

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 892 525**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2015 PCT/US2015/054011**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057398**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2015 E 15849252 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021 EP 3204018**

54 Título: **Uso neoadyuvante de conjugados anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

07.10.2014 US 201462060858 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GOLDENBERG, DAVID M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 892 525 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

Uso neoadyuvante de conjugados anticuerpo-fármaco

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para tratamiento neoadyuvante del cáncer y una terapia estándar anticáncer para su uso en un método para el tratamiento neoadyuvante del cáncer como se define en las reivindicaciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los agentes neoadyuvantes se administran a un paciente antes del tratamiento con una terapia primaria, como cirugía o radioterapia (ver, por ejemplo, Wikipedia - Terapia neoadyuvante). El objeto de la terapia neoadyuvante contra el cáncer es reducir el tamaño o la extensión del tumor o los tumores del paciente antes de la terapia primaria, preferiblemente mejorando la probabilidad de un resultado exitoso y/o disminuyendo los efectos adversos de un tratamiento más extenso que se requeriría en ausencia de la terapia neoadyuvante (Id.). El tratamiento neoadyuvante también puede dirigirse a las micrometástasis que pueden no verse afectadas por la terapia primaria (Id.). Recientemente, la terapia neoadyuvante ha ganado un papel como medio para probar nuevas quimioterapias de manera más expeditiva, porque las respuestas a la terapia neoadyuvante pueden evaluarse rápidamente en un número relativamente pequeño de pacientes, y puede predecir el resultado a más largo plazo (Rastagi et al., 2008, J Clin Oncol 26:778-85; Bardia y Baselga, 2013, Clin Cancer Res 19:6360-70). De hecho, la evidencia de los estudios neoadyuvantes indica que la determinación de la respuesta patológica completa (pCR) en la cirugía (es decir, sin enfermedad residual en la mama y la axila) predice la respuesta clínica a largo plazo, incluso después de dos ciclos de quimioterapia neoadyuvante (Rastagi et al., 2008, J Clin Oncol 26:778-85; von Minckwitz et al., 2012, J Clin Oncol 30:1796-1804; Huober et al., 2010, Breast Cancer Res Treat 124:133-40).

15

20

25

La historia del tratamiento neoadyuvante en el cáncer es extensa. Gran parte del trabajo anterior en este campo se relacionó con el uso de quimioterapia neoadyuvante antes de la escisión quirúrgica o la radioterapia. Ervin et al. (1984, Arch Otolaryngol 110:241-5) informaron sobre quimioterapia neoadyuvante de cáncer de cabeza y cuello avanzado con cisplatino, bleomicina y metotrexato, antes de la cirugía más radioterapia o radioterapia de dosis alta sola. Aunque se observó alguna mejora en el resultado, particularmente cuando la terapia neoadyuvante dio como resultado una reducción sustancial del tumor, la recaída de la enfermedad fue común (Ervin et al, 1984). También se ha informado de quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante en sarcoma osteogénico (Rosen & Nirenberg, 1985, Prog Clin Biol Res 201:39-51), cáncer de mama (Ragaz et al., 1985, Prog Clin Biol Res 201:77-87), cáncer de esófago (Kelsen et al., 1986, Semin Surg Oncol 2:170-6), cáncer de ano y recto (Smith et al., 1986, Am J Surg 151:577-80), cáncer de pulmón (Cox et al., 1986, Cancer Treat Rep 70:1219-20) y muchas otras formas de cáncer. Aunque a menudo se informa de un mejor resultado con la terapia neoadyuvante, el grado en que la quimioterapia y/o la radioterapia neoadyuvantes mejoran la supervivencia a largo plazo del paciente con cáncer en general aún no ha sido confirmado por estudios prospectivos (ver, por ejemplo, Bittoni et al., 2014, Gastroenterol Res Pract 2014:183852; Doval et al., 2013, J Indian Med Assoc 111:629-31).

30

35

40

Recientemente, se ha intentado el uso neoadyuvante de anticuerpos o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) en el cáncer de mama. Se ha investigado el pertuzumab (anti-HER2) y ha recibido la aprobación de la FDA en combinación con trastuzumab y docetaxel en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama metastásico positivo para HER2 (Sabatier & Goncalves, 2014, Bull Cancer 101:765-71; Esserman & DeMichele, 2014, Clin Cancer Res 20:3632-36). La ado-trastuzumab emtansina (T-DM1), que comprende un anticuerpo anti-HER2 conjugado con el potente inhibidor de microtúbulos emtansina, ha sido aprobado para su uso en el cáncer de mama metastásico positivo para HER2 en pacientes que no han respondido a la terapia previa y se está investigando para uso neoadyuvante. (Corrigan et al., 2014, Ann Pharmacother [Publicación electrónica antes de impresión, 31 de julio de 2014]).

45

50

Aunque estos resultados son prometedores, los anticuerpos anti-HER2 son de poca utilidad, por ejemplo, en el cáncer de mama triple negativo (TNBC), que carece de expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y HER2 (por ejemplo, Gogia et al., 2014, India J Cancer 51:163-6). El TNBC representa alrededor del 10 al 20% de los cánceres de mama y es más agresivo y letal que otras formas de esta enfermedad, y prácticamente todas las mujeres con TNBC metastásico mueren finalmente a causa de la enfermedad, a pesar de la terapia sistémica. Hay una necesidad en el campo de formas más eficaces de terapia contra el cáncer neoadyuvante basada en inmunocombinados, particularmente para formas de cáncer que son resistentes a los tratamientos estándar contra el cáncer, como TNBC.

55

60

La US2014/0099254 A1 se refiere a una combinación de dos o más agentes para inducir una respuesta inmune contra el cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde los agentes incluyen complejos de redirección de leucocitos, conjugados anticuerpo-fármaco, interferones y/o anticuerpos inhibidores del punto de control.

65

La US 2014/0227180 A1 se refiere a métodos y composiciones para preparar conjugados SN-38 de proteína y péptidos, preferiblemente inmunoconjugados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante la materia de las reivindicaciones independientes adjuntas, las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

10

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para el tratamiento neoadyuvante del cáncer que comprende:

15

a) administrar el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una fracción de anticuerpo conjugada con un fármaco, a un sujeto con cáncer, en donde la fracción de anticuerpo es un anticuerpo anti-Trop2 hRS7 y el fármaco es SN-38; y

20

b) tratar al sujeto con una terapia estándar anticáncer seleccionada del grupo que consiste de cirugía, y radioterapia, y en donde el ADC se administra antes de la terapia anticáncer estándar.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una terapia estándar anticáncer para su uso en un método para el tratamiento neoadyuvante del cáncer que comprende:

25

a) administrar el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una fracción de anticuerpo conjugada con un fármaco, a un sujeto con cáncer, en donde la fracción de anticuerpo es un anticuerpo anti-Trop2 hRS7 y el fármaco es SN-38; y

30

b) tratar al sujeto con la terapia estándar anticáncer, en donde la terapia estándar anticáncer se selecciona del grupo que consiste de cirugía, y radioterapia, y en donde el ADC se administra antes de la terapia anticáncer estándar.

En una realización del primer y el segundo aspecto, la fracción de anticuerpo comprende regiones constantes humanas seleccionadas del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

35

En una realización del primer y el segundo aspecto, la fracción de anticuerpo tiene un alotipo seleccionado del grupo que consiste de no-G1m1 (nGm1), G1m3 y Km3.

40

En una realización del primer y el segundo aspecto, el ADC comprende un conector que une el fármaco a la fracción de anticuerpo.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el fármaco es SN-38 y el conector es CL2A.

45

En una realización del primer y el segundo aspecto, el método comprende además administrar por lo menos un agente terapéutico a dicho sujeto.

En una realización preferida del primer y el segundo aspecto, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de una toxina, una enzima, una hormona, un segundo anticuerpo, un segundo fragmento de anticuerpo, un inmunoconjugado, un radionúclido, un oligonucleótido antisentido, y un ARNi.

50

En una realización más preferida del primer y el segundo aspecto, el radionúclido se une a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno y se selecciona del grupo que consiste de ¹¹¹In, ¹¹¹At, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹Bi, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³³I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁵²Dy, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶¹Ho, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹¹Pb, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ⁵⁸Co, ^{80m}Br, ^{99m}Tc, ^{103m}Rh, ¹⁰⁹Pt, ¹¹⁹Sb, ^{189m}Os, ¹⁹²Ir, ²¹⁹Rn, ²¹⁵Po, ²²¹Fr, ²⁵⁵Fm, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²²⁴Ac, ⁷⁷Br, ^{113m}In, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ²²⁷Th, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ⁷⁶Br y ¹⁶⁹Yb.

55

En una realización del primer y el segundo aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de tiroides medular, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de recto, y melanoma.

60

En una realización del primer y el segundo aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de

65

cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de colon metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) metastásico, cáncer de páncreas metastásico, carcinoma de células renales metastásico, cáncer gástrico metastásico, cáncer de próstata metastásico, y cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico.

5 En una realización del primer y el segundo aspecto, el cáncer es refractario a otras terapias pero responde a la terapia con ADC neoadyuvante.

10 La presente invención como se define en las reivindicaciones hace uso de conjugados de anticuerpos de SN-38 que, preferiblemente, tienen toxicidades nanomolares in vitro, en comparación con las toxicidades subnanomolares a picomolares de agentes quimioterapéuticos ultratóxicos como caliqueamicina, maitansinoides o MMAE. El uso de fármacos que no son ultratóxicos permite el uso de conectores anticuerpo-fármaco que no requieren internalización celular para la liberación de fármacos libres, sino que permiten cierta liberación extracelular del fármaco. Con el conector CL2A que se describe a continuación, el 50% del fármaco conjugado se libera en 24 horas, aumentando de este modo la biodisponibilidad del fármaco liberándolo tanto extracelular como intracelularmente. Además, el uso de fármacos relativamente no tóxicos permite la administración de dosificaciones más altas de ADC, lo que lleva a mejores efectos terapéuticos.

20 La presente invención como se define en las reivindicaciones resuelve una necesidad insatisfecha en la técnica. Los métodos y composiciones divulgados son útiles para el tratamiento neoadyuvante de cánceres que son refractarios o menos sensibles a otras formas de terapia. Los cánceres refractarios pueden incluir, pero no se limitan a, cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) metastásico, cáncer de páncreas metastásico, carcinoma de células renales metastásico, cáncer gástrico metastásico, cáncer de próstata metastásico, o cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico.

25 El anticuerpo puede ser de varios isotipos, preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas, que comprende más preferiblemente secuencias de región constante y bisagra de IgG1 humana. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como anticuerpos semi-IgG4, como se describe en van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557), o anticuerpos de dominio único (por ejemplo, nanocuerpos) disponibles comercialmente (por ejemplo, ABLYNX®, Gante, Bélgica). Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo puede diseñarse o seleccionarse para que comprenda secuencias de la región constante humana que pertenecen a alotipos específicos, lo que puede dar como resultado una inmunogenicidad reducida cuando el inmunocombinado se administra a un sujeto humano. Los alotipos preferidos para la administración incluyen un alotipo no-G1m1 (nG1m1), como G1m3, G1m3,1, G1m3,2 o G1m3,1,2. Más preferiblemente, el alotipo se selecciona del grupo que consiste de los alotipos nG1m1, G1m3, nG1m1,2 y Km3.

40 Para el tratamiento neoadyuvante del cáncer, se conocen en la técnica muchos antígenos expresados por o asociados de otro modo con células tumorales, que incluyen pero no se limitan a, anhidrasa carbónica IX, alfa-fetoproteína (AFP), α -actinina-4, A3, antígeno específico para anticuerpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 α , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, histona H2B, histona H3, histona H4, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina de cáncer de páncreas, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa de ácido prostático, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, 5100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF- α , antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, ED-B fibronectina, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras, un marcador oncogénico y un producto oncogénico (ver, por ejemplo, Sensi et al., *Clin Cancer Res* 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., *J Immunol* 2007, 178:1975-79; Novellino et al. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:187-207). Preferiblemente, el anticuerpo se une a AFP, CEACAM5, CEACAM6, CSAp, EGP-1 (TROP-2), AFP, MUC5ac, antígeno PAM4, CD74, CD19, CD20, CD22 o HLA-DR.

