 ratones sin tumores (NT) en comparación con 3/10 en los grupos de 3x0,2 mCi y 1/10 en el grupo 1x 0,6 mCi. No se observó ninguna pérdida importante de peso corporal. PT-RAIT fraccionado proporciona otra alternativa para el tratamiento del cáncer de páncreas con una toxicidad mínima.

Ejemplo 4. Tratamiento con radioinmunoterapia (RAIT) ⁹⁰Y-hPAM4 más gemcitabina radiosensibilizante (GEM) en cáncer de páncreas (PC) avanzado

[0152] ⁹⁰Y-hPAM4, un anticuerpo humanizado altamente específico para PC, mostró actividad transitoria en pacientes con enfermedad avanzada y RAIT potenciado por GEM en estudios preclínicos. Este estudio evaluó ciclos de tratamiento repetidos de ⁹⁰Y-hPAM4 más GEM en pacientes con PC irresecable y no tratada. La dosis de ⁹⁰Y se incrementó por cohorte, y los pacientes repitieron ciclos de 4 semanas (200 mg/m² de GEM una vez a la semana, ⁹⁰Y-hPAM4 una vez a la semana durante las semanas 2 a 4) hasta progresión o toxicidad inaceptable. Las evaluaciones de respuesta utilizaron niveles séricos de CT, FDG-PET y CA19.9.

[0153] De 8 pacientes (3F/5M, 56-72 años) con los primeros 2 niveles de dosis (6,5 y 9,0 mCi/m² ⁹⁰Y-hPAM4 x 3), la toxicidad hematológica ha sido transitoria de Grado 1-2. Dos pacientes respondieron al tratamiento inicial con descensos de FDG SUV y CA19.9 y regresión de la lesión mediante TC. Ambos pacientes continúan en buen estado funcional ahora después de 9 y 11 meses, y después de un total de 3 y 4 ciclos, respectivamente, sin toxicidad adicional. Un tercer paciente con una respuesta estable mediante PET y CT y descensos en los niveles de CA19.9 después del tratamiento inicial se encuentra ahora en un segundo ciclo. Otros cuatro pacientes tuvieron una progresión temprana de la enfermedad y el paciente restante aún está siendo evaluado. El aumento de la dosis continúa después de que RAIT fraccionado con ⁹⁰Y-hPAM4 más dosis bajas de gemcitabina demostró actividad terapéutica en los niveles iniciales de dosis de ⁹⁰Y, con toxicidad hematológica mínima, incluso después de 4 ciclos de terapia.

Ejemplo 5. El anticuerpo PAM4 se une a las primeras etapas del cáncer de páncreas

[0154] Se realizaron estudios de inmunohistoquímica con el anticuerpo PAM4. Los resultados obtenidos con secciones de tejido teñidas no mostraron reacción de PAM4 con conductos y tejidos acinares pancreáticos normales (no se muestran). Por el contrario, el uso del anticuerpo MAS aplicado a las mismas muestras de tejido mostró una tinción positiva difusa de los conductos pancreáticos normales y del tejido acinar (no mostrado). En secciones de tejido con adenocarcinoma de páncreas bien diferenciado o moderadamente diferenciado, la tinción con PAM4 fue positiva, con tinción principalmente citoplasmática, pero intensificación en la superficie celular. El tejido pancreático normal en las mismas secciones de tejido no estaba teñido.

[0155] La Tabla 2 muestra los resultados del análisis inmunohistoquímico con PAM4 MAb en muestras de adenocarcinoma de páncreas de diversas etapas de diferenciación. En general, hubo una tasa de detección del 87 % para todas las muestras de cáncer de páncreas, con un 100 % de detección de cánceres de páncreas bien diferenciados y casi un 90 % de detección de cánceres de páncreas moderadamente diferenciados.

Tabla 2. Unión de PAM4 a diferentes estadios del cáncer de páncreas

Cáncer	n	Focal	Difuso	Total
Bien dif.	13	2	11	13 (100%)
Moderadamente dif.	24	6	15	21 (88%)
Mal dif.	18	5	9	14 (78%)
Total	55	13	35	48 (87%)

[0156] La Tabla 3 muestra que la tinción inmunohistoquímica con PAM4 también detectó un porcentaje muy alto de lesiones precursoras de cáncer de páncreas, incluyendo PanIN-1A a PanIN-3, IPMN (neoplasias mucinosas papilares intraductales) y MCN (neoplasias quísticas mucinosas). En general, la tinción con PAM4 detectó el 89% de todas las lesiones precursoras pancreáticas. Estos resultados demuestran que la inmunodetección basada en anticuerpos PAM4 es capaz de detectar casi el 90% de los cánceres de páncreas y lesiones precursoras mediante análisis *in vitro*. La expresión de PAM4 se observó en las primeras fases del desarrollo de PanIN. Se observó tinción intensa en muestras de IPMN y MCN (no se muestran). El epítopo PAM4 estuvo presente en altas concentraciones (tinción intensa y difusa) en la gran mayoría de los adenocarcinomas de páncreas. PAM4 mostró una reactividad intensa y difusa con las primeras etapas de las lesiones precursoras del carcinoma de páncreas, incluidas PanIN-1, IPMN y MCN, pero no reaccionó con el tejido pancreático normal. En conjunto, estos resultados muestran que el anticuerpo PAM4 se une con una especificidad muy alta a las primeras etapas del desarrollo del cáncer de páncreas.

Tabla 3. Bandas de PAM4 en lesiones precursoras del cáncer de páncreas

	n	Focal	Difuso	Total
PanIn-1A	27	9	15	24 (89%)
PanIn-1B	20	4	16	20 (100%)
PanIn-2	11	6	4	10 (91%)
PanIn-3	5	2	0	2 (40%)
PanIn total	63	21	35	56 (89%)
IPMN	36	6	25	31 (86%)
MCN	27	3	22	25 (92%)

Ejemplo 6. Preparación de construcciones Dock-and-Lock (DNL)*Proteínas de fusión DDD y DA*

[0157] La técnica DNL se puede utilizar para preparar dímeros, trímeros, tetrámeros, hexámeros, etc. que comprenden prácticamente cualquier anticuerpo o fragmentos de los mismos u otros restos efectores. Para determinadas formas de realización preferidas, se pueden producir anticuerpos IgG o fragmentos de anticuerpos Fab como proteínas de fusión que contienen una secuencia de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) o de dominio de anclaje (DA). Aunque en formas de realización preferidas los restos DDD y DA se producen como proteínas de fusión, el experto en la técnica se dará cuenta de que se pueden utilizar otros métodos de conjugación, tales como entrecruzamiento químico, dentro del alcance de los métodos y composiciones reivindicados.

[0158] Se pueden formar anticuerpos biespecíficos combinando una proteína de fusión Fab-DDD de un primer anticuerpo con una proteína de fusión Fab-DA de un segundo anticuerpo. Alternativamente, se pueden preparar construcciones que combinen proteínas de fusión IgG-DA con proteínas de fusión Fab-DDD. La técnica no es limitante y cualquier proteína o péptido de uso puede producirse como una proteína de fusión DA o DDD para su incorporación en una construcción DNL. Cuando se utiliza reticulación química, los conjugados de DA y DDD no se limitan a proteínas o péptidos y pueden comprender cualquier molécula que pueda entrecruzarse con una secuencia de DA o DDD utilizando cualquier técnica de reticulación conocida en la técnica. En ciertas formas de realización ejemplares, se puede incorporar un polietilenglicol (PEG) u otro resto polimérico en una construcción de DNL, como se describe con más detalle a continuación.

[0159] Para aplicaciones de predirecciónamiento, un anticuerpo o fragmento que contiene un sitio de unión para un antígeno asociado con un tejido enfermo, tal como un antígeno asociado a tumores (TAA), se puede combinar con un segundo anticuerpo o fragmento que se une a un hapteno en una construcción dirigible, a la que se une un agente terapéutico y/o de diagnóstico. El anticuerpo biespecífico basado en DNL se administra a un sujeto, se permite que el anticuerpo circulante se elimine de la sangre y se localice en el tejido objetivo, y se añade la construcción objetivo-conjugada y se une al anticuerpo localizado para diagnóstico o terapia.

[0160] Se pueden desarrollar líneas celulares transgénicas independientes para cada proteína de fusión Fab o IgG. Una vez producidos, los módulos pueden purificarse si se desea o mantenerse en el líquido sobrenadante del cultivo celular. Después de la producción, cualquier módulo de proteína DDDfusion se puede combinar con cualquier módulo de proteína de fusión DA para generar una construcción DNL biespecífica. Para diferentes tipos de construcciones, se pueden utilizar diferentes secuencias DA o DDD. A continuación, se proporcionan secuencias DDD y DA ejemplares.

60 DDD1: SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

DDD2: CGHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)

65 AD1: QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)

AD2: CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO: 16)

5 [0161] El experto en la técnica se dará cuenta de que DDD1 y DDD2 comprenden la secuencia DDD de la forma RII α humana de la proteína quinasa A. Sin embargo, en formas de realización alternativas, los restos DDD y DA pueden basarse en la secuencia DDD de la forma RII α humana de proteína quinasa A y una secuencia AKAP correspondiente, como se ejemplifica en DDD3, DDD3C y AD3 a continuación.

10 *DDD3*
SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:17)
DDD3C
MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO: 18)
AD3
CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO: 19)

15 *Vectores de expresión*

20 [0162] El vector plasmídico pdHL2 se ha utilizado para producir varios anticuerpos y construcciones basadas en anticuerpos. Véase Gillies et al., J Immunol Methods (1989), 125:191-202; Losman y col., Cancer (Phila) (1997), 80:2660-6. El vector de expresión dicistrónico de mamíferos dirige la síntesis de las cadenas pesada y ligera de IgG. Las secuencias del vector son en su mayoría idénticas para muchas construcciones IgG-pdHL2 diferentes, existiendo las únicas diferencias en las secuencias del dominio variable (V_H y V_L). Utilizando herramientas de biología molecular conocidas por los expertos en la técnica, estos vectores de expresión de IgG se pueden convertir en vectores de expresión Fab-DDD o Fab-DA. Para generar vectores de expresión Fab-DDD, las secuencias codificantes para los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la cadena pesada se reemplazan con una secuencia que codifica los primeros 4 residuos de la bisagra, un enlazador Gly-Ser de 14 residuos y los primeros 44 residuos de RII α humana (denominada DDD1). Para generar vectores de expresión Fab-DA, las secuencias de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG se reemplazan con una secuencia que codifica los primeros 4 residuos de la bisagra, un enlazador Gly-Ser de 15 residuos y un DA sintético de 17 residuos llamado AKAP-/S (denominado AD1), que se generó utilizando bioinformática y tecnología de matriz de péptidos y demostró que se une a los dímeros RII α con una afinidad muy alta (0,4 nM). Véase Alto, et al. Proc. Nacional. Acad. Sci., EE.UU. (2003), 100:4445-50.

30 [0163] Se diseñaron dos vectores lanzadera para facilitar la conversión de vectores IgG-pdHL2 en vectores de expresión Fab-DDD1 o Fab-AD1, como se describe a continuación.

35 *Preparación de CH1*

40 [0164] El dominio CH1 se amplificó mediante PCR utilizando el vector plásmido pdHL2 como plantilla. El cebador de PCR izquierdo consistía en el extremo aguas arriba (5') del dominio CH1 y un sitio de endonucleasa de restricción SacII, que está en 5' de la secuencia codificante de CH1. El cebador derecho constaba de la secuencia que codifica los primeros 4 residuos de la bisagra (PKSC) seguida de cuatro glicinas y una serina, comprendiendo los dos codones finales (GS) un sitio de restricción Bam HI. El amplificador de PCR de 410 pb se clonó en el vector de clonación de PCR PGEMT® (PROMEGA®, Inc.) y se examinaron los clones en busca de insertos en la orientación T7 (5').

45 [0165] Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de DDD 1 precedida por residuos del péptido enlazador, comprendiendo los dos primeros codones un sitio de restricción BamHI. En el extremo 3' se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI. La secuencia polipeptídica codificada se muestra a continuación. GSGGGGGGGGGSHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)

50 [0166] Se sintetizaron y combinaron dos oligonucleótidos, denominados RIIA1-44 superior y RIIA1-44 inferior, que se superponen en 30 pares de bases en sus extremos 3', para comprender los 154 pares de bases centrales de la secuencia DDD1 de 174 pb. Los oligonucleótidos se hibridaron y se sometieron a una reacción de extensión del cebador con Taq polimerasa. Tras la extensión del cebador, el dúplex se amplificó mediante PCR. El amplificador se clonó en PGEMT® y se examinó en busca de insertos en la orientación T7 (5').

55 [0167] Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de AD1 precedida por 11 residuos del péptido enlazador, comprendiendo los dos primeros codones un sitio de restricción BamHI. En el extremo 3' se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI. La secuencia polipeptídica codificada se muestra a continuación. GSGGGGGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 21)

60 [0168] Se reasociaron dos oligonucleótidos superpuestos complementarios que codifican la secuencia peptídica anterior, denominados AKAP-IS Top y AKAP-IS Bottom. El dúplex se amplificó mediante PCR. El amplificador se clonó en el vector PGEMT® y se examinó en busca de insertos en la orientación T7 (5').

65 *Ligando DDD1 con CH1*

[0169] Un fragmento de 190 pb que codifica la secuencia DDD1 se escindió de PGEMT® con enzimas de restricción BamHI y NotI, y luego se ligaron en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector lanzadera CH1-DDD1-PGEMT®.