65 Los anticuerpos ejemplares que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, hR1 (anti-IGF-1R, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 12/722.645, presentada el 12 de marzo de 2010), hPAM4 (anti-MUC5ac, Patente de Estados Unidos N° 7.282.567), hA20 (anti-CD20, Patente de los Estados Unidos N° 7.151.164), hA19

(anti-CD19, Patente de Estados Unidos Nº 7.109.304), hIMMU31 (anti-AFP, Patente de Estados Unidos Nº 7.300.655), hLL1 (anti-CD74, Patente de Estados Unidos Nº 7.312.318), hLL2 (anti-CD22, Patente de Estados Unidos Nº 5.789.554), hRFB4 (anti-CD22, Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº de serie 61/944.295, presentada el 25 de febrero de 2014), hMu-9 (anti-CSAp, Patente de Estados Unidos Nº 7.387.772), hL243 (anti-HLA-DR, Patente de Estados Unidos Nº 7.612.180), hMN-14 (anti-CEACAM5, Patente de Estados Unidos Nº 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, Patente de Estados Unidos Nº 8.287.865), hRS7 (anti-TROP-2, Patente de Estados Unidos Nº 7.238.785), hMN-3 (anti-CEACAM6, Patente de Estados Unidos Nº 7.541.440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, Patente de Estados Unidos Nº 7.138.496). Más preferiblemente, el anticuerpo es IMM-31 (anti-AFP), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-3 (anti-CEACAM6), hMN-15 (anti-CEACAM6), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), hL243 o IMM-114 (anti-HLA-DR), hA19 (anti-CD19) o hA20 (anti-CD20). Como se usa en la presente, los términos epratuzumab y hLL2 son intercambiables, al igual que los términos veltuzumab y hA20, y hL243g4P, hL243gamma4P e IMM-114.

Los anticuerpos alternativos de uso incluyen, pero no se limitan a, abciximab (antiglicoproteína IIb/IIIa), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), lambrolizumab (anti-receptor de PD-1), nivolumab (anti-receptor de PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), abagovomab (anti-CA-125), adecatumumab (anti-EpCAM), atlizumab (anti-receptor de IL-6), benralizumab (anti-CD125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, Solicitud de Patente de Estados Unidos 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, WO 2009/130575), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), GA101 (anti-CD20; Glycart Roche), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina $\alpha 4$), omalizumab (anti-IgE); anticuerpos anti-TNF- α como CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAl, M2TNFAl, M3TNFAl, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximab (Centocor, Malvern, PA), Certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL) y belimumab (Human Genome Sciences). Recientemente, se han divulgado anticuerpos humanizados contra las histonas humanas H2B, H3 y H4 (Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de serie 14/180.646) que pueden utilizarse en los métodos y composiciones divulgados.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la fracción de anticuerpo se enlaza a por lo menos una fracción de fármaco, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 5 fracciones de fármaco, alternativamente de aproximadamente 6 a 12 fracciones de fármaco. En varias realizaciones, la fracción de anticuerpo puede unirse a 4 o 6 fracciones de fármaco, o a 5 o menos fracciones de fármaco. El número de fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

Una camptotecina ejemplar es CPT-11. Hay disponibles datos clínicos extensos referentes a la farmacología de CPT-11 y su conversión in vivo al SN-38 activo (Iyer y Ratain, Cancer Chemother Pharmacol. 42:S31-43 (1998); Mathijssen et al., Clin Cancer Res. 7:2182-2194 (2002); Rivory, Ann NY Acad Sci. 922:205-215, 2000)). La forma activa SN-38 es aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud más potente que CPT-11. En ejemplos específicos, el inmunoconjugado puede ser un conjugado hMN-14-SN-38, hMN-3-SN-38, hMN-15-SN-38, hIMMU-31-SN-38, hR1-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hL243-SN-38, hLL1-SN-38, hRFB4-SN-38, hMu-9-SN-38 o hLL2-SN-38. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se usa un conector de CL2A para conjugar el SN-38 con la fracción del anticuerpo.

Una antraciclina ejemplar es una forma de profármaco de 2-pirrolinodoxorrubicina (P2PDox), como N-(4,4-diacetoxibutil)doxorubicina, divulgada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de serie 14/175.089. Sorprendentemente, se ha descubierto que P2PDox se une estrechamente al anticuerpo conjugado, debido a la formación de reticulaciones con cadenas peptídicas de anticuerpos. La reticulación ayuda a minimizar la toxicidad, por ejemplo la cardiotoxicidad, que resultaría de la liberación del fármaco libre en circulación. Preferiblemente, el P2PDox se une a grupos disulfuro tiol entre cadenas mientras está en forma de profármaco. La protección del profármaco se elimina rápidamente in vivo poco después de la inyección y la porción de 2-PDox resultante del conjugado reticula las cadenas peptídicas del anticuerpo, formando reticulación intramolecular dentro de la molécula de anticuerpo. Esto tanto estabiliza el ADC como evita la reticulación con otras moléculas en circulación. En realizaciones preferidas específicas, el inmunoconjugado puede ser un conjugado hMN-14-P2PDox, hMN-3-P2PDox, hMN-15-P2PDox, hIMMU-31-P2PDox, hRS7-P2PDox, hR1-P2PDox, hA20-P2PDox, hPAM4-P2PDox, hL243-P2PDox, hLL1-P2PDox, hRFB4-P2PDox, hMu-9-P2PDox o hLL2-P2PDox.

La presente divulgación se refiere al posible uso de los métodos y composiciones en cuestión para tratar un cáncer que incluye, pero no se limita a, linfomas no Hodgkin, leucemias linfoides agudas y crónicas de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma agudo de células B grandes, leucemia de células pilosas, leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas y leucemias de células T, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, el cáncer puede ser uno de carcinomas, melanomas, sarcomas, gliomas, cánceres de huesos y piel. Los carcinomas pueden incluir carcinomas

de la cavidad oral, esófago, tracto gastrointestinal, tracto pulmonar, pulmón, estómago, colon, mama, ovario, próstata, útero, endometrio, cuello uterino, vejiga urinaria, páncreas, hueso, cerebro, tejido conectivo, hígado, vesícula biliar, vejiga urinaria, riñón, piel, sistema nervioso central y testículos

5 En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados de fármacos pueden usarse como neoadyuvantes antes del tratamiento con cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia con anticuerpos desnudos, radioinmunoterapia, inmunomoduladores y similares. Estas terapias neoadyuvantes pueden permitir administrar dosis más bajas de cada agente terapéutico, reduciendo por tanto ciertos efectos secundarios graves o mejorando la eficacia de otros tratamientos como la cirugía.

10 La dosificación óptima preferida de inmunoconjugados puede incluir una dosificación de entre 3 mg/kg y 18 mg/kg, preferiblemente administrada semanalmente, dos veces por semana, cada dos semanas o cada tres semanas. El programa de dosificación óptimo puede incluir ciclos de tratamiento de dos semanas consecutivas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o semanas alternas de terapia y descanso, o una semana de terapia seguido de dos, tres o cuatro semanas de descanso, o tres semanas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o cuatro semanas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso, o cinco semanas de terapia seguido de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso, o administración una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. El tratamiento puede extenderse durante cualquier número de ciclos, preferiblemente por lo menos 2, por lo menos 4, por lo menos 6, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 14 o por lo menos 16 ciclos. La dosificación puede ser de hasta 24 mg/kg. Las dosificaciones de uso ejemplares pueden incluir 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg y 24 mg/kg. Las dosificaciones preferidas son 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o 18 mg/kg. El experto en la técnica se dará cuenta de que pueden considerarse una variedad de factores, como la edad, la salud general, la función de un órgano específico o el peso, así como los efectos de la terapia previa en sistemas de órganos específicos (por ejemplo, médula ósea) para seleccionar una dosificación óptima de inmunoconjugado, y que la dosificación y/o la frecuencia de administración pueden aumentarse o disminuirse durante el curso de la terapia. La dosificación puede repetirse según sea necesario, con evidencia de contracción del tumor observado después de tan solo 4 a 8 dosis. Las dosificaciones optimizadas y los programas de administración para uso neoadyuvante divulgados en la presente muestran una eficacia superior inesperada y una toxicidad reducida en sujetos humanos, lo que no podría haberse predicho a partir de estudios en modelos animales. Sorprendentemente, la eficacia superior permite el tratamiento de tumores que anteriormente se encontraron resistentes a una o más terapias anticáncer estándar.

35 Un resultado sorprendente con la invención como se define en las reivindicaciones es la tolerabilidad inesperada de altas dosis de conjugado de anticuerpo-fármaco, incluso con infusiones repetidas, observándose sólo toxicidades de grado relativamente bajo de náuseas y vómitos, o neutropenia manejable. Un resultado sorprendente adicional es la falta de acumulación del conjugado anticuerpo-fármaco, a diferencia de otros productos que han conjugado fármacos quimioterapéuticos con albúmina, PEG u otros portadores. La falta de acumulación se asocia con una tolerabilidad mejorada y falta de toxicidad grave incluso después de dosificaciones repetidas o aumentadas. Estos resultados sorprendentes permiten optimizar la dosificación y el programa de administración, con eficacias inesperadamente altas y una baja toxicidad. En una realización, la invención como se define en las reivindicaciones proporciona una contracción de tumores sólidos, en individuos con cánceres anteriormente resistentes, del 15% o más, preferiblemente del 20% o más, preferiblemente del 30% o más, más preferiblemente del 40% o más en tamaño (medido por el diámetro más largo). El experto en la técnica se dará cuenta de que el tamaño del tumor puede medirse mediante una variedad de técnicas diferentes, como el volumen tumoral total, el tamaño máximo del tumor en cualquier dimensión o una combinación de mediciones de tamaño en varias dimensiones. Esto puede ser con procedimientos radiológicos estándar, como tomografía computarizada, ecografía y/o tomografía por emisión de positrones. El medio para medir el tamaño es menos importante que observar una tendencia de disminución del tamaño del tumor con el tratamiento con inmunoconjugado, lo que preferiblemente da como resultado la eliminación del tumor.

Aunque el inmunoconjugado puede administrarse como una inyección de bolo periódica, en realizaciones alternativas el inmunoconjugado puede administrarse mediante infusión continua de conjugados de anticuerpo-fármaco. Para aumentar la C_{max} y extender la PK del inmunoconjugado en la sangre, puede administrarse una infusión continua, por ejemplo, mediante un catéter permanente. Tales dispositivos son conocidos en la técnica, como los catéteres HICKMAN®, BROVIAC® o PORT-A-CATH® (ver, por ejemplo, Skolnik et al., Ther Drug Monit 32:741-48, 2010) y puede usarse cualquier catéter permanente conocido. También se conocen en la técnica una variedad de bombas de infusión continua y puede usarse cualquier bomba de infusión conocida. El intervalo de dosificación para la infusión continua puede estar entre 0,1 y 3,0 mg/kg al día. Más preferiblemente, estos inmunoconjugados pueden administrarse mediante infusiones intravenosas durante períodos relativamente cortos de 2 a 5 horas, más preferiblemente de 2 a 3 horas.