5

Ligando AD1 con CH1

[0170] Un fragmento de 110 pb que contenía la secuencia AD1 se escindió de PGEMT® con BamHI y NotI y luego ligado en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector lanzadera CH1-AD1-PGEMT®.

10

Clonación de CH1-DDD1 o CH1-AD1 en vectores basados en pdHL2

[0171] Con este diseño modular se puede incorporar CH1-DDD1 o CH1-AD1 en cualquier construcción de IgG en el vector pdHL2. Todo el dominio constante de la cadena pesada se reemplaza con una de las construcciones anteriores eliminando el fragmento de restricción SacII/EagI (CH1-CH3) de pdHL2 y reemplazándolo con el fragmento SacII/EagI de CH1-DDD1 o CH1-AD1, que es cortado del respectivo vector lanzadera pGemT.

Construcción de h679-Fd-AD1-pdHL2

20

[0172] h679-Fd-AD1-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de h679 Fab con AD1 acoplado al extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de Fd a través de un espaciador peptídico Gly/Ser flexible compuesto de 14 residuos de aminoácidos. Un vector basado en pdHL2 que contiene los dominios variables de h679 se convirtió en h679-Fd-AD1-pdHL2 mediante la sustitución del fragmento SacII/EagI por el fragmento CH1-AD1, que se escindió del vector lanzadera CH1-AD1-SV3 con SacII y EagI.

25

Construcción de C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2

[0173] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de un dímero estable que comprende dos copias de una proteína de fusión C-DDD1-Fab-hMN-14, en la que DDD1 está unido a hMN-14 Fab en el extremo carboxilo de CH1 mediante un espaciador peptídico flexible. El vector plásmido hMN-14(I)-pdHL2, que se ha utilizado para producir hMN-14 IgG, se convirtió en C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 mediante digestión con endonucleasas de restricción SacII y EagI para eliminar los dominios CH1-CH3 e inserción del fragmento CH1-DDD1, que se escindió del vector lanzadera CH1-DDD1-SV3 con SacII y EagI.

35

[0174] Se ha utilizado la misma técnica para producir plásmidos para la expresión Fab de una amplia variedad de anticuerpos conocidos, tales como hLL1, hLL2, hPAM4, hR1, hRS7, hMN-14, hMN-15, hA19, hA20 y muchos otros. Generalmente, las secuencias codificantes de la región variable del anticuerpo estaban presentes en un vector de expresión pdHL2 y el vector de expresión se convirtió para la producción de una proteína de fusión DA o DDD como se describió anteriormente. Las proteínas de fusión DA y DDD que comprenden un fragmento Fab de cualquiera de dichos anticuerpos se pueden combinar, en una proporción aproximada de dos proteínas de fusión DDD por una proteína de fusión DA, para generar una construcción DNL trimérica que comprende dos fragmentos Fab de un primer anticuerpo y un fragmento Fab de un segundo anticuerpo.

C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

45

[0175] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de C-DDD2-Fab-hMN-14, que posee una secuencia de dominio de dimerización y acoplamiento de DDD2 anexada al extremo carboxilo terminal de Fd de hMN-14 a través de un enlazador peptídico Gly/Ser de 14 residuos de aminoácidos. La proteína de fusión secretada está compuesta por dos copias idénticas de hMN-14 Fab unidas mediante interacción no covalente de los dominios DDD2.

50

[0176] El vector de expresión se diseñó de la siguiente manera. Se prepararon sintéticamente dos oligonucleótidos complementarios superpuestos, que comprenden la secuencia codificante de parte del péptido enlazador y los residuos 1-13 de DDD2. Los oligonucleótidos se hibridaron y fosforilaron con T4 PNK, lo que dio como resultado salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para la ligación con ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y PstI, respectivamente.

55

[0177] El ADN dúplex se ligó con el vector lanzadera CH1-DDD1-PGEMT®, que se preparó mediante digestión con BamHI y PstI, para generar el vector lanzadera CH1-DDD2-PGEMT®. Se escindió un fragmento de 507 pb de CH1-DDD2-PGEMT® con SacII y EagI y se ligó con el vector de expresión de IgG hMN-14(I)-pdHL2, que se preparó mediante digestión con SacII y EagI. La construcción de expresión final se denominó C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2. Se han utilizado técnicas similares para generar proteínas de fusión DDD2 de los fragmentos Fab de varios anticuerpos humanizados diferentes.

65

h679-Fd-AD2-pdHL2

5 [0178] h679-Fab-AD2, se diseñó para emparejarse como **B** con C-DDD2-Fab-hMN-14 como **A**. h679-Fd-AD2-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de h679-Fab-AD2, que posee una secuencia del dominio de anclaje de AD2 unida al extremo carboxilo terminal del dominio CH1 a través de un enlazador peptídico Gly/Ser de 14 residuos de aminoácidos. AD2 tiene un residuo de cisteína anterior y otro siguiente a la secuencia del dominio de anclaje de DA 1.

10 10 [0179] El vector de expresión se diseñó de la siguiente manera. Se fabricaron sintéticamente dos oligonucleótidos complementarios superpuestos (AD2 superior y AD2 inferior), que comprenden la secuencia codificante de AD2 y parte de la secuencia conectora. Los oligonucleótidos se hibridaron y fosforilaron con T4 PNK, lo que dio como resultado salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para la ligación con ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y Spel, respectivamente.

15 15 [0180] ADN dúplex se ligó en el vector lanzadera CH1-AD1-PGEMT®, que se preparó mediante digestión con BamHI y Spel, para generar el vector lanzadera CH1-AD2-PGEMT®. Un fragmento de 429 pares de bases que contenía secuencias codificantes de CH1 y AD2 se escindió del vector lanzadera con enzimas de restricción SacII y EagI y se ligó en el vector h679-pdHL2 que se preparó mediante digestión con esas mismas enzimas. El vector de expresión final es h679-Fd-AD2-pdHL2.

20 Generación de construcción TF2 DNL

25 25 [0181] Se obtuvo una construcción DNL trimérica denominada TF2 haciendo reaccionar C-DDD2-Fab-hMN-14 con h679-Fab-AD2. Se generó un lote piloto de TF2 con un rendimiento >90 % de la siguiente manera. Se mezcló C-DDD2-Fab-hMN-14 (200 mg) purificada con proteína L con h679-Fab-AD2 (60 mg) en una relación molar de 1,4:1. La concentración de proteína total fue de 1,5 mg/ml en PBS que contenía EDTA 1 mM. Los pasos posteriores incluyeron reducción de TCEP, cromatografía HIC, oxidación de DMSO y cromatografía de afinidad IMP 291. Antes de la adición de TCEP, SE-HPLC no mostró ninguna evidencia de formación de **a₂b**. La adición de TCEP 5 mM dio como resultado rápidamente la formación de un complejo **a₂b** consistente con una proteína de 157 kDa esperada para la estructura binaria. TF2 se purificó hasta casi la homogeneidad mediante cromatografía de afinidad IMP 291 (no se muestra). IMP 291 es un péptido sintético que contiene el hapteno HSG al que se une el Fab 679 (Rossi et al., 2005, Clin Cancer Res 11:7122s-29s). El análisis SE-HPLC de la fracción no unida de IMP 291 demostró la eliminación de las cadenas a₄, a₂ y kappa libres del producto (no se muestra).

30 30 [0182] La funcionalidad de TF2 se determinó mediante el ensayo BIACORE®. TF2, C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (usado como muestra de control del complejo **a₂b** no covalente), o C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (usado como muestra de control de los componentes a₂ y b no reducidos) se diluyeron a 1 µg/ml (proteína total) y se pasaron sobre un chip sensor inmovilizado con HSG. La respuesta para TF2 fue aproximadamente el doble que la de las dos muestras de control, lo que indica que solo el componente h679-Fab-DA en las muestras de control se uniría y permanecería en el chip sensor. Las inyecciones posteriores de WI2 IgG, un anticuerpo antiidiotípico para hMN-14, demostraron que solo TF2 tenía un componente DDD-Fab-hMN-14 que estaba estrechamente asociado con h679-Fab-DA como lo indica una respuesta de señal adicional. El aumento adicional de unidades de respuesta resultante de la unión de WI2 a TF2 inmovilizado en el chip sensor correspondió a dos sitios de unión completamente funcionales, cada uno de los cuales contribuyó con una subunidad de C-DDD2-Fab-hMN-14. Esto fue confirmado por la capacidad de TF2 para unirse a dos fragmentos Fab de WI2 (no mostrado).

45 45 Producción de anticuerpo biespecífico TF10

50 50 [0183] Se utilizó un protocolo similar para generar una construcción trimérica TF10 DNL, que comprende dos copias de C-DDD2-Fab-hPAM4 y una copia de C-AD2-Fab-679. El componente de anticuerpo dirigido al cáncer en TF10 se derivó de hPAM4, un MAb de mucina humanizado contra el cáncer de páncreas que se ha estudiado en detalle como un MAb radiomarcado (por ejemplo, Gold et al., Clin. Cancer Res. 13: 7380-7387, 2007). El componente de unión a hapteno se derivó de h679, un MAb antihistaminiil-succinil-glicina (HSG) humanizado. El anticuerpo biespecífico TF10 ([hPAM4]₂ x h679) se produjo usando el método descrito para la producción del bsAb TF2 (anti CEA)₂ x anti HSG, como se describió anteriormente. La construcción TF10 lleva dos Fab PAM4 humanizado y un Fab 679 humanizado.

55 55 [0184] Las dos proteínas de fusión (hPAM4-DDD y h679-AD2) se expresaron de forma independiente en células de mieloma transfectadas de forma estable. Los fluidos sobrenadantes del cultivo de tejidos se combinaron, dando como resultado un exceso molar del doble de hPAM4-DDD. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas en condiciones reductoras suaves usando glutatión reducido 1 mM. Después de la reducción, la reacción DNL se completó mediante oxidación suave usando glutatión oxidado 2 mM. TF10 se aisló mediante cromatografía de afinidad utilizando resina IMP 291-affigel, que se une con alta especificidad al Fab h679.

60 60 [0185] Se ha examinado un panel completo de histología tisular y de unión a células sanguíneas para detectar IgG hPAM4 y para un bsMAb anti-CEA x anti-HSG que está entrando en ensayos clínicos. La unión de hPAM4 se limitó a una unión muy débil a la vejiga urinaria y al estómago en 1/3 de las muestras (no se observó unión *in vivo*), y no se

atribuyó ninguna unión a tejidos normales al bsMAb antiCEA x anti-HSG. Además, los estudios *in vitro* contra líneas celulares que portan los receptores de histamina H1 y H2 no mostraron actividad antagonista o agonista con el péptido di-HSG IMP 288, y los estudios en animales en 2 especies diferentes no mostraron actividad farmacológica del péptido relacionado con el componente de histamina en dosis 20.000 veces superiores a las utilizadas para la obtención de imágenes. Por tanto, el derivado HSG-histamina no tiene actividad farmacológica.

[0186] El experto en la técnica se dará cuenta de que las técnicas de DNL descritas anteriormente se pueden usar para producir complejos que comprenden cualquier combinación de anticuerpos o inmunoconjungados, por ejemplo, un hPAM4 radiomarcado y un complejo de DNL hRS7 conjugado con SN-38.

10 Ejemplo 7. Variantes de secuencia para DNL

[0187] En ciertas formas de realización preferidas, las secuencias DA y DDD incorporadas en el complejo DNL comprenden las secuencias de aminoácidos de AD1 o AD2 y DDD1 o DDD2, como se analizó anteriormente. Sin embargo, en formas de realización alternativas, se pueden utilizar variantes de secuencia de restos DA y/o DDD en la construcción de los complejos DNL. Por ejemplo, existen sólo cuatro variantes de secuencias de PKA DDD humana, correspondientes a los restos DDD de PKA R α , R β , R γ y R δ . La secuencia R α DDD es la base de DDD1 y DDD2 descritos anteriormente. Las cuatro secuencias de PKA DDD humana se muestran a continuación. La secuencia DDD representa los residuos 1-44 de R α , 1-44 de R β , 12-61 de R γ y 13-66 de R δ . (Tenga en cuenta que la secuencia de DDD1 está ligeramente modificada con respecto al resto humano PKA R α DDD).

PKA R α

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:22)

PKA R β

SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO:23)

PKA R γ

SHIQIPPGLELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO: 24)

PKA R δ

SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO: 25)

[0188] Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD han sido objeto de investigación. (Ver, por ejemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276: 17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100:4445-50; Hundsrucker et al., 2006, Biochem J 396:297-306; Stokka et al., 2006, Biochem J 400:493-99; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24:397-408.)

[0189] Por ejemplo, Kinderman et al. (2006) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión DA-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 la SEQ ID NO:13 a continuación. (Ver Figura 1 de Kinderman et al., 2006.) El experto en la materia se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DDD, sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que se podrían realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos para los residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión de AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGFTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

[0190] Alto y col. (2003) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia DA de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia DA selectiva de RII denominada AKAP-IS (SEQ ID NO:15), 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 AKAP-IS donde las sustituciones tendieron a disminuir la unión a DDD están subrayados en SEQ ID NO:15. El experto en la técnica se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DA, sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que se podrían realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras para los residuos que son menos críticos para la unión de DDD.