65 En realizaciones particularmente preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, los inmunoconjugados y los esquemas de dosificación pueden ser eficaces en pacientes resistentes a las terapias

estándar. Por ejemplo, puede administrarse un inmunoconjugado de hMN-14-SN-38 a un paciente que no ha respondido a una terapia anterior con irinotecán, el agente original de SN-38. Sorprendentemente, el paciente resistente al irinotecán puede mostrar una respuesta parcial o incluso completa a hMN-14-SN-38. La capacidad del inmunoconjugado para dirigirse específicamente al tejido tumoral puede superar la resistencia tumoral mediante el direccionamiento mejorado y la administración potenciada del agente terapéutico. Alternativamente, un inmunoconjugado anti-CEACAM5, como hMN-14, puede coadministrarse con un inmunoconjugado anti-CEACAM6, como hMN-3 o hMN-15. Otros inmunoconjugados anticuerpo-SN-38 o anticuerpo-P2PDox pueden mostrar una eficacia mejorada y/o una toxicidad disminuida similares, en comparación con los tratamientos terapéuticos estándar alternativos, y las combinaciones de diferentes inmunoconjugados, o los ADC en combinación con un anticuerpo conjugado con un radionúclido, toxina u otro fármaco, pueden proporcionar una eficacia incluso más mejorada y/o una toxicidad reducida. Un sujeto específico preferido puede ser un paciente con cáncer de colon metastásico, un paciente con cáncer de mama triple negativo, un paciente con cáncer de mama HER+, ER+, progesterona+, un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico (NSCLC), un paciente con cáncer de páncreas metastásico, un paciente con carcinoma de células renales metastásico, un paciente con cáncer gástrico metastásico, un paciente con cáncer de próstata metastásico o un paciente con cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 **FIG. 1.** Conjugado anticuerpo-fármaco ejemplar, que muestra el anticuerpo anti-TROP-2 de hRS7 conjugado mediante un conector CL2A escindible intracelularmente con el fármaco camptotecina SN-38.
- FIG. 2A.** Estructura de la doxorubicina. "Me" es un grupo metilo.
- FIG. 2B.** Estructura de 2-pirrolinodoxorrubicina, (2-PDox). "Me" es un grupo metilo.
- FIG. 2C.** Estructura de una forma de profármaco de 2-pirrolinodoxorrubicina, (P2PDox). "Me" es un grupo metilo y "Ac" es un grupo acetilo.
- 25 **FIG. 2D.** Estructura de una forma de P2PDox activada por maleimida, para el acoplamiento de anticuerpos. "Me" es un grupo metilo y "Ac" es un grupo acetilo.
- FIG. 3A.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de NSCLC humano Calu-3.
- FIG. 3B.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de cáncer de colon humano COLO 205.
- 30 **FIG. 3C.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de cáncer de páncreas humano Capan-1.
- FIG. 3D.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de cáncer de páncreas humano BxPC-3.
- FIG. 3E.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de cáncer de pulmón de células escamosas humano SK-MES-1.
- FIG. 3F.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87.
- 35 **FIG. 4A.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de TNBC humano MDA-MB-468.
- FIG. 4B.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de TNBC humano MDA-MB-468. Los ratones portadores de tumores se trataron inicialmente con ADC de control (no dirigido). Después de permitir que crecieran los tumores, se administraron a los ratones las dosis indicadas de IMMU-132, comenzando el día 78. Incluso después de permitir que los tumores crecieran hasta un tamaño grande, el IMMU-132 fue eficaz para inducir la regresión tumoral.
- 40 **FIG. 4C.** Eficacia in vivo de IMMU-132 en xenoinjertos de TNBC humano MDA-MB-231.
- FIG. 5A.** Mejor respuesta para 14 pacientes con TNBC inscritos en el ensayo de IMMU-132-01.
- FIG. 5B.** Tiempo hasta la progresión para 14 pacientes con TNBC inscritos en el ensayo de IMMU-132-01.
- FIG. 6A.** Concentraciones séricas máximas de IMMU-132 de IgG y ADC, en función del nivel de dosis.
- 45 **FIG. 6B.** Concentraciones séricas máximas de IMMU-132 de IgG y ADC, en función del nivel de dosis cuando se normaliza al peso del paciente.
- FIG. 7A.** Farmacocinética de IgG total de IMMU-132 frente a la IMMU-132 total.
- FIG. 7B.** Farmacocinética de SN-38 de IMMU-132 total frente a SN-38 libre.
- FIG. 7C.** Depuración de IMMU-132 basado en ELISA o en la concentración de SN-38 en el suero.
- 50 **FIG. 8A.** Diferentes regímenes de dosificación de IMMU-132 en xenoinjertos de carcinoma gástrico humano NCI-N87.
- FIG. 8B.** Diferentes regímenes de dosificación de IMMU-132 en xenoinjertos de adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3.
- 55 **FIG. 9A.** Señalización apoptótica mediada por IMMU-132 en carcinoma gástrico humano NCI-N87 expuesto a 1 μ M de SN-38 libre o la cantidad equivalente de IMMU-132.
- FIG. 9B.** Escisión de PARP mediada por IMMU-132 en células de carcinoma de mama SK-BR-3 y MDA-MB 486.
- FIG. 10.** Estudios de farmacotoxicología de IMMU-132 frente a irinotecán en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas.
- 60 **FIG. 11.** Régimen de tratamiento neoadyuvante para paclitaxel +/- IMMU-132 en TNBC.
- FIG. 12.** Terapia en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de tumores humanos s.c. usando una dosis de proteína de 2,25 mg/kg (0,064 mg/kg de dosis de fármaco) de conjugados MAb-P2PDox dos veces a la semana x 2 semanas en ratones desnudos con xenoinjertos de adenocarcinoma de páncreas humano Capan-1 (n = 5).
- FIG. 13A.** Estudio MTD de conjugados hLL1-P2PDox con múltiples inyecciones. A los ratones se les administró hLL1-P2PDox (q4dx4) a 25 μ g i.v. por dosis.
- 65 **FIG. 13B.** Estudio MTD de conjugados hLL1-P2PDox con múltiples inyecciones. A los ratones se les administró

hLL1-P2PDox (q4d x 4) a 50 µg i.v. por dosis.

FIG. 13C. Estudio MTD de conjugados hLL1-P2PDox con múltiples inyecciones. A los ratones se les administró hLL1-P2PDox (q4d x 4) a 100 µg i.v. por dosis.

FIG. 13D. Estudio MTD de conjugados hLL1-P2PDox con múltiples inyecciones. A los ratones se les administró hLL1-P2PDox (q4d x 4) a 150 µg i.v. por dosis.

FIG. 14A. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administró un control de solución salina.

FIG. 14B. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administraron 45 µg de hA20-P2PDox como indican las flechas.

FIG. 14C. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administraron 45 µg de hMN-15-P2PDox como indican las flechas.

FIG. 14D. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administraron 45 µg de hRS7-P2PDox como indican las flechas.

FIG. 14E. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administraron 45 µg de hLL1-P2PDox como indican las flechas.

FIG. 14F. Eficacia in vivo de conjugados P2PDox en ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87. A los ratones se les administraron 45 µg de hMN-14-P2PDox como indican las flechas.

FIG. 15. Efecto de diferentes programas de dosificación de hRS7-P2PDox sobre la supervivencia en ratones desnudos con xenoinjertos de carcinoma gástrico humano NCI-N87.

FIG. 16. Efecto de diferentes dosis individuales de hRS7-P2PDox sobre el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma gástrico humano.

FIG. 17. Efecto de diferentes dosis individuales de hRS7-P2PDox sobre la supervivencia de ratones portadores de xenoinjertos de carcinoma gástrico humano.

FIG. 18. ADCC de varios ADC de hRS7 frente a IgG de hRS7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

En la descripción que sigue, se usan una serie de términos y se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la materia reivindicada. Los términos que no se definen expresamente en la presente se usan de acuerdo con sus significados sencillos y normales.

A menos que se especifique lo contrario, un o uno significa "uno o más".

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

Un anticuerpo, como se usa en la presente, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos recombinantes de fragmentos de genes de inmunoglobulinas normales) (por ejemplo, un anticuerpo de IgG) o una porción de unión a antígeno de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse o derivatizarse de otro modo dentro del alcance de la materia reivindicada. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.

Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) y similares, incluyendo las semi-moléculas de IgG4 citadas anteriormente (van der Neut Kolfshoten et al. (Science 2007; 317(14 de septiembre): 1554-1557). Una forma comercialmente disponible de anticuerpo de dominio único, a la que se hace referencia como nano cuerpo (ABLYNX®, Ghent, Bélgica), se analiza con más detalle a continuación. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo de uso se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye proteínas modificadas sintética o genéticamente que actúan como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten de las regiones variables, como los fragmentos "Fv" que consisten de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas de polipéptidos de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten de los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable, como las CDR. Los fragmentos Fv pueden construirse de diferentes maneras para producir formas de unión multivalentes y/o multiespecíficas. En el caso de multivalentes, tienen más de un sitio de unión contra el epítipo específico, mientras que con las formas multiespecíficas, se une más de un epítipo (ya sea del mismo antígeno o contra un antígeno y un antígeno diferente).

Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo completo (de longitud completa) que no está conjugado con un agente terapéutico. Esto es así porque la porción Fc de la molécula de anticuerpo proporciona funciones efectoras o inmunológicas, como la fijación del complemento y la ADCC (citotoxicidad celular dependiente

de anticuerpos), que ponen en acción mecanismos que pueden dar como resultado la lisis celular. Sin embargo, puede no requerirse la porción Fc para la función terapéutica del anticuerpo, sino para otros mecanismos, como apoptosis, antiangiogénesis, actividad antimetastásica, actividad antiadhesión, como inhibición de la adhesión heterotípica u homotípica e interferencia en las vías de señalización, pueden entrar en juego e interferir con la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, y fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos murinos, así como ciertos anticuerpos recombinantes, como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y fragmentos de los mismos. Como se usa en la presente, "desnudo" es sinónimo de "no conjugado" y significa no enlazado o conjugado con un agente terapéutico.

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas de anticuerpos tanto pesadas como ligeras, incluyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivarse de los de otras especies, como primates, gatos o perros.

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

Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, de ratones transgénicos que han sido "modificados" para producir anticuerpos humanos en respuesta al desafío antigénico. En esta técnica, los elementos de los loci de las cadenas pesada y ligera humana se introducen en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para varios antígenos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994), describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos. También puede construirse un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación en fagos, todos los cuales se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes del dominio variable del anticuerpo se clonan en el marco en un gen de la proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Como la partícula filamentosos contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en una variedad de formatos, para su revisión, ver, 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. Ver las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275.

Un agente terapéutico es una molécula o átomo que se administra por separado, concurrentemente o secuencialmente con una fracción de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados, fármacos, agentes citotóxicos, agentes proapoptóticos, toxinas, nucleasas (incluyendo ADNasas y ARNasas), hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, radioisótopos o radionúclidos, oligonucleótidos, ARN interferente, péptidos, agentes antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, quimiocinas, profármacos, enzimas, proteínas o péptidos de unión o combinaciones de los mismos.

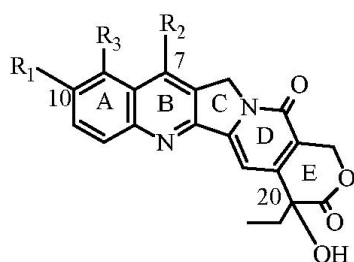
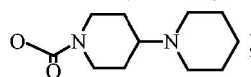
Un inmunoconjugado es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo u otro fracción de anticuerpo conjugado con un agente terapéutico. Como se usa en la presente, los términos "conjugado" e "inmunoconjugado" se usan indistintamente.

Como se usa en la presente, el término proteína de fusión de anticuerpos es una molécula de unión a antígeno producida recombinantemente en la que uno o más anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos naturales están enlazados con otra fracción, como una proteína o péptido, una toxina, una citoquina, una hormona, etc. En ciertas realizaciones preferidas, la proteína de fusión puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla iguales o diferentes fusionados entre sí, que pueden unirse al mismo epítopo, a diferentes epítopos en el mismo antígeno, o a diferentes antígenos.