Secuencia AKAP-IS

[0191] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)

[0192] Gold (2006) utilizó cristalografía y cribado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID NO:26), que muestra una selectividad cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma RII de PKA en comparación con la isoforma RI. Los residuos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos, en relación con la secuencia AKAP-IS, que aumentaron la unión al resto DDD de RII α . En esta secuencia, el residuo Q N-terminal está numerado como residuo número 4 y el residuo A C-terminal es el residuo número 20. Los residuos donde se podrían realizar sustituciones para afectar la afinidad por RII α fueron los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que, en ciertas formas de realización alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS puede sustituirse por la secuencia del resto AKAP-IS DA para preparar construcciones DNL. Otras secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia AKAP-IS DA se muestran en SEQ ID NO:27-29. Las sustituciones relativas a

la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se anticipa que, al igual que con la secuencia AD2 mostrada en SEQ ID NO:16, el resto DA también puede incluir los residuos N-terminales cisteína y glicina adicionales y los residuos C-terminales glicina y cisteína.

5 *SuperAKAP-IS*
 QIEYYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO: 26)

Secuencias AKAP alternativas

10 QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO: 27)
 QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:28)
 QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:29)

15 [0193] Figura 2 de Gold et al. reveló secuencias adicionales de unión a DDD de una variedad de proteínas AKAP, que se muestran abajo.

AKAP específicos de RII

20 [0194]
 AKAP-KL
 PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO: 30)
 AKAP79
 LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO: 31)
 AKAP-Lbc
 LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO: 32)

30 AKAP específicos de RI

[0195]
 AKAPce
 ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO: 33)
 RIAD
 LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:34)
 PV38
 FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO: 35)

40 AKAP de doble especificidad

[0196]
 AKAP 7
 ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO: 36)
 MAP2D
 TAEEV SARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO: 37)
 DAKAP1
 QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO: 38)
 DAKAP2
 LAWKIAKMIWSDVMQQ (SEQ ID NO: 39)

55 [0197] Stokka y col. (2006) también desarrollaron péptidos competidores de la unión de AKAP a PKA, mostrados en SEQ ID NO:40-42. Los antagonistas peptídicos se designaron como Ht31 (SEQ ID NO:40), RIAD (SEQ ID NO:41) y PV-38 (SEQ ID NO:42). El péptido Ht-31 mostró una mayor afinidad por la isoforma RII de PKA, mientras que el RIAD y el PV-38 mostraron una mayor afinidad por RI.

60 *Ht31*
 DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO: 40)
 RIAD
 LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO: 41)
 PV-38
 FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO: 42)

[0198] Hundsucker et al. (2006) desarrollaron otros péptidos competidores para la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM al DDD de la forma RII de PKA. Las secuencias de diversos péptidos antagonistas de AKAP se proporcionan en la Tabla 1 de Hundsucker et al., reproducida en la **Tabla 4** a continuación. AKAPIS representa un péptido de unión a subunidades RII sintético. Todos los demás péptidos se derivan de los dominios de unión a RII de las AKAP indicadas.

Tabla 4. Secuencias del péptido AKAP
Secuencia peptídica

10	AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)
	AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:43)
	Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:44)
	Ht31-P	KGADLIEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:45)
15	AKAP7 δ-wt-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:46)
	AKAP7 δ-L304T-pep	PEDAEVLVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:47)
	AKAP7 δ-L308D-pep	PEDAEVLVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:48)
	AKAP7 δ-P-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:49)
	AKAP7 δ-PP-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:50)
20	AKAP7 δ-L314E-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:51)
	AKAP1-pep	EEGLDRNEEKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:52)
	AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAEQ (SEQ ID NO:53)
	AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:54)
	AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:55)
25	AKAP10-pep	NTDEAQEEELAWKIAKMIVSDIMQQA (SEQ ID NO:56)
	AKAP11-pep	VNLDDKKAVLAEKIVAAEAIKAEREL (SEQ ID NO:57)
	AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF (SEQ ID NO:58)
	AKAP14-pep	TQDKNYEDELTVQUALALVEDVINYA (SEQ ID NO:59)
	Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFL VEKIL VNH (SEQ ID NO:60)

[0199] Los residuos que estaban altamente conservados entre los dominios DA de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayados con referencia a la secuencia IS de AKAP (SEQ ID NO: 15). Los residuos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del residuo de alanina C-terminal. (Ver Figura 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, AKAP7δ-wt-pep, AKAP7δ-L304T-pep y AKAP76-L308D-pep.

AKAP-IS

[0200] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO: 15)

[0201] Carr y col. (2001) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificó residuos en las secuencias DDD que parecían ser las más altamente conservadas entre diferentes restos DDD. Estos se indican a continuación subrayados con referencia a la PKA humana. La secuencia RIIa DDD de SEQ ID NO: 13. Los residuos que se conservaron particularmente se indican además en cursiva. Los residuos se superponen con los sugeridos por Kinderman et al., pero no son idénticos (2006) es importante para vincular proteínas AKAP. El experto en la técnica se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de DDD, lo más preferido sería evitar cambiar los residuos más conservados (en cursiva), y sería preferible evitar también cambiar los residuos conservados (subrayados), mientras que se pueden considerar sustituciones conservadoras de aminoácidos para residuos que no son ni subrayados ni en cursiva.

SHIQIPPGLELLQGYTEVLRQEPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO: 13)

[0202] El experto en la técnica se dará cuenta de que estas y otras sustituciones de aminoácidos en el resto de anticuerpo o porciones de enlazador de las construcciones de DNL se pueden utilizar para mejorar las propiedades terapéuticas y/o farmacocinéticas de las construcciones de DNL resultantes.

Ejemplo 8. Citotoxicidad de inmunoconjungados RS7 para células cancerosas

[0203] El anticuerpo RS7 se conjugó con ranpirnasa para producir un inmunoconjungado con toxicidad muy alta para una variedad de líneas celulares epiteliales. La ranpirnasa (Rap) es una ribonucleasa monocatenaria de 104 aminoácidos aislada originalmente de los ovocitos de *Rana pipiens*. El rap exhibe efectos citostáticos y citotóxicos en una variedad de líneas celulares tumorales *in vitro*, así como actividad antitumoral *in vivo*. El rap ingresa a las células a través de endocitosis mediada por receptores y una vez internalizado en el citosol, degrada selectivamente el ARNt, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas y la inducción de la apoptosis. El rap se puede administrar repetidamente a pacientes sin una respuesta immune adversa, y se informa que la toxicidad renal reversible es limitante de la dosis (Mikulski et al., J Clin Oncol 2002; 20:274-81; Int J Oncol 1993; 3:57-64).

[0204] En los estudios siguientes, un inmunoconjungado que comprende Rap unido a RS7 mostró una actividad antiproliferativa amplia y potente contra diversas líneas celulares de cáncer epitelial humano *in vitro*, así como un xenoinjerto de cáncer de pulmón humano *in vivo*. La inmunotoxina basada en IgG, denominada 2L-Rap(Q)-hRS7, comprendía Rap(Q) (una forma mutante de Rap con el supuesto sitio de N-glicosilación eliminado) conjugado con hRS7. 2L-Rap(Q)-hRS7 suprimió el crecimiento tumoral en un modelo profiláctico de ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano Calu-3, con un aumento en el tiempo medio de supervivencia (MST) de 55 a 96 días ($P<0,01$). Los resultados demostraron una eficacia superior de 2L-Rap(Q)-hRS7 como terapéutico para diversos cánceres que expresan Trop-2, como el de cuello uterino, mama, colon, páncreas, ovario y próstata.

Métodos

[0205] Ensayo de proliferación celular Se sembraron células tumorales en placas de 96 pocillos (1×10^4 células por pocillo) y se incubaron con artículos de prueba de 0,01 a 100 nM durante 72 h. Luego se determinó el número de células vivas utilizando la sal soluble de tetrazolio, MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], siguiendo el protocolo del fabricante. Los datos de las curvas dosis-respuesta se analizaron utilizando el software GraphPad Prism para obtener valores de CE50 (la concentración a la que se produce el 50% de inhibición).

[0206] Ensayo de formación de colonias Se tripsinizaron células tumorales y se sembraron en placas de 60 mm (1×10^3 células). Las células se trataron con cada artículo de prueba y se les permitió formar colonias. Se agregaron medios nuevos que contenían el artículo de prueba cada 4 días y, después de 2 semanas de incubación, las colonias se fijaron en formaldehído al 4% y se tiñeron con Giemsa. Se enumeraron colonias > 50 células bajo un microscopio.

[0207] Toxicidad *in vivo* A ratones BALB/c sin tratamiento previo (hembras, 7 semanas de edad, Taconic Farms, Germantown, NY) se les inyectó por vía intravenosa diversas dosis de (Q)-hRS7 que oscilaban entre 25 y 400 µg por ratón y se controlaron diariamente para detectar signos visibles de toxicidad y cambio de peso corporal. La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como la dosis más alta a la que no se produjeron muertes y la pérdida de peso corporal fue del 20 % o menos del peso del animal antes del tratamiento (aproximadamente 20 g). Los animales que experimentaron efectos tóxicos fueron sacrificados.

[0208] Eficacia terapéutica en ratones portadores de tumores Ratones nu/nu atípicos homocigotos NCr hembra de aproximadamente 20 g (5 semanas de edad cuando se recibieron de Taconic Farms) se inocularon con 1×10^7 células de NSCLC humano Calu-3 y se controló el crecimiento del tumor mediante mediciones con calibre de longitud x ancho del tumor. El volumen del tumor se calculó como ($L \times W^2)/2$. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente $0,15 \text{ cm}^3$ de tamaño, los animales se dividieron en grupos de tratamiento de cinco por grupo. La terapia consistió en una única inyección intravenosa de 50 mg de (Q)-hRS7 o dos inyecciones de 25 mg administradas con siete días de diferencia. Un grupo de control recibió solución salina. Los animales fueron monitoreados diariamente para detectar signos de toxicidad y fueron sacrificados humanamente y se consideró que habían sucumbido a la progresión de la enfermedad si los tumores alcanzaban un tamaño superior a $2,0 \text{ cm}^3$ o se ulceraban. Además, si los ratones perdían más del 20% del peso corporal inicial o morían de otro modo, se les aplicaba la eutanasia. Los datos de supervivencia se analizaron mediante gráficos de Kaplan-Meier (análisis de rangos logarítmicos) con el software GraphPad Prism. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P<0,05$.

Resultados

[0209] Análisis de unión La reactividad de (Q)-hRS7 con líneas celulares que expresan Trop-2 se evaluó inicialmente mediante ELISA y se demostró para PC-3 y Calu-3 (datos no mostrados), produciendo ambos una constante de disociación aparente (KD) aproximadamente dos veces mayor que el de hRS7 (0,28 nM frente a 0,14 nM). No se observó unión para el 22Rv1 negativo para Trop-2. Se realizaron estudios posteriores mediante citometría de flujo en un total de 10 líneas celulares que expresan Trop-2, y los resultados (no mostrados) indican que prácticamente no hubo diferencia en la propiedad de unión de (Q)-hRS7 con respecto a la de hRS7.

[0210] Actividad RNasa El ensayo IVTT mide la inhibición de la síntesis de proteínas debido a la degradación del ARNm por la RNasa. (Q)-hRS7 y rRap exhibieron actividad RNasa comparable en este ensayo sin células (no mostrado). Utilizando ARNt de levadura como sustrato, estimamos que las kcat/Km ($109 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) de rRap y (Q)-hRS7 eran $4,10 (\pm 0,42)$ y $1,98$, respectivamente. Por lo tanto, la eficiencia catalítica de (Q)-hRS7 basada en la concentración de Rap es aproximadamente el 50% de rRap.

[0211] Citotoxicidad *in vitro* Según los resultados de un ensayo MTS, (Q)-hRS7 es más potente contra ME-180, T-47D, MDA-MB-468 y Calu-3 (no mostrado), con valores de CE50 de 1,5, 2,0, 3,8 y 8,5 nM, respectivamente. Para aquellas líneas celulares que muestran menos de <50% de inhibición del crecimiento a 100 nM de (Q)-hRS7 con el ensayo MTS, realizamos ensayos de formación de colonias para confirmar que (Q)-hRS7 era citotóxico a 10 o 100 nM para DU-145, PC-3, MCF7, SK-BR-3, BxPC-3, Capan-1 y SK-OV-3 (no se muestran). En ambos ensayos, hRS7, rRap

y la combinación de hRS7 y rRap mostraron poca o ninguna toxicidad a 100 nM en todas las líneas celulares evaluadas. La AsPC-1 negativa para Trop-2 fue resistente a (Q)-hRS7 en ambos ensayos.

[0212] Internalización y ubicación subcelular La internalización de (Q)-hRS7 en células ME-180 se observó claramente (no se muestra). El patrón de distribución de (Q)-hRS7 intracelular en ME-180, detectado directamente por GAH conjugado con FITC o indirectamente por GAM conjugado con PE a través de IgG anti-Rap de ratón, parecía ser casi idéntico, lo que sugiere que (Q)-hRS7 permanece intacto después de la entrada en estas células (no se muestra).

[0213] Eficacia terapéutica en ratones portadores de tumores Como se muestra en la FIG. 6A, cualquiera de los tratamientos (dosis única, 50 µg o dos dosis de 25 µg administradas con 5 días de diferencia) con (Q)-hRS7 inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos de Calu-3 en comparación con controles no tratados ($P < 0,019$), con el tiempo medio de supervivencia aumentado de 55 días a 96 días ($P < 0,01$; FIG. 6B).

Discusión

[0214] El avance clínico de las RNasas dirigidas a anticuerpos de origen animal es relativamente moderada, con la mayoría desarrollada para tratar neoplasias malignas hematológicas y los componentes de dirección conferidos por algunas formas de scFv (Schirrmann et al., Exp Opin Biol Ther 2009;9: 79-95). Hasta la fecha, las RNasas animales dirigidas a anticuerpos no se han evaluado en pacientes con ningún cáncer.

[0215] Dos dificultades observadas en el desarrollo clínico de inmunotoxinas vegetales o microbianas son la toxicidad y la inmunogenicidad indeseables. La toxicidad tisular normal observada con estas inmunotoxinas incluye el síndrome de fuga vascular (VLS), el síndrome urémico hemolítico (HUS) y la hepatotoxicidad (Kreitman, BioDrugs 2009;23:1-13). El motivo estructural (x)D(y) identificado como responsable de la unión de la cadena A de ricina o IL-2 a las células endoteliales está ausente en la secuencia nativa de Rap(Q), y hRS7 no tiene reactividad cruzada con las células endoteliales humanas. Por lo tanto, consideramos la probabilidad de que (Q)-hRS7 provoque que VLS sea remoto. El gran tamaño de (Q)-hRS7 (~ 180 kDa), que plantea una preocupación potencial por una penetración menos rápida de los tumores (Yokota et al., Cancer Res 1992;52:3402-8), debería impedir su eliminación a través de los riñones y mitigar el riesgo de SUH. En cuanto a la hepatotoxicidad, observamos que BL22, una inmunotoxina anti-CD22 recombinante compuesta por el Fv estabilizado con disulfuro de RFB4 fusionado a PE38, e inmunotoxinas similares como LMB-2 (anti-Tac(Fv)-PE38), también tuvo un efecto MTD muy baja en ratones debido a toxicidad hepática inespecífica; sin embargo, se ha informado que BL22 es seguro y eficaz en ensayos clínicos de pacientes con leucemia de células peludas (Kreitman et al., N Engl J Med 2001;345:241-7). Por lo tanto, la hepatotoxicidad limitante de la dosis que se observa comúnmente en ratones puede manifestarse raramente en humanos (Kreitman, BioDrugs 2009;23:1-13).

[0216] La mayoría de las inmunotoxinas genéticamente modificadas que se han evaluado en pacientes con cáncer indujeron una fuerte respuesta inmune humoral, que acorta la vida media en suero y previene una administración adicional. Se espera que (Q)-hRS7 sea menos inmunogénico, porque comprende la fusión de un anticuerpo humanizado con una toxina (Rap) que parece inducir poca respuesta de anticuerpos en los pacientes (Mikulski et al., J Clin Oncol 2002;20 :274-81).

[0217] Aunque se encontró que la potencia *in vitro* de (Q)-hRS7 varía entre líneas celulares que expresan Trop-2 cuando se mide mediante el ensayo MTS de 3 días, la citotoxicidad de (Q)-hRS7 se demostró inequívocamente a 10 nM para todas las líneas celulares utilizando el ensayo de formación de colonias de 14 días. Además de su potente citotoxicidad contra diversas líneas celulares cancerosas *in vitro*, (Q)-hRS7 demostró ser eficaz para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de pulmón humano Calu-3 en ratones desnudos, validando así la actividad antitumoral y la estabilidad de (Q)-hRS7 *in vivo* y confirmando la idoneidad de agregar Trop-2 a la lista actual de antígenos en cánceres sólidos atacados por inmunotoxinas (Kreitman, AAPS J 2006;8:E532-51; Pastan et al., Nat Rev Cancer 2006; Pastan et al., Ann Rev Med 2007;58:221-37; Schirrmann et al., Exp Opin Biol Ther 2009;9:79-95).

[0218] En conclusión, hemos demostrado que una ARNasa de anfibio fusionada de forma recombinante con un anticuerpo antiTrop-2 humanizado muestra una citotoxicidad selectiva y potente contra una variedad de cánceres epiteliales, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 9. Alta potencia de una construcción DNL IgG Rap-anti-Trop-2 contra carcinomas

[0219] Usando las técnicas de DNL descritas en los ejemplos anteriores, se produjo una construcción E1-Rap DNL, que comprende hRS7-IgG-Ad2 (anti-Trop-2) unido a cuatro copias de Rap-DDD2 y mostró propiedades inhibidoras del crecimiento potente *in vitro* contra una variedad de líneas celulares de carcinoma (no mostradas). En las líneas tumorales de mama (MDA-MB-468), cervical (ME-180) y páncreas (BxPC-3 y Capan-1), todas las cuales expresan altos niveles de Trop-2, E1-Rap fue muy potente, mostrando CE₅₀ en el rango subnanomolar (5 a 890 pM), que fue de 1000 a 100,00 veces mayor que el Rap no dirigido o la combinación de Rap y hRS7. En líneas celulares que expresan niveles moderados de Trop-2, como las tres líneas de cáncer de próstata (PC-3, DU 145 y LNCaP), E1-Rap fue menos potente, pero aún mostró CE₅₀ en el rango nanomolar (1 a 890 nM). Los datos de unión celular obtenidos para estas

líneas celulares sólidas de cáncer sugieren que la sensibilidad de una línea celular a E1-Rap parece correlacionarse con su expresión de Trop-2 en la superficie celular. No se observó toxicidad para E1-Rap en la línea de cáncer de próstata, 22Rv1, que no se une a hRS7. Estos resultados muestran la eficacia de E1-Rap como un nuevo tratamiento para los tumores sólidos Trop-2 positivos, incluidos los carcinomas de mama, colon, estómago, pulmón, ovario, endometrio, cuello uterino, páncreas y próstata.

Ejemplo 10. La combinación de radiación dirigida a anticuerpos (radioinmunoterapia) y conjugados de anticuerpo-SN-38 (ADC) mejora la terapia contra el cáncer de páncreas

10 [0220] Anteriormente informamos sobre una actividad antitumoral eficaz en ratones desnudos que portaban tumores pancreáticos humanos con IgG PAM4 humanizada ^{90}Y (hPAM4; ^{90}Y -clivatuzumab tetraxetan) que se mejoró cuando se combinó con gemcitabina (GEM) (Gold et al., Int J. Cancer 109:618-26, 2004; Clin Cancer Res 9:3929S-37S, 2003). Estos estudios condujeron a pruebas clínicas de IgG ^{90}Y -hPAM4 fraccionada combinada con GEM que muestran respuestas objetivas alentadoras. Si bien GEM es conocido por su capacidad radiosensibilizante, por sí solo no es un agente terapéutico muy eficaz para el cáncer de páncreas y su dosis está limitada por la toxicidad hematológica, que también es limitante para la IgG ^{90}Y -hPAM4.

15 [0221] Hemos observado una actividad antitumoral prometedora con un ADC compuesto de hRS7 IgG (glicoproteína-1 antiepitelial humanizado; EGP-1) y SN-38, el componente activo del irinotecán. Este ADC es muy bien tolerado en ratones (p. ej., ≥ 60 mg), aunque solo 4,0 mg (0,5 mg, dos veces por semana \times 4) es significativamente terapéutico. EGP-1 (Trop2) también se expresa en la mayoría de los cánceres de páncreas.

20 [0222] El presente estudio examinó combinaciones de IgG ^{90}Y -hPAM4 con RS7-SN-38 en ratones desnudos portadores de xenoinjertos subcutáneos de $0,35\text{ cm}^3$ de la línea celular de cáncer de páncreas humano, Capan-1. Los ratones ($n=10$) fueron tratados con una dosis única de ^{90}Y -hPAM4 IgG sola (130 μCi , es decir, la dosis máxima tolerada (MTD) o 75 μCi), con RS7-SN-38 solo (como arriba) o combinaciones de los 2 agentes en los dos niveles de dosis de ^{90}Y -hPAM4, y la primera inyección de ADC se administró el mismo día que la de ^{90}Y -hPAM4. Todos los tratamientos fueron tolerados, con $\leq 15\%$ de pérdida de peso corporal. Se produjeron respuestas objetivas en la mayoría de los animales, pero fueron más sólidas en ambos grupos de combinación en comparación con cada agente administrado solo. Todos los animales del grupo 0,13 mCi ^{90}Y -hPAM4 IgG + hRS7-SN-38 alcanzaron un estado libre de tumor en 4 semanas, mientras que otros animales continuaron teniendo evidencia de enfermedad persistente. Estos estudios proporcionan la primera evidencia de que la radioinmunoterapia combinada y el ADC mejoran la eficacia en dosis seguras.

25 [0223] En los ensayos clínicos de PAM4 en curso, se realiza un ciclo de tratamiento clínico de cuatro semanas. En la semana 1, a los sujetos se les administra una dosis de ^{111}In -hPAM4, seguida al menos 2 días después de una dosis de gemcitabina. En las semanas 2, 3 y 4, a los sujetos se les administra una dosis de ^{90}Y -hPAM4, seguida al menos 2 días después de gemcitabina (200 mg/m^2). La escalada comenzó a $3 \times 6,5\text{ mCi/m}^2$. La dosis máxima tolerada en pacientes con cáncer de páncreas de primera línea fue de $3 \times 15\text{ mCi/m}^2$ (la toxicidad hematológica limita la dosis).

30 40 De 22 pacientes evaluables por TC, la tasa de control de la enfermedad (CR+PR+SD) fue del 68 %, con 5 (23 %) respuestas parciales y 10 (45 %) tuvieron la estabilización como mejor respuesta según los criterios RECIST.

Preparación del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC)

45 [0224] Se preparó el anticuerpo hRS7 conjugado con SN-38 como se muestra en la FIG. 7 y según protocolos descritos previamente (Moon et al. J Med Chem 2008, 51:6916-6926; Govindan et al., Clin Cancer Res 2009, 15:6052-6061). Se preparó un derivado bifuncional reactivo de SN-38 (CL2A-SN-38, FIG. 7A) como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20200204589. La fórmula de CL2A-SN-38 es (maleimido-[x]-Lys-PABOCO-20-O-SN-38, donde PAB es *p*-aminobencilo y 'x' contiene un PEG corto). El esquema sintético para la producción de CL2A-SN-38 se ilustra con más detalle en la FIG. 7B. Después de la reducción de los enlaces disulfuro en el anticuerpo con TCEP, el CL2A-SN-38 se hace reaccionar con el anticuerpo reducido para generar el RS7 conjugado con SN-38 (FIG. 7C).

50 [0225] Se prepara ^{90}Y -hPAM4 como se describió previamente (Gold et al., Clin Cancer Res 2003, 9:3929S-37S; Gold et al., Int J Cancer 2004, 109:618-26).

Combinación RAIT + ADC

55 [0226] Los conjugados hRS7-SN-38 se están examinando en diversos modelos de xenoinjerto de cáncer humano-ratón. Los ensayos clínicos iniciales con ^{90}Y -hPAM4 IgG más cantidades radiosensibilizantes de GEM son alentadores, con evidencia de reducción del tumor o enfermedad estable. Sin embargo, la terapia del cáncer de páncreas es un gran desafío. Por lo tanto, se examinó una terapia combinada para determinar si respondería. Específicamente, la administración de hRS7-SN-38 en dosis efectivas, pero no tóxicas se combinó con RAIT con ^{90}Y -hPAM4 IgG.

[0227] Los resultados mostrados en la FIG. 8 demuestran que la combinación de hRS7-SN-38 con ⁹⁰Y-hPAM4 fue más efectiva que cualquiera de los tratamientos solos o la suma de los tratamientos individuales. Con una dosis de 75 µCi de ⁹⁰Y-hPAM4, solo 1 de 10 ratones quedó libre de tumores después de 20 semanas de terapia, lo mismo que se observó con hRS7-SN-38 solo. Sin embargo, la combinación de hRS7-SN-38 con ⁹⁰Y-hPAM4 dio como resultado que

5 4 de 10 ratones estuvieran libres de tumores después de 20 semanas, y los sujetos restantes mostraron una disminución sustancial en el volumen del tumor en comparación con cualquiera de los tratamientos solos. A 130 µCi ⁹⁰Y-hPAM4 la diferencia fue aún más sorprendente, con 9 de 10 animales libres de tumores en el grupo de terapia combinada en comparación con 5 de 10 en el grupo de RAIT solo. Estos datos demuestran el efecto sinérgico de la combinación de hRS7-SN-38 con ⁹⁰Y-hPAM4. RAIT + ADC mejoró significativamente el tiempo hasta la progresión y aumentó la frecuencia del tratamiento libre de tumores.

10 [0228] FIG. 9 muestra que la combinación de ADC con hRS7-SN-38 añadido al MTD de RAIT con ⁹⁰Y-hPAM4 tuvo una toxicidad adicional mínima, indicada por el % de pérdida de peso del animal en respuesta al tratamiento.

15 [0229] El efecto de diferentes tratamientos secuenciales sobre la supervivencia del tumor se ilustra en la FIG. 10. Los resultados indican que el efecto óptimo se obtiene cuando se administra primero RAIT, seguido de ADC. Por el contrario, cuando se administra primero ADC seguido de RAIT, hay una disminución en la incidencia de animales libres de tumores. Ni los anticuerpos hPAM4 ni hRS7 no conjugados tuvieron actividad antitumoral cuando se administraron solos.