Un inmunomodulador es un agente terapéutico que cuando está presente altera, suprime o estimula el sistema inmunitario del organismo. Típicamente, un inmunomodulador de uso estimula las células inmunitarias para que proliferen o se activen en una cascada de respuesta inmunitaria, como macrófagos, células dendríticas, células B y/o células T. Un ejemplo de un inmunomodulador como se describe en la presente es una citoquina, que es una proteína pequeña soluble de aproximadamente 5-20 kDa que es liberada por una población celular (por ejemplo, linfocitos T cebados) en contacto con antígenos específicos, y que actúa como un mediador intercelular entre células. Como comprenderá un experto en la técnica, los ejemplos de citoquinas incluyen linfocinas, monoquinas, interleucinas y varias moléculas de señalización relacionadas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interferones. Las quimiocinas son un subconjunto de citoquinas. Ciertas interleucinas e interferones son ejemplos de citoquinas que estimulan la proliferación de células T u otras células inmunitarias.

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

Cuadro 1

CPT: $R_1=R_2=R_3=H$ 10-Hidroxi-CPT: $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$ CPT-11: $R_1 =$; $R_2 =$ etilo; $R_3 = H$ SN-38: $R_1 = OH; R_2 =$ etilo; $R_3 = H$ Topotecán: $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = CH_2-N(CH_3)_2$

(1)

Conjugados de camptotecina

A continuación se describen los métodos y composiciones no limitativos para preparar inmunocombinados que comprenden un agente terapéutico de camptotecina unido a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. En realizaciones preferidas, la solubilidad del fármaco se potencia colocando una fracción de polietilenglicol (PEG) definido (es decir, un PEG que contiene un número definido de unidades monoméricas) entre el fármaco y el anticuerpo, en donde el PEG definido es un PEG de bajo peso molecular, conteniendo preferiblemente 1-30 unidades monoméricas, más preferiblemente conteniendo 1-12 unidades monoméricas.

Preferiblemente, un primer conector conecta el fármaco en un extremo y puede terminar con un grupo acetileno o azida en el otro extremo. Este primer conector puede comprender una fracción de PEG definido con un grupo azida o acetileno en un extremo y un grupo reactivo diferente, como ácido carboxílico o grupo hidroxilo, en el otro extremo. Dicho PEG definido bifuncional puede unirse al grupo amina de un aminoalcohol, y el grupo hidroxilo de este último puede unirse al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato. Alternativamente, la fracción no azida (o acetileno) de dicho PEG bifuncional definido puede unirse al extremo N-terminal de un L-aminoácido o un polipéptido, con el extremo C-terminal unido al grupo amino del aminoalcohol, y el grupo hidroxilo del último puede unirse al grupo hidroxilo del fármaco en forma de carbonato o carbamato, respectivamente.

Un segundo conector, que comprende un grupo de acoplamiento de anticuerpo y un grupo reactivo complementario al grupo azida (o acetileno) del primer conector, concretamente acetileno (o azida), puede reaccionar con el conjugado fármaco-(primer conector) a través de reacción de cicloadición de acetileno-azida para proporcionar un producto farmacéutico bifuncional final que es útil para conjugar con anticuerpos dirigidos a la enfermedad. El grupo de acoplamiento del anticuerpo es preferiblemente o un tiol o un grupo reactivo con tiol.

En el acoplamiento de 'química de clic' de acetileno-azida, se produce una reacción de cicloadición catalizada por cobre (+1) entre una fracción de acetileno y una fracción de azida (Kolb HC y Sharpless KB, Drug Discov Today 2003; 8:1128-37), aunque se conocen y pueden usarse formas alternativas de química de clic. La reacción utiliza una mezcla de bromuro cuproso y trifenilfosfina para permitir un acoplamiento altamente eficaz en solventes orgánicos no polares, como el diclorometano. La ventaja de la química del clic es que es quimioselectiva y complementa otras químicas de conjugación bien conocidas, como la reacción tiol-maleimida. En el siguiente análisis, cuando un conjugado comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede sustituirse con otro tipo de fracción de unión, como un péptido de direccionamiento.

A continuación se proporcionan métodos para la regeneración selectiva del grupo 10-hidroxilo en presencia

del carbonato C-20 en preparaciones de precursor de conector de fármacos que implican análogos de CPT como SN-38. También pueden usarse otros grupos protectores para grupos hidroxilo reactivos en fármacos como el hidroxilo fenólico en SN-38, por ejemplo t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo, y estos pueden ser desprotegidos por fluoruro de tetrabutilamonio antes del enlace del fármaco derivatizado con una fracción de acoplamiento de anticuerpos. El grupo 10-hidroxilo de los análogos de CPT se protege alternativamente como un éster o carbonato, distinto de "BOC", de tal manera que el CPT bifuncional se conjuga con un anticuerpo sin desprotección previa de este grupo protector. El grupo protector puede desprotegerse fácilmente en condiciones de pH fisiológico después de la administración del bioconjugado.

En la **FIG. 1** se muestra una realización ejemplar de un ADC, que ilustra la estructura de hRS7 (anti-TROP-2) conjugado a través del conector CL2A intracelularmente escindible con la camptotecina SN-38.

Los conjugados de anticuerpos y fármacos pueden purificarse mediante el método de filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de corte de 50.000 Da de peso molecular usando volúmenes de diafiltración de 25 a 30 del tampón de formulación de conjugado para purificar cientos de gramos de conjugados. Este método evita la necesidad de emplear purificaciones cromatográficas costosas y engorrosas en columnas de cromatografía de exclusión por tamaño e hidrófobas.

Los conjugados pueden formularse en tampones biológicos de Good a un pH de 6 a 7,0 y se liofilizan para su almacenamiento. Preferiblemente, el tampón de Good se selecciona del grupo que consiste de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) y ácido 1,4-piperazindietanosulfónico (PIPES), en el intervalo de pH de 6-7, preferiblemente en el intervalo de pH de 6,5 a 7, y a una concentración de tampón de 10-100 mM, preferiblemente 25 mM. El tampón de formulación más preferido es MES 25 mM, pH 6,5.

Los conjugados purificados pueden combinarse con excipientes como trehalosa y polisorbato 80, liofilizarse y almacenarse como liofilizados en el intervalo de temperatura de -20° C a 8° C.

Conjugados de antraciclina

La **FIG. 2** muestra una antraciclina ejemplar, pro-2-pirrolinodoxorrubicina (P2PDox), de uso para la conjugación para formar ADC. El compuesto original, 2-pirrolinodoxorrubicina, fue descrito por primera vez en 1996 por el grupo de Schally, que más tarde lo usó para conjugar una serie de péptidos dirigidos a receptores para exploraciones preclínicas Nagy et al., 1996a, Proc Natl Acad Sci U S A 93:7269-73; Nagy et al., 1996b, Proc Natl Acad Sci U S A 93:2464-9; Nagy et al., 1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94:652-6; Nagy et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:1794-9). Este es un derivado de la doxorubicina, con el nitrógeno de la daunosamina incorporado en una enamina de 5 miembros, lo que lo convierte en un agente alquilante muy potente, con una citotoxicidad 500-1000 veces mayor que la de la doxorubicina. La ultratotoxicidad de la droga requiere un manejo especial en aisladores, por seguridad.

Otro grupo investigó una forma de profármaco de 2-pirrolinodoxorrubicina, que divulgó un derivado de la doxorubicina, concretamente N-(4,4-diacetoxibutil)doxorubicina (Farquhar et al., 1998, J Med Chem 41:965-72; Patentes de Estados Unidos N° 5.196.522; 6.433.150), que puede convertirse en 2-pirrolinodoxorrubicina in vivo. Este derivado se preparó mediante alquilación reductora de doxorubicina con 4,4-diacetoxibutiraldehído. Sin embargo, este profármaco no se unió a un anticuerpo u otra molécula de direccionamiento usando un grupo lábil a los ácidos, como la hidrazona, como conector escindible, en los tioles de los anticuerpos reducidos con disulfuro.

Varios de los ejemplos siguientes utilizan P2PDox como fármaco en el ADC para uso neoadyuvante. Esto tiene varias ventajas: (i) manipular solo el profármaco, mitigando de este modo los problemas de seguridad; (ii) la materia prima doxorubicina (Dox) está disponible en cantidad en el grado cGMP; y (iii) la química de convertir Dox en P2PDox activado (P2PDox) implica solo unos pocos pasos sintéticos. La **FIG. 2A-2D** muestra las estructuras de Dox, 2-PDox, P2PDox (P2PDox) y P2PDox activado. Para el acoplamiento a IgG, activamos P2PDox con SMCC-hidrazida, un procedimiento que introduce hidrazona lábil a los ácidos, así como el grupo maleimida, este último para la conjugación a tioles de anticuerpo levemente reducido.

La elección de 2-pirrolinodoxorrubicina como uno de los fármacos para uso neoadyuvante de ADC, en particular su forma de profármaco para la conjugación con MAb, permite un rápido desarrollo de inmunoconjugados, ya que la materia prima doxorubicina está fácilmente disponible en el grado cGMP. La cetona en P2PDox proporciona un asidero para incorporar hidrazona lábil a los ácidos y grupos maleimida que se unen a anticuerpos en un solo paso. La derivatización del grupo amino de la doxorubicina en la versión 2-PDox debería superar la resistencia a múltiples fármacos asociada con la doxorubicina, en base a los precedentes de la bibliografía (Farquhar et al., 1998, 41: 965-72; Guillemard & Uri, 2004, Oncogene 23:3613-21). El diseño proporciona una opción para añadir grupos hidrófilos en el conector o la porción de N-alquilo, si se desea, para propósitos de radiomarcado y/o modulación adicional de la dosis administrable, sin afectar a la estructura de 2-pirrolinodoxorrubicina activa que se genera in vivo.

La mayoría de los ADC que actualmente están siendo examinados por otros incorporan maitansinoides y auristatinas ultratóxicos que actúan como tubulina, que son específicos de la fase del ciclo celular. De manera anecdótica, a excepción de trastuzumab-DM1, estos ADC parecen mostrar un índice terapéutico relativamente estrecho clínicamente en cánceres sólidos. Un agente alquilante de ADN, como 2-PDox, no es específico de la fase del ciclo celular. El ADC propuesto, basado en un componente farmacológico que actúa mediante un mecanismo diferente de destrucción de células, un anticuerpo de internalización que muestra una mayor especificidad para el cáncer que muchos otros, como MAbs de EpCAM, y la química de enlace, ofrece una desviación de otros ADC ultratóxicos, y proporciona un índice terapéutico mejorado. Como se muestra a continuación, los estudios preclínicos realizados hasta la fecha en modelos agresivos de xenoinjerto de cánceres de páncreas, mama, y gástricos muestran que el conjugado hRS7-P2PDox es muy activo en dosis bajas y seguras, lo que lleva a regresiones completas. Los estudios en ratones portadores de tumores sólidos y hematológicos humanos tratados con una variedad de anticuerpos dirigidos a dichos tumores y conjugados con P2PDox también muestran un excelente control tumoral (retraso o regresión del crecimiento, en comparación con los grupos de control), incluso a dosis poco frecuentes, con toxicidades limitantes de las dosis debido principalmente a la neutropenia, que se controla ajustando las dosis para que sean más bajas que la dosis máxima tolerada (MTD), habitualmente una dosis que da como resultado un 5% o menos de mortalidad. Los estudios apoyan el uso neoadyuvante de conjugados anticuerpo-P2PDox.