20 [0230] Se realizaron experimentos en los que tanto el radionúclido como el fármaco (SN-38) se conjugaron con el mismo anticuerpo (PAM4). FIG. 11 muestra que una dosis de 0,5 mg de hPAM4-SN-38, administrada dos veces por semana durante 8 semanas, fue relativamente eficaz para inhibir el crecimiento tumoral. Sin embargo, la adición de ⁹⁰Y-hPAM4 el mismo día o antes del ADC mejoró la incidencia de animales libres de tumores a las 12 semanas. Estos resultados muestran que los tratamientos RAIT y ADC dirigidos al mismo antígeno se puede administrar juntos. Aunque hPAM4 IgG no se internaliza, el conjugado hPAM4-SN-38 controló el crecimiento tumoral durante más tiempo que hRS7-SN-38 en este sistema modelo (que expresa altos niveles de antígeno PAM4).

Ejemplo 11. Eficacia de conjugados SN-38 de diferentes anticuerpos

30 [0231] Se conjugó CL2A-SN-38 con anticuerpos humanizados, hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucina), hMN-14 (anti-CEACAM5), hLL2 (anti-CD22) y hA20 (anti-CD20). Los conjugados, con una sustitución media de SN-38/MAb (MSR) de ~6, se evaluaron en los xenoinjertos de tumor pancreático humano Capan-1 y BxPC-3 y en el xenoinjerto de linfoma humano de Ramos cultivado s.c. en ratones desnudos atípicos hembra. Cuando los tamaños iniciales de los tumores en animales alcanzaron de 0,2 a 0,3 cm³, se administraron conjugados de control específicos y no dirigidos por vía intraperitoneal en un programa de x 4 semanas dos veces por semana utilizando 25 mg/kg, 12,5 mg/kg o 5 mg/kg de dosis de proteína.

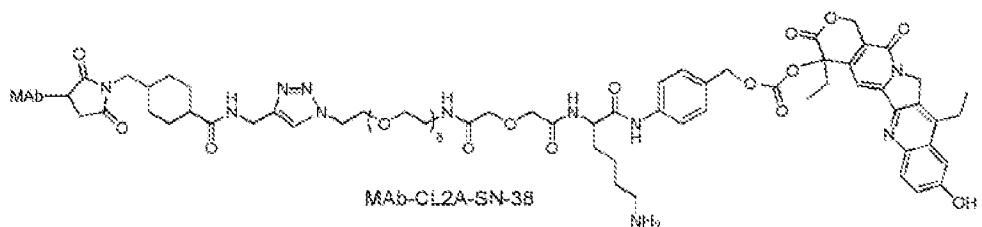
40 [0232] Todos los conjugados de anticuerpo SN-38 mostraron eficacia cuando se examinaron en una línea celular cancerosa diana apropiada (datos no mostrados). El conjugado hMN-14-SN-38 mostró eficacia contra el xenoinjerto de carcinoma de colon humano LS 174T en ratones desnudos (no mostrado). Los conjugados hA20-SN-38 y hLL2 mostraron eficacia contra xenoinjertos de linfoma humano de Ramos en ratones desnudos (no mostrado). Los conjugados hRS7-SN-38 y hPAM4-SN-38 mostraron eficacia contra xenoinjertos de cáncer de páncreas humano Capan-1 en ratones desnudos (no mostrado).

45 [0233] Se realizó una comparación de la eficacia de los conjugados SN-38 de hRS7, hPAM4, hMN14 y los anticuerpos hA20 de control contra xenoinjertos de cáncer de páncreas humano Capan-1 en ratones desnudos. Como se muestra en la FIG. 12, los conjugados hRS7 y hPAM4 de SN-38 mostraron la mayor eficacia contra una línea celular de cáncer de páncreas humano.

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo anti-Trop-2 RS7 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, para usar en un método para tratar el cáncer de páncreas que comprende:

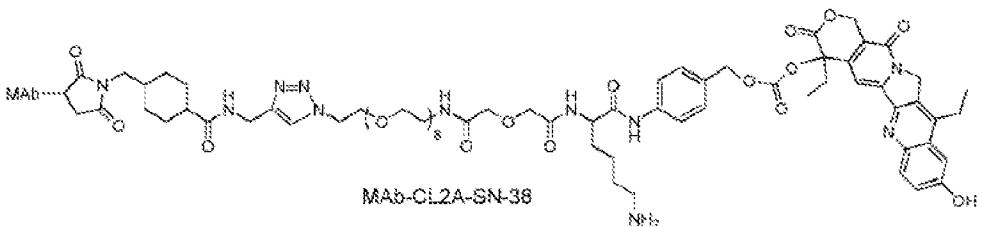
10 a) administrar a un sujeto con cáncer de páncreas el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO.11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno mediante el enlazador CL2A, en donde la estructura del inmuconjugado es MAb-CL2A-SN-38



30 b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo mucina anticáncer pancreático PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo mucina anticáncer pancreático o un fragmento del mismo comprende las secuencias de región determinante de la complementariedad de la luz (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6), y en donde el radionucleido es ⁹⁰Y.

35 2. Un anticuerpo mucina anti-cáncer de páncreas PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, para usar en un método para tratar el cáncer de páncreas que comprende:

40 a) administrar a un sujeto con cáncer de páncreas un anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO. 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno mediante el enlazador CL2A, en donde la estructura del inmuconjugado es MAb-CL2A-SN-38

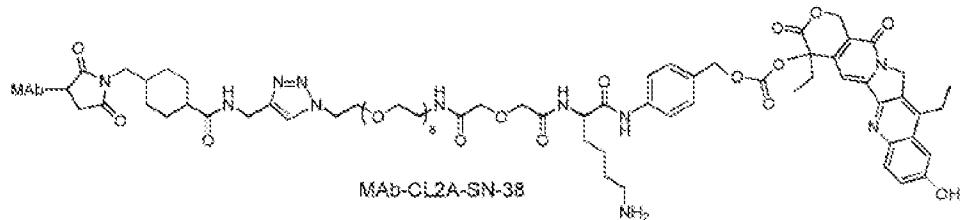


60 b) administrar a dicho sujeto el anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas o su fragmento de unión a antígeno conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas o su fragmento comprende las secuencias de región determinante de la complementariedad de la luz (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6), y en donde el radionucleido es ⁹⁰Y.

65

3. Una composición farmacéutica que comprende

5 a) un anticuerpo RS7 anti-Trop-2 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un agente citotóxico, en donde el anticuerpo anti-Trop-2 o un fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO. 11) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12), en donde el agente citotóxico es SN-38 conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno mediante el enlazador CL2A, en donde la estructura del inmunoconjugado es MAbCL2A-SN-38



20 y

25 b) un anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas PAM4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con un radionúclido, en el que el anticuerpo de mucina contra el cáncer de páncreas o un fragmento del mismo comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad ligera (CDR) CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO: 1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO: 3); y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 5) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 6), y en donde el radionúclido es ⁹⁰Y, y en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar el cáncer de páncreas.

30 4. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo mucina anti-cáncer de páncreas o fragmento del mismo se administran secuencialmente o al mismo tiempo.

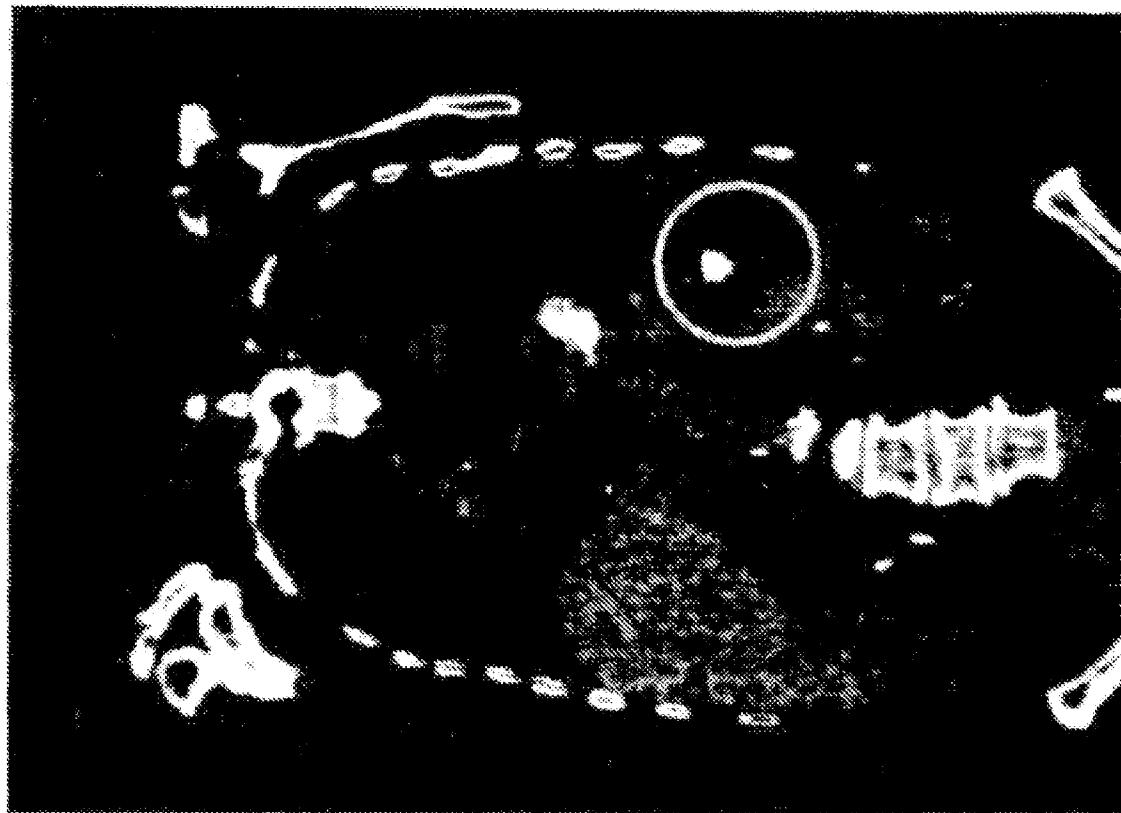
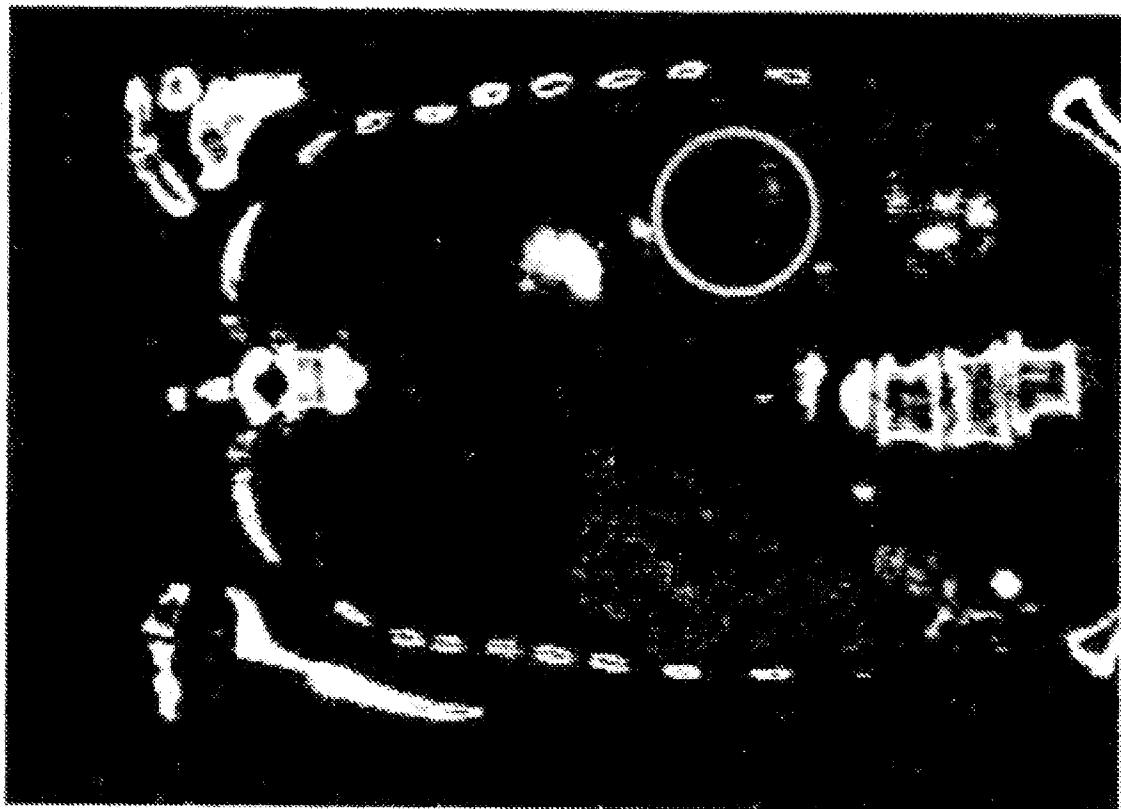
35 5. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo o fragmento de mucina anti-cáncer de páncreas de los mismos están conjugados entre sí.

40 6. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 5 y la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo anti-Trop-2 o fragmento del mismo y el anticuerpo mucina anticáncer de páncreas o fragmento del mismo se conjugan entre sí mediante la técnica de dock-and-lock (DNL).

45 7. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo mucina anticáncer pancreático o fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o fragmento del mismo.

50 8. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo mucina anticáncer de páncreas se une al 80% o más del adenocarcinoma de páncreas invasivo humano, neoplasia mucinosa papilar intraductal, PanIN-IA, PanIN-1 B y PanIN-2, y no se une al tejido pancreático humano normal.