20 Técnicas generales de anticuerpos

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno objetivo son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Brevemente, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando a ratones una composición que comprende un antígeno, extrayendo el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

Varias técnicas, como la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden implicar procedimientos de clonación y construcción de anticuerpos. Las secuencias de unión a antígeno V_k (cadena ligera variable) y V_H (cadena pesada variable) para un anticuerpo de interés pueden obtenerse mediante una variedad de procedimientos de clonación molecular, como RT-PCR, 5'-RACE y selección de bibliotecas de ADNc. Los genes V de un anticuerpo de una célula que expresa un anticuerpo murino pueden clonarse mediante amplificación por PCR y secuenciarse. Para confirmar su autenticidad, los genes V_L y V_H clonados pueden expresarse en cultivo celular como un Ab quimérico como se describe en Orlandi et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 3833 (1989)). En base a las secuencias del gen V , puede diseñarse y construirse un anticuerpo humanizado como se describe en Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

El ADNc puede prepararse a partir de cualquier línea de hibridoma conocida o línea celular transfectada que produzca un anticuerpo murino mediante técnicas generales de clonación molecular (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory manual, 2ª edición (1989)). La secuencia V_k para el anticuerpo 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 pueden amplificarse usando el par de cebadores VH1BACK/VH1FOR (Orlandi et al., 1989) o los cebadores que se aparean con la región constante de IgG murina descritos por Leung et al. (*Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los genes V humanizados pueden construirse mediante una combinación de síntesis de plantilla de oligonucleótidos largos y amplificación por PCR como se describe en Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

Los productos de PCR para V_k pueden subclonarse en un vector de estadificación, 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 pueden subclonarse en un vector de estadificación similar, como el VHpBS basado en pBluescript. Los casetes de expresión que contienen las secuencias V_k y V_H junto con el promotor y las secuencias del péptido señal pueden escindirse de VKpBR y VHpBS y ligarse en vectores de expresión apropiados, como pKh y pG1g, respectivamente (Leung et al., *Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los vectores de expresión pueden cotransfectarse en una célula apropiada y se monitorizan los fluidos sobrenadantes para la producción de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Alternativamente, los casetes de expresión de V_k y V_H L pueden escindirse y subclonarse en un único vector de expresión, como pHL2, como se describe en Gillies et al. (*J. Immunol. Methods* 125:191 (1989) y también se muestra en Losman et al., *Cancer*, 80:2660 (1997)).

En una realización alternativa, los vectores de expresión pueden transfectarse en células huésped que se han adaptado previamente para la transfección, el crecimiento y la expresión en un medio libre de suero. Las líneas celulares ejemplares que pueden usarse incluyen las líneas celulares Sp/EEE, Sp/ESF y Sp/ESF-X (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 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, se exponen a metotrexato para amplificar las secuencias génicas transfectadas y se adaptan previamente a la línea celular libre de suero para la expresión de proteínas.

5 *Anticuerpos quiméricos y humanizados*

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, incluyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos muestran inmunogenicidad disminuida y estabilidad aumentada cuando se administran a un sujeto. Los métodos para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Leung et al., 1994, *Hybridoma* 13:469).

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

Otros ejemplos pueden referirse a anticuerpos de primates no humanos. Las técnicas generales para generar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg et al., WO 91/11465 (1991), y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990). En otra realización, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos que han sido modificados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta al desafío antigénico, como se analiza a continuación.

Anticuerpos humanos

En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos completamente humanos usando 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; Brekke y Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). Se espera que tales anticuerpos completamente humanos muestren incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que funcionen in vivo como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En ciertos ejemplos, los métodos y procedimientos divulgados pueden utilizar anticuerpos humanos producidos mediante tales técnicas.

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

En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. En general, el ARN total se obtuvo a partir de linfocitos sanguíneos circulantes (Id.). Los Fab recombinantes se clonaron a partir de los repertorios de anticuerpos de las cadenas 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 elaborar bibliotecas de ADNc de Fab utilizando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-97). La construcción de la biblioteca se realizó de acuerdo con Andris-Widhopf et al. (2000, en: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (Eds), 1ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY págs. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para elaborar la biblioteca de presentación en fagos. Tales bibliotecas pueden seleccionarse mediante métodos estándar de presentación en fagos. El experto en la técnica se dará cuenta de que esta técnica es ejemplar solamente y puede utilizarse cualquier método conocido para elaborar y seleccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos mediante presentación en fagos.

En otra alternativa, pueden usarse animales transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier objetivo inmunogénico, usando protocolos de inmunización estándar como se ha analizado anteriormente. Métodos para obtener

anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., Nature Genet. 7:13(1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994) y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994). Un ejemplo no limitativo de tal sistema es el XenoMouse® (por ejemplo, Green et al., 1999, J. Immunol. Methods 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XenoMouse® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón han sido inactivados y reemplazados por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunitario del ratón permanece intacto.

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

Producción de fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Métodos ejemplares para producir fragmentos de anticuerpos se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 4.036.945; Patente de Estados Unidos N° 4.331.647; Nisonoff et al., 1960, Arch Biochem Biophys, 89:230; Porter, 1959, Biochem. J. 73:119; Edelman et al., 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, página 422 (Academic Press), y Coligan et al. (eds.), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley & Sons).

También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, la 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. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al., 1972, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69:2659. Alternativamente, las cadenas variables pueden enlazarse mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante productos químicos como el glutaraldehído. Ver Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L, conectados por una secuencia conectora de oligonucleótidos. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que posteriormente se introduce en una célula huésped, como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv son bien conocidos en la técnica. Ver Whitlow et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird et al., 1988, Science, 242:423; Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271 y Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único (dAb), al que a veces se hace referencia como anticuerpo de cadena sencilla. Las técnicas para producir anticuerpos de dominio único son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Cossins et al., Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao et al., Molec Immunol 06, 43:1912-19; Tanha et al., J. Biol. Chem. 2001, 276:24774-780). Otros tipos de fragmentos de anticuerpos pueden comprender una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpos. Ver Larrick et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter et al. (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, páginas 166-179 (Cambridge University Press); Birch et al., (Eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc.)

Variaciones de anticuerpos

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, las secuencias de anticuerpos, como las porciones Fc de los anticuerpos, pueden variarse para optimizar las características fisiológicas de los conjugados, como la vida media en suero. Los métodos de sustitución de secuencias de aminoácidos en proteínas son ampliamente conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory manual, 2ª Ed, 1989). En realizaciones preferidas, la variación puede implicar la adición o eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia Fc (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.254.868). En otras realizaciones preferidas, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos específicas en la secuencia Fc (por ejemplo, Hornick et al., 2000, J Nucl Med 41:355-62; Hinton et al., 2006, J Immunol 176:346-56; Petkova et al.2006, Int Immunol 18:1759-69; Patente de Estados Unidos N° 7.217.797).

Alotipos de anticuerpos

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

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

El alotipo G1m1 humano comprende los aminoácidos ácido aspártico en la posición 356 de Kabat y leucina en la posición 358 de Kabat en la secuencia CH3 de la IgG1 de cadena pesada. El alotipo nG1m1 comprende los aminoácidos ácido glutámico en la posición 356 de Kabat y metionina en la posición 358 de Kabat. Ambos alotipos G1m1 y nG1m1 comprenden un residuo de ácido glutámico en la posición 357 de Kabat y a los alotipos a veces se hace referencia como alotipos DEL y EEM. A continuación se muestra un ejemplo no limitativo de las secuencias de la región constante de la cadena pesada para los anticuerpos del alotipo G1m1 y nG1m1 para los anticuerpos ejemplares rituximab (SEQ ID NO: 1) y veltuzumab (SEQ ID NO: 2).

Secuencia de la región variable de la cadena pesada de rituximab (SEQ ID NO: 1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
 YTQKLSLSLSPGK

Región variable de la cadena pesada de Veltuzumab (SEQ ID NO: 2)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH

TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 5 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH
 10 YTQKSLSLSPGK

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

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

Tabla 1. Alotipos de Rituximab frente a Veltuzumab

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

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

Anticuerpos conocidos

En varias realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, pueden usarse una variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos de uso pueden obtenerse comercialmente de varias fuentes conocidas. Por ejemplo, una variedad de líneas de hibridomas secretoras de anticuerpos están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Independientemente de lo mismo, se han depositado en la ATCC un gran número de anticuerpos contra varios objetivos de enfermedades, incluyendo pero no limitados a, antígenos asociados a tumores, y/o se han publicado secuencias de regiones variables y están disponibles para su uso en los métodos y composiciones reivindicados. Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 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; 5 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.155; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 10 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. Estas son sólo ejemplares y en la técnica se conocen una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto en la técnica se dará cuenta de que las secuencias de anticuerpos o los hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a la enfermedad pueden obtenerse mediante una simple búsqueda en las bases de datos de la ATCC, NCBI y/o USPTO de anticuerpos contra un objetivo de interés asociado a la 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 (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 7.531.327; 7.537.930; 7.608.425 y 7.785.880.

Los anticuerpos particulares que pueden ser de utilidad en los métodos y composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, LL1 (anti-CD74), LL2 o RFB4 (anti-CD22), veltuzumab (hA20, anti-CD20), rituxumab (anti-CD20), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), lambrolizumab (anti-receptor de PD-1), nivolumab (anti-receptor de PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), PAM4 o KC4 (ambos anti-mucina), MN-14 (antígeno anticarcinoma embrionario (CEA, también conocido como CD66e o CEACAM5), MN-15 o MN-3 (anti-CEACAM6), Mu-9 (antígeno p específico anti-colon), Immu31 (una anti-alfa-fetoproteína), R1 (anti-IGF-1R), A19 (anti-CD19), TAG-72 (por ejemplo, CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (un MAbs IX anti-anhidrasa carbónica), L243 (anti-HLA-DR) alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetan (anti-CD20); panitumumab (anti-EGFR); tositumomab (anti-CD20); PAM4 (también conocido como clivatuzumab, anti-mucina) y trastuzumab (anti-ErbB2). Tales anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.686.072; 5.874.540; 6.107.090; 6.183.744; 6.306.393; 6.653.104; 6.730.300; 6.899.864; 6.926.893; 6.962.702; 7.074.403; 7.230.084; 7.238.785; 7.238.786; 7.256.004; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.585.491; 7.612.180; 7.642.239; y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001. Los anticuerpos específicos conocidos de uso incluyen hPAM4 (Patente de Estados Unidos N° 7.282.567), hA20 (Patente de Estados Unidos N° 7.151.164), hA19 (Patente de Estados Unidos N° 7.109.304), hIMMU-31 (Patente de Estados Unidos N° 7.300.655), hLL1 (Patente de Estados Unidos N° 7.312.318.), hLL2 (Patente de Estados Unidos N° 5.789.554), hMu-9 (Patente de Estados Unidos N° 7.387.772), hL243 (Patente de Estados Unidos N° 7.612.180), hMN-14 (Patente de Estados Unidos N° 6.676.924), hMN-15 (Patente de Estados Unidos N° 8,287,865), hR1 (Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/772.645), hRS7 (glicoproteína 1 antiepitelial (EGP-1, también conocida como TROP-2) (Patente de Estados Unidos N° 7.238.785), hMN-3 (Patente de Estados Unidos N° 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (Solicitud de Patente de Estados Unidos 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

Otros antígenos útiles que pueden ser dirigidos usando los conjugados descritos incluyen anhidrasa carbónica IX, alfa-fetoproteína (AFP), α -actinina-4, A3, antígeno específico para el anticuerpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCL19, CCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 α , antígeno p específico de colon (CSAp), CEACAM5, CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL -15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina de cáncer de páncreas, PD-1, PD-L1, receptor de PD-1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa de ácido prostático, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF- α , antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich,

antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl -6, Kras, un marcador oncogénico y un producto oncogénico (ver, por ejemplo, Sensi et al., *Clin Cancer Res* 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., *J Immunol* 2007, 178:1975-79; Novellino et al. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:187-207).

Un análisis completo de los objetivos de antígenos adecuados (designación de grupo o CD) en células malignas hematopoyéticas, como se muestra en la citometría de flujo y que puede ser una guía para seleccionar anticuerpos adecuados para la inmunoterapia conjugada con fármacos, es Craig and Foon, *Blood* prepublicado en línea el 15 de enero de 2008; DOI 10.1182/blood-2007-11-120535.

Los antígenos CD66 consisten de cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia de genes del antígeno carcinoembrionario (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, células epiteliales normales del tracto digestivo y células tumorales de varios tejidos. También se incluyen como objetivos adecuados para cánceres los antígenos de cáncer de testículo, como NY-ESO-1 (Theurillat et al., *Int. J. Cancer* 2007; 120(11): 2411-7), así como CD79a en leucemia mieloide (Kozlov et al., *Cancer Gent. Cytogenet.* 2005; 163(1):62-7) y también enfermedades de células B, y CD79b para linfoma no Hodgkin (Poison et al., *Blood* 110(2):616-623). Varios de los antígenos mencionados anteriormente se divulgan en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de serie 60/426,379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", presentada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, que se atribuyen a poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a la terapia (Hill y Penz, *J. Natl. Cancer Inst.* 2007; 99:1435-40), tienen antígenos que pueden dirigirse a ciertos tipos de cáncer, como CD133 en el cáncer de próstata (Maitland et al., *Ernst Schering Found. Sympos. Proc.* 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Donnenberg et al., *J. Control Release* 2007; 122(3):385-91), y glioblastoma (Beier et al., *Cancer Res.* 2007; 67(9):4010-5) y CD44 en cáncer colorrectal (Dalerba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1030-7), y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104(3):973-8). Otro objetivo útil para la terapia del cáncer de mama es el antígeno LIV-1 descrito por Taylor et al. (*Biochem. J.* 2003; 375: 51-9).

Para la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos dirigidos adecuados contra, por ejemplo, CD38 y CD138 (Stevenson, *Mol Med* 2006; 12(11-12): 345-346; Tassone et al., *Blood* 2004; 104(12):3688-96), CD74 (Stein et al., *ibid.*), CS1 (Tai et al., *Blood* 2008; 112(4):1329-37 y CD40 (Tai et al., 2005; *Cancer Res.* 65(13):5898-5906).

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un regulador importante de la inmunidad y la apoptosis innata y adaptativa. Se ha informado de que CD74 es el receptor endógeno de MIF (Leng et al., 2003, *J Exp Med* 197 1467-76). El efecto terapéutico de los anticuerpos anti-CD74 antagonistas sobre las vías intracelulares mediadas por MIF puede ser útil para el tratamiento de una amplia gama de estados patológicos, como cánceres de vejiga, próstata, mama, pulmón, colon y leucemia linfocítica crónica (por ejemplo, Meyer-Siegler et al., 2004, *BMC Cancer* 12:34; Shachar y Haran, 2011, *Leuk Lymphoma* 52:1446-54). El milatuzumab (hLL1) es un anticuerpo anti-CD74 ejemplar de uso terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por MIF.

Los anticuerpos anti-TNF- α son conocidos en la técnica y pueden ser útiles para tratar el cáncer. Los anticuerpos conocidos contra TNF- α incluyen el anticuerpo humano CDP571 (Ofei et al., 2011, *Diabetes* 45:881-85); anticuerpos murinos MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B y M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL); infliximab (Centocor, Malvern, PA); certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica); y adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL). Estos y muchos otros anticuerpos anti-TNF- α conocidos pueden usarse en los métodos y composiciones divulgados.

Los anticuerpos inhibidores de puntos de control se han usado principalmente en terapia contra el cáncer. Los puntos de control inmunitarios se refieren a las vías inhibitorias del sistema inmunitario que son responsables de mantener la auto-tolerancia y modular el grado de respuesta del sistema inmunitario para minimizar el daño tisular periférico. Sin embargo, las células tumorales también pueden activar los puntos de control del sistema inmunitario para disminuir la eficacia de la respuesta inmunitaria contra los tejidos tumorales. Pueden usarse anticuerpos inhibidores de puntos de control ejemplares contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4, también conocido como CD152), la proteína 1 de muerte celular programada (PD1, también conocida como CD279) y el ligando 1 de la muerte celular programada 1 (PD-L1, también conocido como CD274), en combinación con uno o más de otros agentes para potenciar la eficacia de la respuesta inmunitaria contra células o tejidos cancerosos. Los anticuerpos anti-PD1 ejemplares incluyen lambrolizumab (MK-3475, MERCK), nivolumab (BMS-936558, BRISTOL-MYERS SQUIBB), AMP-224 (MERCK) y pidilizumab (CT-011, CURETECH LTD.). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles comercialmente, por ejemplo, de ABCAM® (AB137132), BIOLEGEND® (EH12.2H7, RMP1-14) y AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (J105, J116, MIH4). Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares incluyen MDX-1105 (MEDAREX), MEDI4736 (MEDIMMUNE) MPDL3280A (GENENTECH) y BMS-936559 (BRISTOL-MYERS SQUIBB). Los anticuerpos anti-PD-L1 también están disponibles comercialmente, por ejemplo de AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Los anticuerpos anti-CTLA4 ejemplares incluyen ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y

tremelimumab (PFIZER). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles comercialmente, por ejemplo, de ABCAM® (AB134090), SINO BIOLOGICAL INC. (11159-H03H, 11159-H08H) y THERMO SCIENTIFIC PIERCE (PA5-29572, PA5-23967, PA5-26465, MA1-12205, MA1-35914). El ipilimumab ha recibido recientemente la aprobación de la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico (Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89).

Pueden usarse preferiblemente anticuerpos que se internalizan rápidamente y luego vuelven a expresarse, procesarse y presentarse en las superficies celulares, lo que permite la absorción y acumulación continuas de conjugado circulante por la célula. Un ejemplo de una pareja de anticuerpo/antígeno más preferida es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariante, chaperona específica de clase II, li) (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.653.104; 7312.318). El antígeno CD74 se expresa en gran medida en linfomas de células B (incluido el mieloma múltiple) y leucemias, ciertos linfomas de células T, melanomas, cánceres de colon, pulmón y riñón, glioblastomas y algunos otros cánceres (Ong et al., Immunology 98:296-302 (1999)). En Stein et al., Clin Cancer Res. 15 de septiembre de 2007; 13(18 Pt 2): 5556s-5563s e incluye una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer.

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

En la puesta en práctica de los métodos y composiciones divulgados pueden usarse como inmunoconjugados los anticuerpos analizados anteriormente y otros anticuerpos conocidos contra antígenos asociados a tumores pueden usarse como inmunoconjugados.

30 **Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos**

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en una serie de aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de superficie de células tumorales y para un receptor de superficie de células T puede dirigir la lisis de células tumorales específicas por células T. Los anticuerpos biespecíficos que reconocen los gliomas y el epítipo CD3 en las células T se han usado con éxito en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. Lancet. 1990; 355:368-371). En ciertas realizaciones, las técnicas y composiciones para la conjugación de agentes terapéuticos divulgadas en la presente pueden usarse con anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos como fracciones de anticuerpos.

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

Otro método para producir anticuerpos biespecíficos usa reticuladores heterobifuncionales para sujetar químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes (Staerz, et al. Nature. 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature. 1985; 316:354-356). Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse mediante la reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales originales a las respectivas semimoléculas, que luego se mezclan y se dejan reoxidar para obtener la estructura híbrida (Staerz y Bevan. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83:1453-1457). Otra alternativa implica reticular químicamente dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado usando conectores apropiados. (Ver, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea 0453082).

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

Los dominios V_H y V_L cognados pueden unirse con un conector peptídico de composición y longitud apropiadas (que habitualmente consiste de más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv de cadena sencilla (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de scFv se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 y la Patente de Estados Unidos N° 5.132.405. La reducción de la longitud del conector peptídico a menos de 12 residuos de aminoácidos evita el apareamiento de los dominios V_H y V_L en la misma cadena y fuerza el apareamiento de los dominios V_H y V_L con dominios complementarios en otras cadenas, lo que

da como resultado la formación de multímeros funcionales. Las cadenas polipeptídicas de los dominios V_H y V_L que están unidas con conectores de entre 3 y 12 residuos de aminoácidos forman predominantemente dímeros (denominados diacuerpos). Con conectores entre 0 y 2 residuos de aminoácidos, se favorecen los trímeros (denominados triacuerpos) y los tetrámeros (denominados tetracuerpos), pero los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición y de la orientación de los dominios V (V_H -conector- V_L o V_L -conector- V_H), además de la longitud del conector.

Estas técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos presentan varias dificultades en términos de bajo rendimiento, necesidad de purificación, baja estabilidad o la laboriosidad de la técnica. Más recientemente, se han usado constructos biespecíficos conocidos como "DOCK-AND-LOCK™" (DNL™) para producir combinaciones de prácticamente cualquier anticuerpo, fragmento de anticuerpo y otras moléculas efectoras deseados (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y USSN 11/925.408). La técnica utiliza dominios de unión a proteínas complementarios, a los que se ha hecho referencia como dominios de anclaje (AD) y dominios de dimerización y acoplamiento (DDD), que se unen entre sí y permiten el ensamblaje de estructuras complejas, que varían de dímeros, trímeros, tetrámeros, quintámeros y hexámeros. Estos forman complejos estables con alto rendimiento sin el requisito de una purificación extensa. La técnica permite el ensamblaje de anticuerpos mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos. Puede utilizarse cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para elaborar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos.

Las combinaciones de uso, como las preferidas para las terapias contra el cáncer, incluyen anticuerpos CD20 + CD22, anticuerpos CD74 + CD20, anticuerpos CD74 + CD22, anticuerpos CEACAM5 (CEA) + CEACAM6 (NCA), factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF) + anticuerpos CEACAM5, anticuerpos EGP-1 (por ejemplo, RS-7) + ILGF, anticuerpos CEACAM5 + EGFR. Tales anticuerpos no solo necesitan usarse en combinación, sino que pueden combinarse como proteínas de fusión de varias formas, como IgG, Fab, scFv y similares, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.083.477; 6.183.744 y 6.962.702 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20030124058; 20030219433; 20040001825; 20040202666; 20040219156; 20040219203; 20040235065; 20050002945; 20050014207; 20050025709; 20050079184; 20050169926; 20050175582; 20050249738; 20060014245 y 20060034759.

30 **Predireccionamiento**

También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos en técnicas de predireccionamiento. El predireccionamiento es un proceso de múltiples pasos desarrollado originalmente para resolver la depuración sanguínea lenta de los anticuerpos de direccionamiento directamente, lo que contribuye a una toxicidad indeseable para los tejidos normales como la médula ósea. Con el predireccionamiento, se une un radionúclido u otro agente terapéutico a una molécula de administración pequeña (constructo direccionable) que se depura de la sangre en cuestión de minutos. En primer lugar, se administra un anticuerpo biespecífico o multiespecífico de predireccionamiento, que tiene sitios de unión para el constructo direccionable así como un antígeno objetivo, se deja que el anticuerpo libre se depure de la circulación y luego se administra el constructo direccionable.

Los métodos de predireccionamiento se divulgan, por ejemplo, en Goodwin et al., Patente de Estados Unidos Nº 4.863.713; Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29: 226, 1988; Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr et al., J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klibanov et al., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn et al., J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter et al., Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli et al., Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; Patente de Estados Unidos Nº 5.256.395; Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650, 1991; Yuan et al., Cancer Res. 51:3119, 1991; Patentes de Estados Unidos Nº 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.

Puede proporcionarse un método de predireccionamiento para tratar o diagnosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto: (1) administrando al sujeto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico; (2) administrando opcionalmente al sujeto una composición de depuración y permitiendo que la composición depure el anticuerpo de la circulación; y (3) administrando al sujeto el constructo direccionable, que contiene uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico quelados o unidos químicamente, como SN-38 o P2PDox. Puede usarse una técnica de predireccionamiento como un paso en la terapia neoadyuvante.

Constructos direccionables

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, pueden seleccionarse péptidos de constructos direccionables marcados con uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico para su uso en el predireccionamiento para que se unan a un anticuerpo biespecífico con uno o más sitios de unión para un péptido de constructo direccionable y uno o más sitios de unión para un antígeno objetivo asociado con una enfermedad o afección. Pueden usarse anticuerpos biespecíficos en una técnica de predireccionamiento en la que el anticuerpo puede administrarse primero a un sujeto. Puede dejarse un tiempo suficiente para que el anticuerpo biespecífico se una a un antígeno objetivo y para que el anticuerpo no unido se depure de la circulación. Luego,

puede administrarse al sujeto un constructo direccionable, como un péptido marcado, y dejar que se una al anticuerpo biespecífico y se localice en la célula o tejido enfermo.