FIG. I



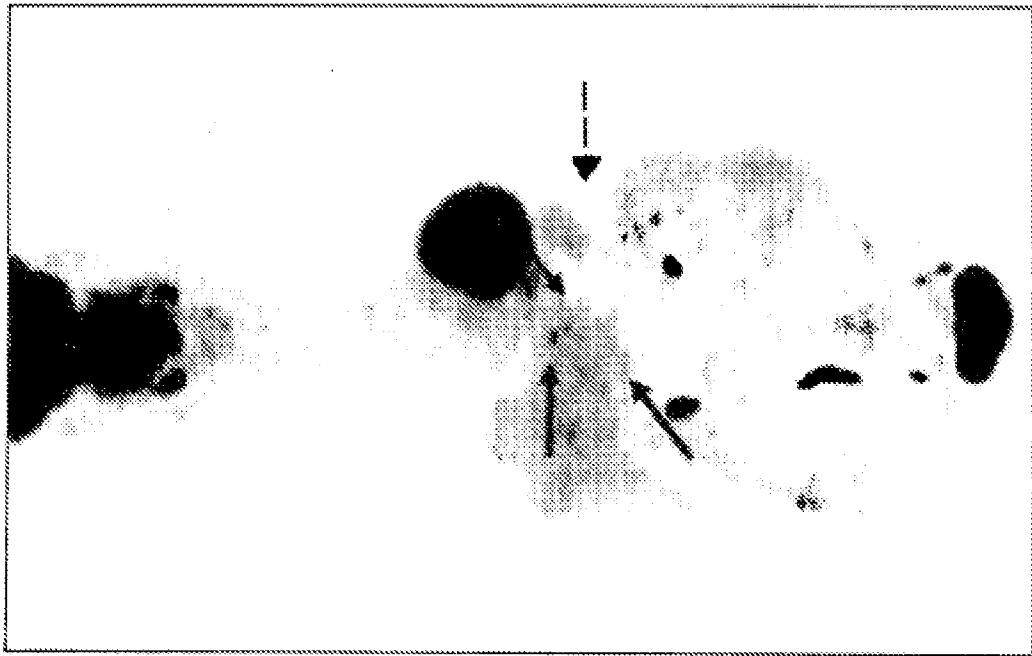


FIG. 2



^{90}Y -IMP 288 y ^{90}Y -hPAM4 preorientado a TF10
en ratones desnudos que llevan ca pancreático de sc CaPan1

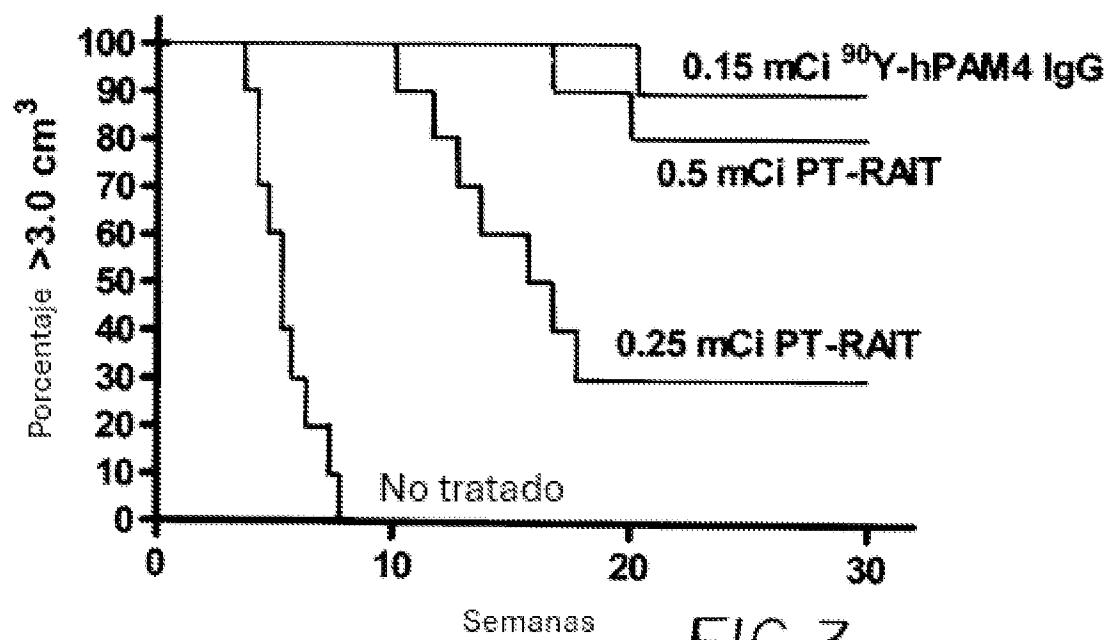


FIG. 3

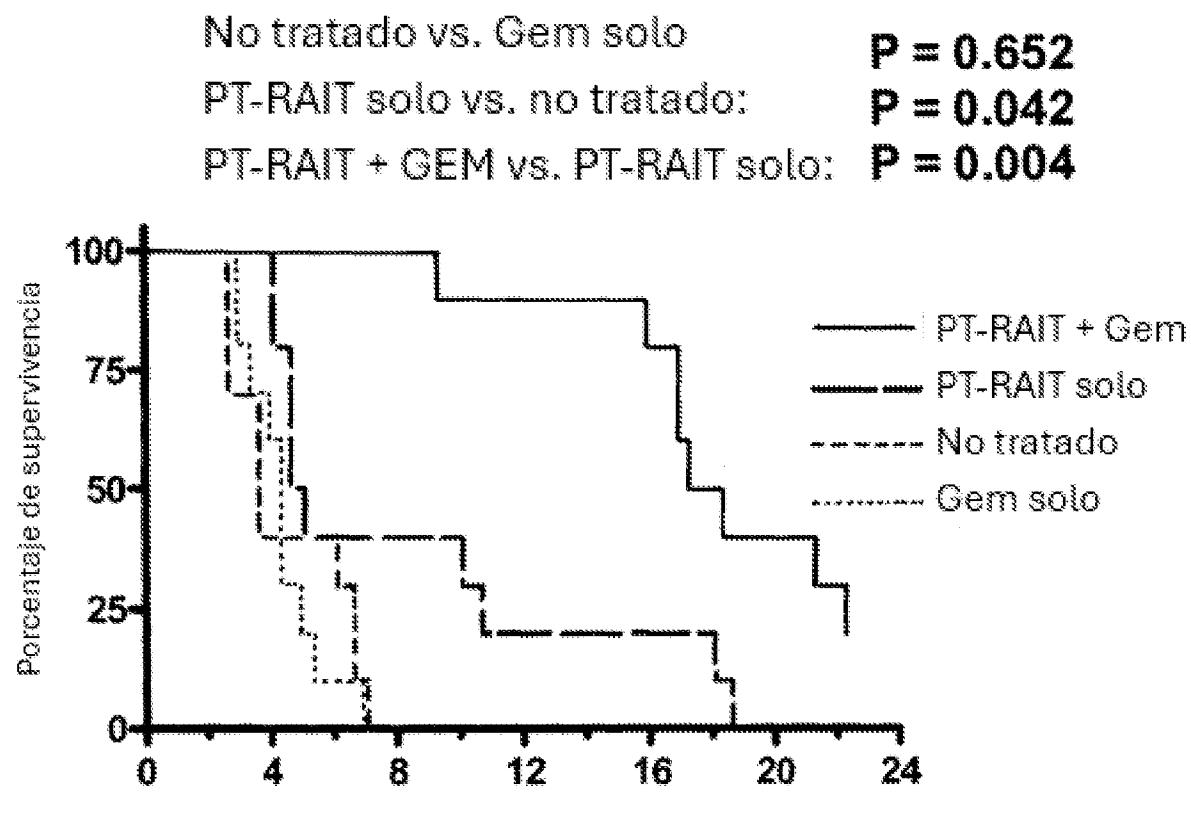


FIG. 4

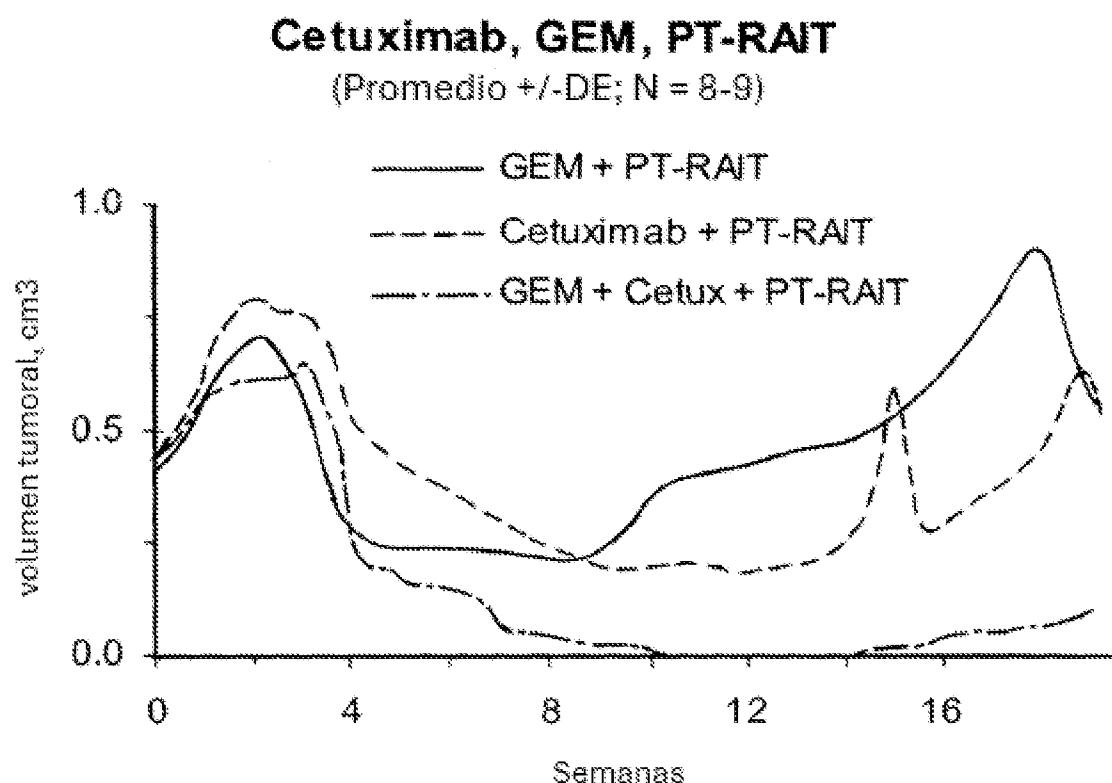
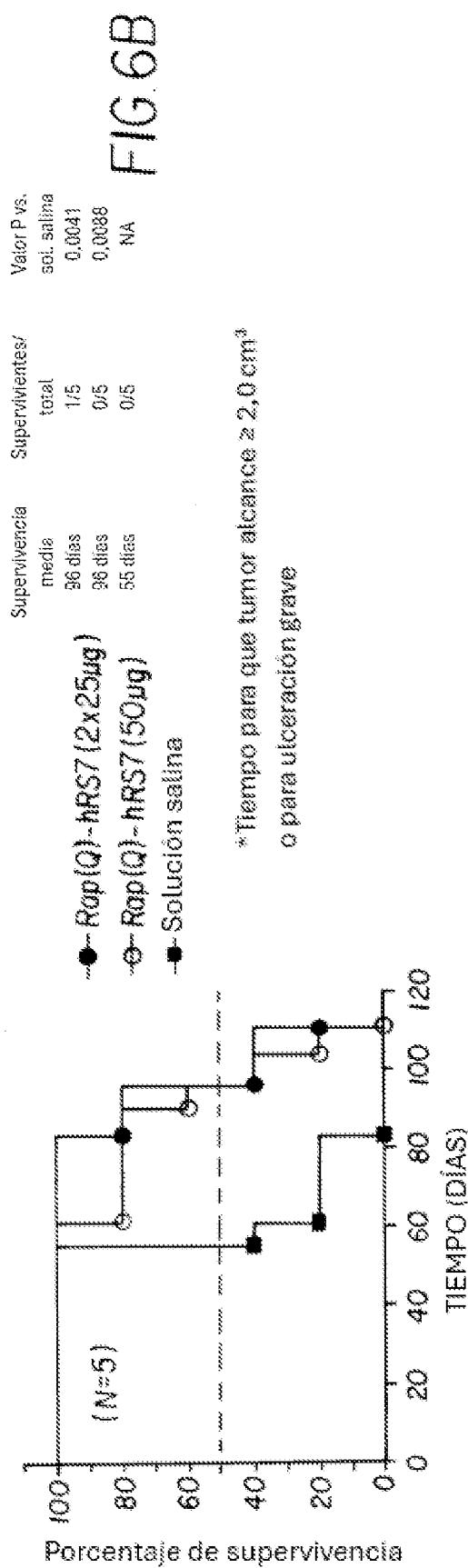
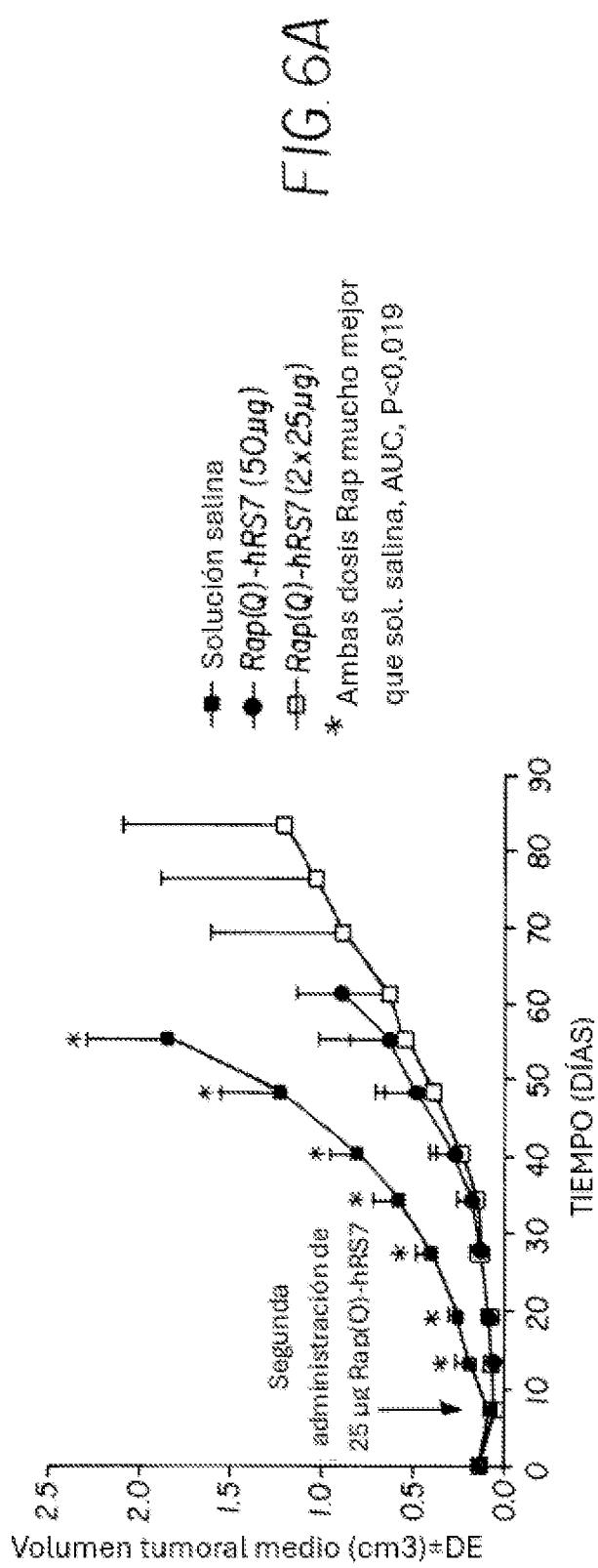
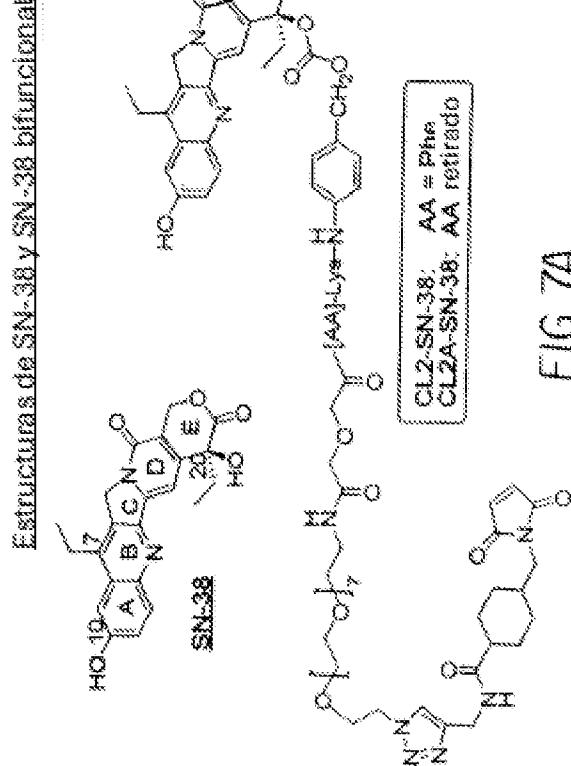


FIG. 5





Preparación de SN-38 bifuncional Cl2A-SN-38

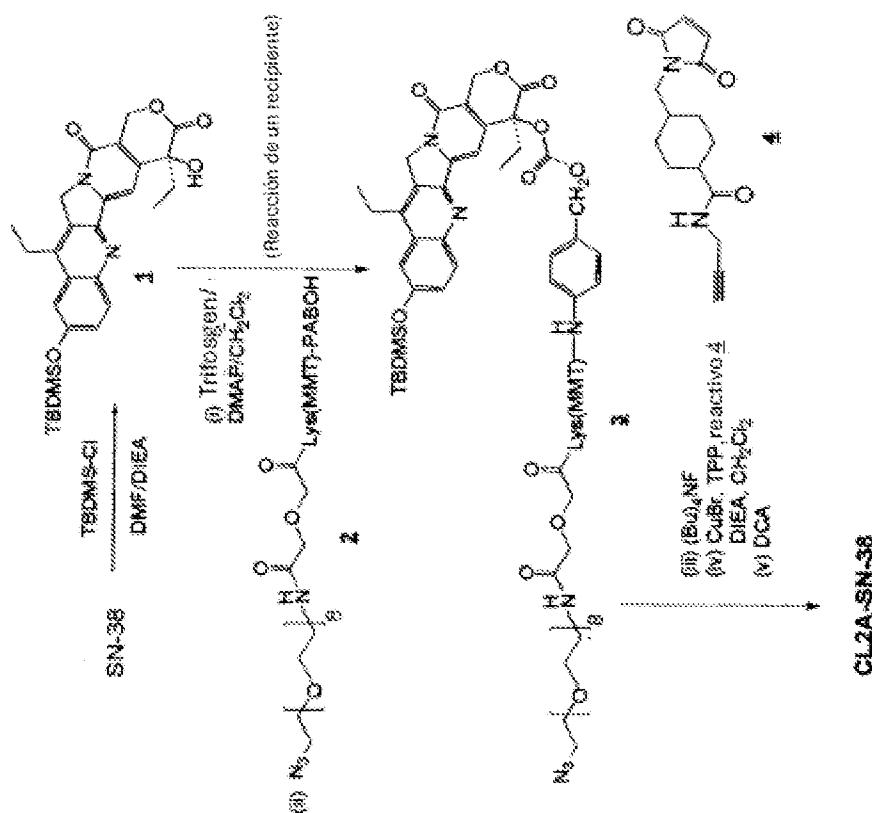


FIG. 7B

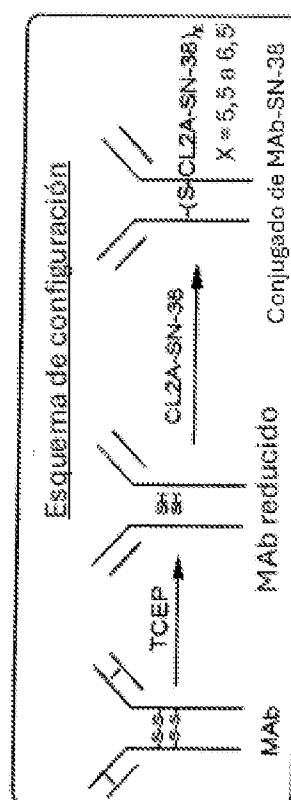


FIG. 7C

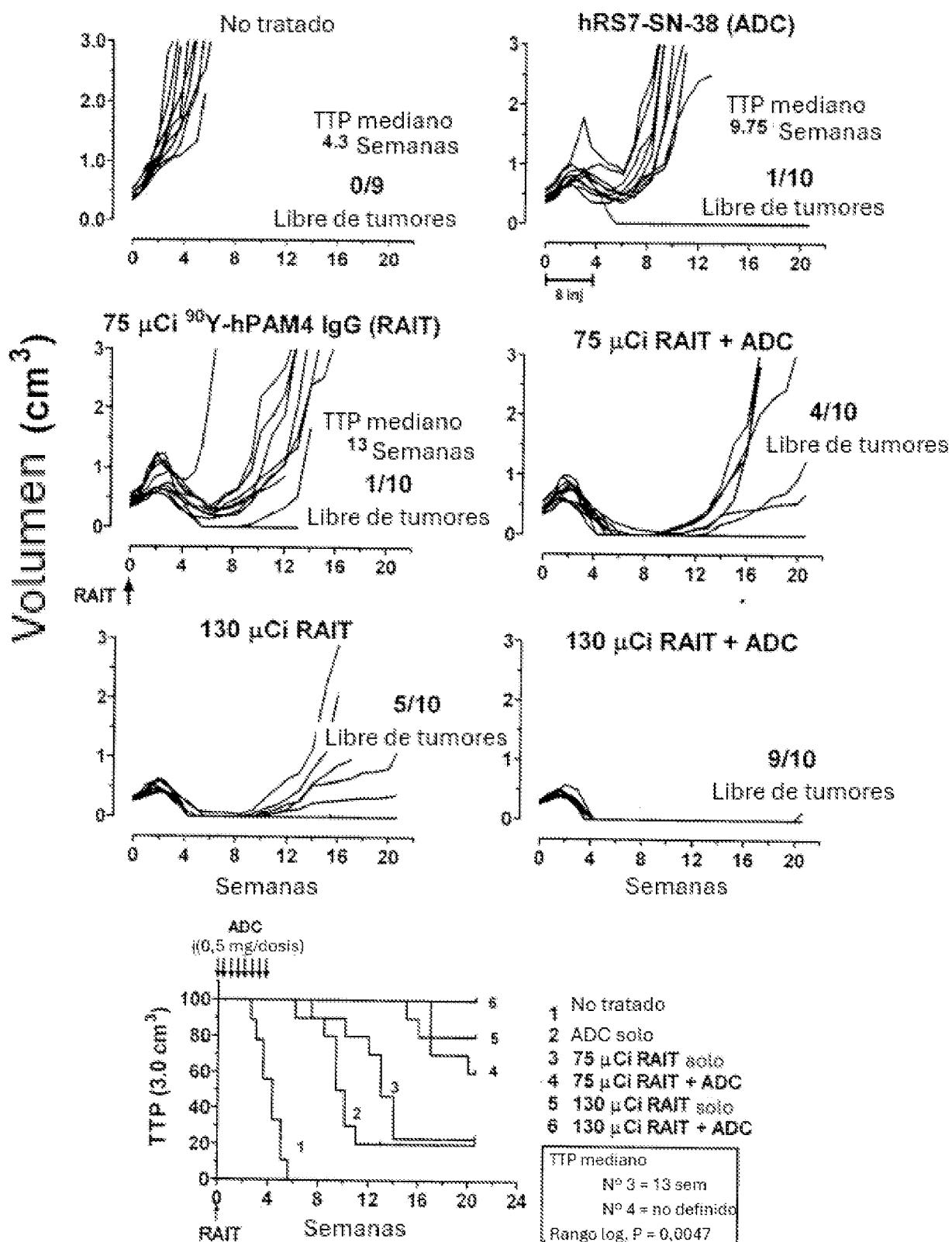


FIG. 8

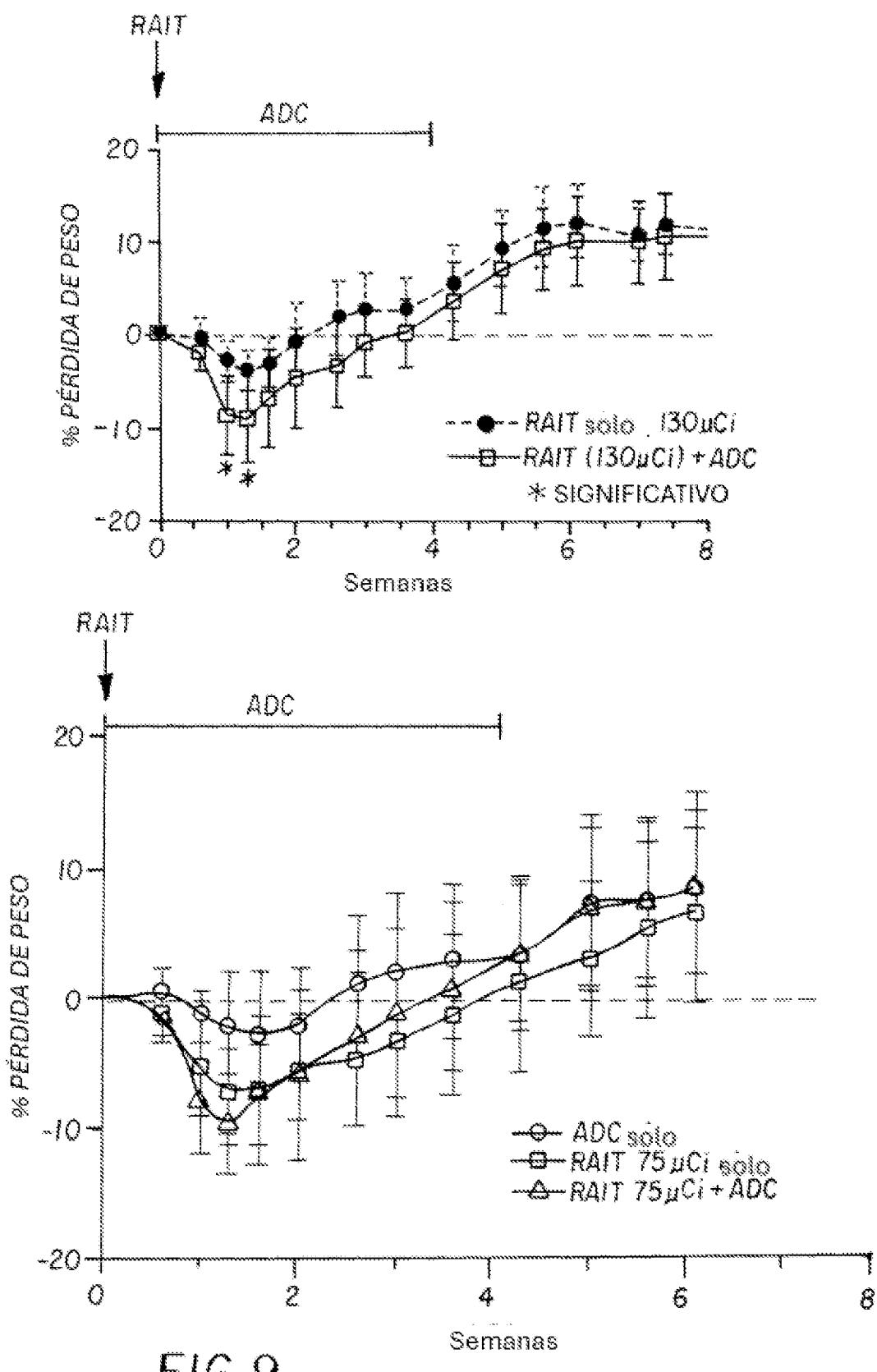
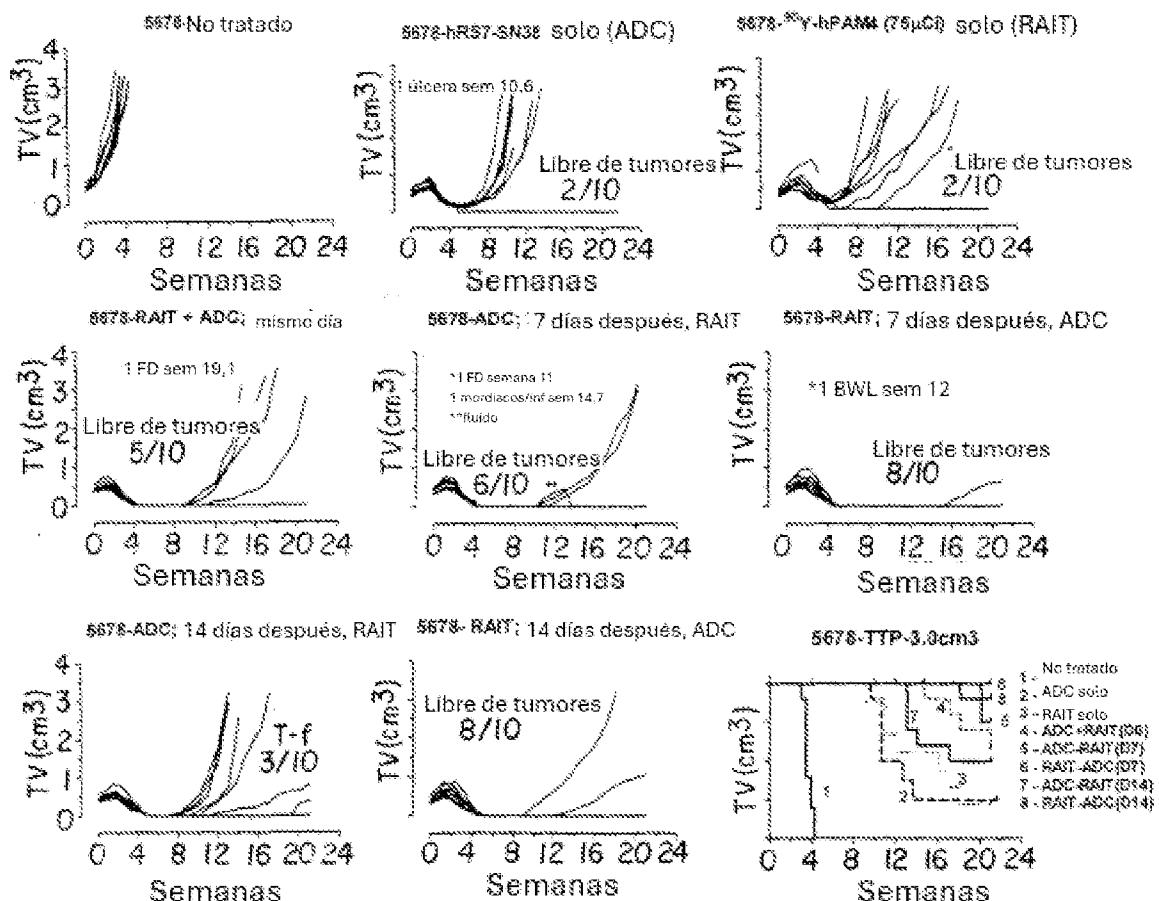


FIG. 9

ES 2 978 177 T3