5 Tales constructos direccionables pueden tener una estructura diversa y se seleccionan no solo por la disponibilidad de un anticuerpo o fragmento que se une con alta afinidad al constructo direccionable, sino también para una rápida depuración in vivo cuando se usan dentro del método de predireccionamiento y anticuerpos biespecíficos (bsAb) o anticuerpos multiespecíficos. Los agentes hidrófobos son los mejores para provocar respuestas inmunes fuertes, mientras que los agentes hidrófilos se prefieren para una rápida depuración in vivo. Así, se establece un equilibrio entre carácter hidrófobo e hidrófilo. Esto puede lograrse, en parte, usando agentes
10 quelantes hidrófilos para compensar la hidrofobicidad inherente de muchas fracciones orgánicas. Además, pueden elegirse subunidades del constructo direccionable que tengan propiedades de solución opuestas, por ejemplo, péptidos, que contienen aminoácidos, algunos de los cuales son hidrófobos y algunos de los cuales son hidrófilos.

15 Pueden usarse péptidos que tengan tan solo dos residuos de aminoácidos, preferiblemente de dos a diez residuos, y también pueden acoplarse a otras fracciones, como agentes quelantes. El conector debe ser un conjugado de bajo peso molecular, preferiblemente con un peso molecular de menos de 50.000 daltons, y ventajosamente menos de aproximadamente 20.000 daltons, 10.000 daltons o 5.000 daltons. Más habitualmente, el péptido de constructo direccionable tendrá cuatro o más residuos y uno o más haptenos para unirse, por ejemplo, a un anticuerpo biespecífico. Los haptenos ejemplares pueden incluir In-DTPA (ácido indio-
20 dietilentriaminopentaacético) o HSG (histamina succinil glicina). El constructo direccionable también puede comprender una o más fracciones quelantes, como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), NOTA (ácido 1,4,7-triaza-ciclononano-1,4,7-triacético), TETA (ácido p-bromoacetamido-bencil-tetraetilaminetetraacético), NETA ([ácido 2-(4,7-biscarboximetil[1,4,7]triazaciclononano-1-il-etil)-2-carbonilmetil-amino]acético) u otras fracciones quelantes conocidas. Las fracciones quelantes pueden usarse, por ejemplo, para
25 unirse a un radionúclido terapéutico o de diagnóstico, ion paramagnético o agente de contraste.

El constructo direccionable también puede comprender aminoácidos no naturales, por ejemplo, D-aminoácidos, en la estructura de la cadena principal para aumentar la estabilidad del péptido in vivo. En realizaciones alternativas, pueden usarse otras estructuras de cadena principal como las construidas a partir de
30 aminoácidos no naturales o peptoides.

Los péptidos usados como constructos direccionables se sintetizan convenientemente en un sintetizador de péptidos automatizado usando un soporte de fase sólida y técnicas estándar de desprotección ortogonal repetitiva y acoplamiento. Los grupos amino libres en el péptido, que se usarán más tarde para la conjugación de fracciones
35 quelantes u otros agentes, se bloquean ventajosamente con grupos protectores estándar como un grupo Boc, mientras que los residuos N-terminales pueden acetilarse para aumentar la estabilidad en suero. Tales grupos protectores son bien conocidos por el experto en la técnica. Ver Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.). Cuando los péptidos se preparan para su uso posterior dentro del sistema de anticuerpos biespecíficos, ventajosamente se escinden de las resinas para generar las correspondientes amidas C-terminales, para inhibir la actividad de carboxipeptidasa in vivo.
40

Cuando se usa predireccionamiento con anticuerpos biespecíficos, el anticuerpo contendrá un primer sitio de unión para un antígeno producido por o asociado con un tejido objetivo y un segundo sitio de unión para un hapteno en el constructo direccionable. Los haptenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, HSG e In-DTPA. Los anticuerpos producidos contra el hapteno HSG son conocidos (por ejemplo, anticuerpo 679) y pueden incorporarse fácilmente en el anticuerpo biespecífico apropiado (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.962.702; 7.138.103 y 7.300.644). Sin embargo, otros haptenos y anticuerpos que se unen a ellos son conocidos en la técnica y pueden usarse, como In-DTPA y el anticuerpo 734 (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 7.534.431).
45

50 DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)

En realizaciones preferidas, un anticuerpo bivalente o multivalente se forma como un complejo DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143 y 7.666.400). Generalmente, la técnica aprovecha las interacciones de unión específicas y de alta afinidad que se producen entre una secuencia de dimerización y dominio de acoplamiento (DDD) de las subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y una secuencia de dominio de anclaje (AD) derivada de cualquiera de una variedad de proteínas AKAP (Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579:3264. Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5:959). Los péptidos de DDD y AD pueden unirse a cualquier proteína, péptido u otra molécula. Como las secuencias de DDD se dimerizan espontáneamente y se unen a la secuencia de AD, la técnica permite la
60 formación de complejos entre cualquier molécula seleccionada que pueda unirse a las secuencias de DDD o AD.

Aunque el complejo DNL™ estándar comprende un trímero con dos moléculas enlazadas a DDD unidas a una molécula enlazada a AD, las variaciones en la estructura del complejo permiten la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y otros multímeros. En algunas realizaciones, el complejo DNL™ puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que se unen al mismo
65

determinante antigénico o a dos o más antígenos diferentes. El complejo DNL™ también puede comprender uno o más efectores diferentes, como proteínas, péptidos, inmunomoduladores, citoquinas, interleucinas, interferones, proteínas de unión, ligandos peptídicos, proteínas portadoras, toxinas, ribonucleasas como onconasa, oligonucleótidos inhibidores como ARNip, antígenos o xenoantígenos, polímeros como PEG, enzimas, agentes terapéuticos, hormonas, agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos o cualquier otra molécula o agregado.

La PKA, que desempeña un papel central en una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas desencadenadas por la unión del segundo cAMP mensajero a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968;243:3763). La estructura de la holoenzima 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). Por tanto, las cuatro isoformas de las subunidades reguladoras de PKA son RI α , RI β , RII α y RII β . Las subunidades R se han aislado sólo como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consiste de los primeros 44 residuos amino-terminales de RII α (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999;6:222). Como se analiza a continuación, porciones similares de las secuencias de aminoácidos de otras subunidades reguladoras están implicadas en la dimerización y el acoplamiento, cada una localizada cerca del extremo N-terminal de la subunidad reguladora. La unión de cAMP a las subunidades R lleva a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de serina/treonina quinasa, que se orientan hacia sustratos seleccionados a través de la compartimentación de PKA a través de su acoplamiento con AKAP (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990;265:21561)

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

Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD de las subunidades reguladoras de PKA humana y el AD de AKAP como una excelente pareja de módulos conectores para acoplar dos entidades cualquiera, a las que se hará referencia como **A** y **B** en lo sucesivo, en un complejo no covalente, que podría ser bloqueado adicionalmente en un complejo DNL™ mediante la introducción de residuos de cisteína tanto en el DDD como en el AD en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del enfoque es la siguiente. La entidad **A** se construye enlazando una secuencia de DDD a un precursor de **A**, lo que da como resultado un primer componente al que se hará referencia en lo sucesivo como **a**. Como la secuencia de DDD afectaría a la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto de **a₂**. La entidad **B** se construye enlazando una secuencia de AD a un precursor de **B**, lo que da como resultado un segundo componente al que se hará referencia en lo sucesivo como **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a₂** creará un sitio de acoplamiento para unirse a la secuencia de AD contenida en **b**, facilitando por tanto una asociación fácil de **a₂** y **b** para formar un complejo trimérico binario compuesto por **a₂b**. Este evento de unión se vuelve irreversible con una reacción posterior para asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, lo que se produce de manera muy eficiente en base al principio de concentración local eficaz porque las interacciones de unión iniciales deben llevar los grupos thiol reactivos colocados tanto en el DDD como en el AD en proximidad (Chmura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98:8480) para ligar específicamente el sitio. Usando varias combinaciones de conectores, módulos adaptadores y precursores, puede producirse y usarse una amplia variedad de constructos de DNL™ de diferente estequiometría (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y 7.666.400).

Al unir el DDD y el AD lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que tales ligaciones específicas del sitio conserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y potencialmente puede aplicarse para enlazar, de manera específica de sitio y covalentemente, una amplia variedad de sustancias, incluyendo péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras fracciones efectoras con una amplia variedad de actividades. Utilizando el método de la proteína de fusión para construir efectores conjugados con AD y DDD descrito en los Ejemplos siguientes, puede incorporarse virtualmente cualquier proteína o péptido en un constructo de DNL™. Sin embargo, la técnica no es limitativa y pueden utilizarse otros métodos de conjugación.

Se conocen una variedad de métodos para elaborar proteínas de fusión, incluyendo la síntesis, hibridación

5 y/o amplificación de ácidos nucleicos para producir un ácido nucleico de doble cadena sintético que codifica una proteína de fusión de interés. Tales ácidos nucleicos de doble cadena pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión mediante técnicas estándar de biología molecular (ver, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory manual, 2ª Ed, 1989). En tales realizaciones preferidas, la fracción de AD y/o DDD puede unirse o al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de una proteína efectora o péptido. Sin embargo, el experto en la técnica se dará cuenta de que el sitio de unión de una fracción de AD o DDD a una fracción efectora puede variar, dependiendo de la naturaleza química de la fracción efectora y de la o las partes de la fracción efectora implicadas en su actividad fisiológica. La unión específica al sitio de una variedad de fracciones efectoras puede realizarse usando técnicas conocidas en la técnica, como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

Estructuras de DNL™ alternativas

15 En ciertas realizaciones alternativas, los constructos de DNL™ pueden formarse usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contruidos alternativamente, en los que una fracción de AD puede unirse al extremo C-terminal de la cadena ligera kappa (C_k), en lugar de al extremo C-terminal del Fc en la cadena pesada. Los constructos de DNL™ formados alternativamente pueden prepararse como se divulga en las Solicitudes de Patente Provisional de Estados Unidos N° de serie 61/654,310, presentada el 1 de junio de 2012, 61/662.086, presentada el 20 de junio de 2012, 61/673.553, presentada el 19 de julio de 2012, y 61/682.,531, presentada el 13 de agosto de 2012. Los constructos de DNL™ conjugados con cadena ligera muestran una actividad de función efectora Fc in vitro potenciada y una farmacocinética, estabilidad y actividad anti-linfoma mejoradas in vivo (Rossi et al., 2013, Bioconjug Chem 24:63-71).

25 Los constructos de DNL™ conjugados con C_k pueden prepararse como se divulga en las Solicitudes de Patente Provisional de Estados Unidos N° de serie 61/654,310, 61/662,086, 61/673,553 y 61/682,531. Brevemente, C_k -AD2-IgG, se generó mediante modificación recombinante, mediante la cual el péptido AD2 se fusionó al extremo C-terminal de la cadena ligera kappa. Como el extremo C-terminal natural de C_k es un residuo de cisteína, que forma un puente disulfuro con C_H1 , se usó un conector "bisagra" de 16 residuos de aminoácidos para espaciar el AD2 del puente disulfuro C_k - V_H1 . Los vectores de expresión de mamíferos para C_k -AD2-IgG-veltuzumab y C_k -AD2-IgG-epratuzumab se construyeron usando el vector pdHL2, que se había usado previamente para la expresión de los módulos homólogos de C_H3 -AD2-IgG. Se sintetizó una secuencia de nucleótidos de 2208 pb que comprende la secuencia del vector pdHL2 que va desde el sitio de restricción Bam HI dentro del intrón V_k/C_k hasta el sitio de restricción Xho I 3' del intrón de C_k , con la inserción de la secuencia codificante para el conector bisagra y AD2, en marco en el extremo 3' de la secuencia codificante de C_k . Esta secuencia sintética se insertó en los vectores de expresión de IgG-pdHL2 para veltuzumab y epratuzumab a través de los sitios de restricción Bam HI y Xho I. La generación de clones de producción con SpESFX-10 se realizó como se describe para los módulos de C_H3 -AD2-IgG. C_k -AD2-IgG-veltuzumab y C_k -AD2-IgG-epratuzumab se produjeron mediante clones de producción transfectados de manera estable en cultivo en botella rotatoria por lotes y se purificaron del fluido sobrenadante en un solo paso usando cromatografía de afinidad de proteína A de MabSelect (GE Healthcare).