RAIT = ^{90}Y -hPAM4 IgG (75 μCi , 50 μg); iv

ADC = hRS7-SN-38; 0,5 mg, dos veces semanalmente, 4 semanas, ip



Anticuerpos no conjugados

(0,5 mg, dos veces semanalmente x 4 sem)

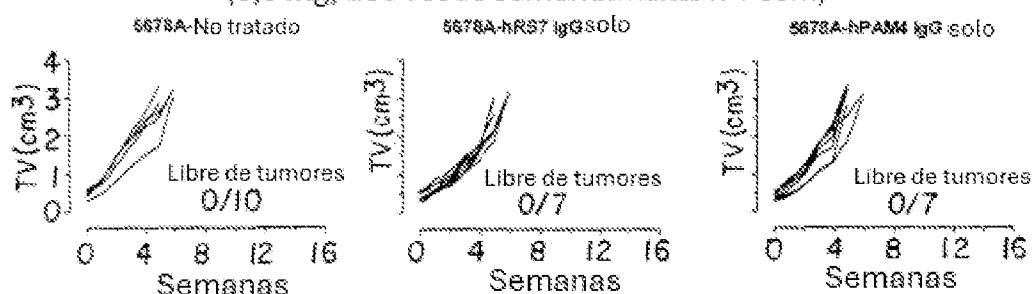


FIG. 10

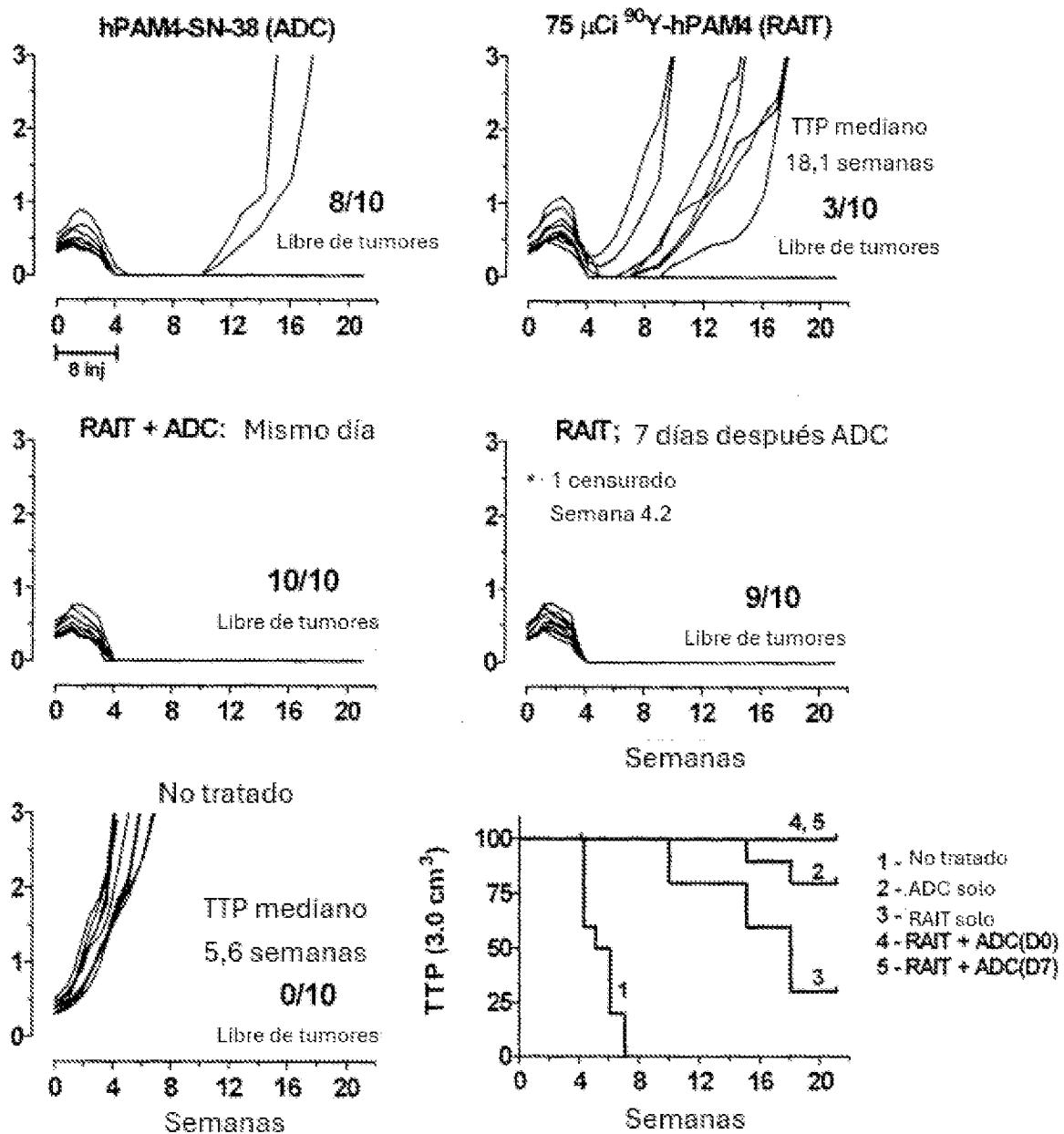


FIG. II

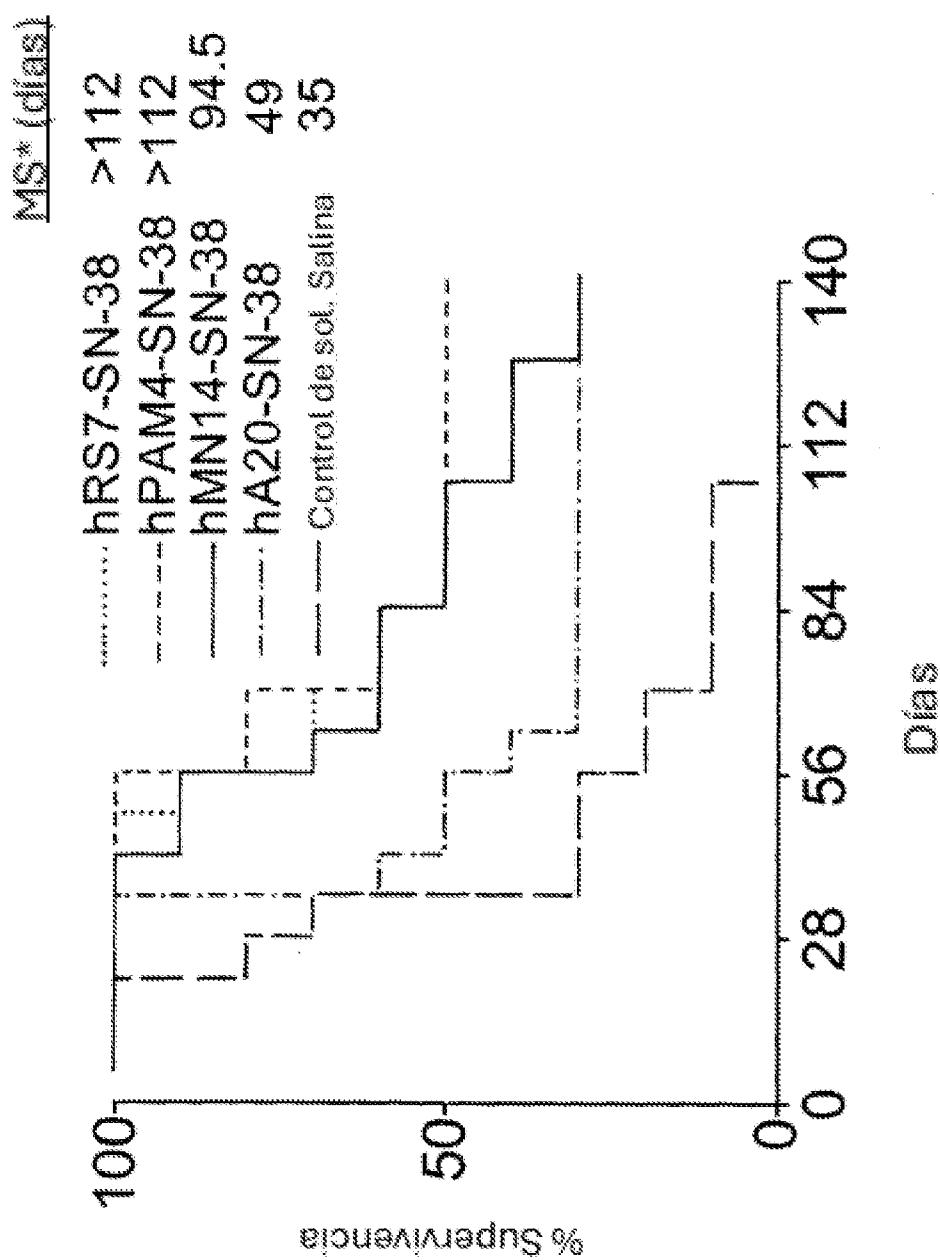


FIG. 12