Presentación en fagos

45 Ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones puede comprender el uso de péptidos de unión y/o miméticos de péptidos de varias moléculas, células o tejidos objetivo. Los péptidos de unión pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitados a, la técnica de presentación en fagos. En la técnica se conocen bien varios métodos de presentación en fagos y técnicas para producir poblaciones diversas de péptidos. Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.223.409; 5.622.699 y 6.068.829 divulgan métodos para preparar una biblioteca de fagos. La técnica de presentación en fagos implica la manipulación genética de bacteriófagos para que péptidos pequeños puedan expresarse en su superficie (Smith y Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith y Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257). Además de péptidos, en la superficie de las partículas de fagos también pueden presentarse dominios de proteínas más grandes como anticuerpos de cadena sencilla (Arap et al., 1998, Science 279:377-380).

55 Las secuencias de aminoácidos de direccionamiento selectivas para un órgano, tejido, tipo de célula o molécula objetivo dados pueden aislarse mediante cribado (Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162). Brevemente, se administra una biblioteca de fagos que contienen péptidos de direccionamiento putativos a un organismo intacto o a órganos, tejidos, tipos de células o moléculas objetivo aislados y se recogen muestras que contienen fagos unidos. Los fagos que se unen a un objetivo pueden eluirse de un órgano, tejido, tipo de célula objetivo o molécula objetivo y luego amplificarse haciéndolos crecer en bacterias huésped.

65 En ciertos ejemplos, el fago puede propagarse en bacterias huésped entre rondas de cribado. En lugar de ser lisadas por el fago, las bacterias pueden secretar múltiples copias de fagos que presentan un inserto particular. Si se desea, el fago amplificado puede exponerse a los órganos, tejidos, tipos de células objetivo o molécula objetivo de nuevo y recogerse para rondas adicionales de cribado. Pueden realizarse múltiples rondas de cribado hasta que

se obtenga una población de aglutinantes selectivos o específicos. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede determinarse secuenciando el ADN correspondiente al inserto del péptido de direccionamiento en el genoma del fago. El péptido de direccionamiento identificado puede producirse luego como un péptido sintético mediante técnicas estándar de química de proteínas (Arap et al., 1998, Smith et al., 1985).

En algunos ejemplos, puede usarse un protocolo de sustracción para reducir adicionalmente la unión de fagos de fondo. El propósito de la sustracción es eliminar los fagos de la biblioteca que se unen a objetivos distintos del objetivo de interés. En ejemplos alternativos, la biblioteca de fagos puede preseleccionarse frente a una célula, tejido u órgano de control. Por ejemplo, los péptidos que se unen a tumores pueden identificarse después de preseleccionar una biblioteca frente a una línea celular normal de control. Después de la sustracción, la biblioteca puede seleccionarse frente a la molécula, célula, tejido u órgano de interés. Se conocen otros métodos de protocolos de sustracción y pueden usarse en la puesta en práctica de los métodos reivindicados, por ejemplo, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 5.840.841, 5.705.610, 5.670.312 y 5.492.807.

15 Nanocuerpos

Los nanocuerpos son anticuerpos de dominio único de aproximadamente 12-15 kDa de tamaño (aproximadamente 110 aminoácidos de longitud). Los nanocuerpos pueden unirse selectivamente a antígenos objetivo, como los anticuerpos de tamaño completo, y tienen afinidades similares por los antígenos. Sin embargo, debido a su tamaño mucho más pequeño, pueden ser capaces de penetrar mejor en tumores sólidos. El tamaño más pequeño también contribuye a la estabilidad del nanocuerpo, que es más resistente al pH y temperaturas extremas que los anticuerpos de tamaño completo (Van Der Linden et al., 1999, *Biochim Biophys Acta* 1431:37-46). Los anticuerpos de dominio único se desarrollaron originalmente tras el descubrimiento de que los camélidos (camellos, alpacas, llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales sin cadenas ligeras (por ejemplo, Hamsen et al., 2007, *Appl Microbiol Biotechnol* 77:13-22). Los anticuerpos de cadena pesada consisten de un único dominio variable (V_{HH}) y dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}). Al igual que los anticuerpos, los nanocuerpos pueden desarrollarse y usarse como constructos multivalentes y/o biespecíficos. Las formas humanizadas de nanocuerpos están en desarrollo comercial y están dirigidas a una variedad de antígenos objetivo, como IL-6R, vWF, TNF, RSV, RANKL, IL-17A & F e IgE (por ejemplo, ABLYNX®, Ghent, Bélgica), con potencial uso clínico en el cáncer (por ejemplo, Saerens et al., 2008, *Curr Opin Pharmacol* 8:600-8; Muyldermans, 2013, *Ann Rev Biochem* 82:775-97).

La vida media en plasma de los nanocuerpos es más corta que la de los anticuerpos de tamaño completo, y la eliminación se realiza principalmente por vía renal. Como carecen de una región Fc, no presentan citotoxicidad dependiente del complemento.

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

En varias realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los inmunoconjugados objeto pueden comprender nanocuerpos para la administración dirigida de fármaco conjugado a células, tejidos u órganos. Los nanocuerpos de uso se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 7.807.162; 7.939.277; 8.188.223; 8.217.140; 8.372.398; 8.557.965; 8.623.361 y 8.629.244).

50 Protocolos de conjugación

El protocolo de conjugación preferido se basa en una reacción de tiol-maleimida, tiolvinilsulfona, tiolbromoacetamida o tiol-yodoacetamida que son fáciles a pH neutro o ácido. Esto evita la necesidad de condiciones de pH más altas para las conjugaciones como, por ejemplo, las que serían necesarias cuando se usan ésteres activos. Detalles adicionales de protocolos de conjugación ejemplares se describen a continuación en la sección de Ejemplos.

Tratamiento Terapéutico

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado terapéutico a un sujeto. Las enfermedades que pueden tratarse con los conjugados terapéuticos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, enfermedades malignas de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas) usando, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 como el MAb hLL2 (epratuzumab, ver la Patente de Estados Unidos N° 6.183.744), contra otro epítipo de CD22 (hRFB4) o anticuerpos contra otros

antígenos de células B, como CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD37, CD40, CD40L, CD52, CD74, CD80 o HLA-DR. Otras enfermedades incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinomas de epitelios del sistema digestivo de origen endodérmico, cánceres como cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas, y otros carcinomas, sarcomas, tumores gliales, leucemias mieloides, etc. En particular, anticuerpos contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno oncofetal, producido por o asociado con un tumor sólido maligno o neoplasia hematopoyética, por ejemplo, se usan ventajosamente un tumor gastrointestinal, de estómago, colon, esófago, hígado, pulmón, mama, páncreas, hígado, próstata, ovario, testículo, cerebro, hueso o linfático, un sarcoma o un melanoma. Tales agentes terapéuticos pueden administrarse una vez o repetidamente, dependiendo del estado de la enfermedad y la tolerabilidad del conjugado, y también pueden usarse opcionalmente en combinación con otras modalidades terapéuticas, como cirugía, radiación externa, radioinmunoterapia, inmunoterapia, quimioterapia, terapia antisentido, terapia con ARN interferente, terapia génica y similares. Cada combinación se adaptará al tipo de tumor, etada, estado del paciente y terapia previa, y otros factores considerados por el médico responsable.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (es decir, vertebrados e invertebrados), incluyendo pero no limitado a, mamíferos, incluyendo humanos. No se pretende que el término se limite a una edad o sexo en particular. Por tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean hombres o mujeres, están abarcados por el término. Las dosis que se dan en la presente son para humanos, pero pueden ajustarse al tamaño de otros mamíferos, así como de niños, de acuerdo con el peso o el tamaño por metro cuadrado.

En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, los conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-EGP-1 (anti-TROP-2) como el MAb hRS7 pueden usarse para tratar carcinomas como carcinomas de esófago, páncreas, pulmón, estómago, colon y recto, vejiga urinaria, mama, ovario, útero, riñón y próstata, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 7.238.785; 7.517.964 y 8.084.583. Un anticuerpo de hRS7 es un anticuerpo humanizado que comprende secuencias de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena ligera CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO: 3); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO: 4); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO: 5) y secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 6); CDR2 (WINTYTGEPTYDDFKFG, SEQ ID NO: 7) y CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO: 8).

De acuerdo con la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos pueden comprender un anticuerpo anti-CEACAM5 (por ejemplo, HMN-14, labretuzumab) y/o un anticuerpo anti-CEACAM6 (por ejemplo, HMN-3 o hMN-15) para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CEACAM5 y/o CEACAM6, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 8.287.865; 7.951.369; 5.874.540; 6.676.924 y 8.267.865. Los tumores sólidos que pueden tratarse usando anti-CEACAM5, anti-CEACAM6 o una combinación de los dos incluyen, pero no se limitan a, cánceres de mama, pulmón, páncreas, esófago, tiroides medular, ovario, colon, recto, vejiga urinaria, boca y estómago. La mayoría de los carcinomas, incluyendo los cánceres gastrointestinal, respiratorio, genitourinario y de mama, expresan CEACAM5 y pueden tratarse con los inmunoconjugados en cuestión. Un anticuerpo hMN-14 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena ligera CDR1 (KASQDVGTSVA; SEQ ID NO:9), CDR2 (WTSTRHT; SEQ ID NO:10), y CDR3 (QQYSLYRS; SEQ ID NO:11) y las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena pesada CDR1 (TYWMS; SEQ ID NO:12), CDR2 (EIHPDSSTINYAPSLKD; SEQ ID NO:13) y CDR3 (LYFGFPWFAY; SEQ ID NO:14).

Un anticuerpo hMN-3 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena ligera CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO: 15), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO: 16) y CDR3 (FQGSHPPT, SEQ ID NO: 17) y las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 18), CDR2 (WINTYTGEPTYADDFKFG, SEQ ID NO: 19) y CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO: 20).

Un anticuerpo hMN-15 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena ligera SASSRVSYIH (SEQ ID NO: 21); GTSTLAS (SEQ ID NO: 22); y QQWSYNPPT (SEQ ID NO: 23); y las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena pesada DYMS (SEQ ID NO: 24); FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO: 25); y DMGIRWNFDV (SEQ ID NO: 26).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un anticuerpo anti-CD74 (por ejemplo, HLL1, milatuzumab, divulgado en las Patentes de Estados Unidos N° 7.074.403; 7.312.318; 7.772.373; 7.919.087 y 7.931.903) para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CD74, incluyendo pero no limitados a, cáncer de riñón, pulmón, intestinal, estómago, mama, próstata u ovario, así como varios cánceres hematológicos como mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Un anticuerpo hLL1 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDR1 (RSSQLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO: 27), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO: 28) y CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO: 29) y las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena pesada CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:30), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKFG; SEQ ID NO:31), y CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:32).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un

anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, hLL2, epratuzumab, divulgado en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.789.554; 6.183.744; 6.187.287; 6.306.393; 7.074.403 y 7.641.901, o el anticuerpo RFB4 quimérico o humanizado) para tratar cualquiera de una variedad de cánceres que expresan CD22, incluyendo pero no limitado a, formas indolentes de linfomas de células B, formas agresivas de linfomas de células B, leucemias linfáticas crónicas, leucemias linfáticas agudas, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma folicular o linfoma difuso de células B. Un anticuerpo hLL2 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO: 33), CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO: 34) y CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO: 35) y las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO:36), CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO:37), y CDR3 (RDITTFY, SEQ ID NO:38)

En un ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-CSAp, como el MAb hMu-9, para tratar cánceres colorrectales, así como de páncreas y de ovario como se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.962.702; 7.387.772; 7.414.121; 7.553.953; 7.641.891 y 7.670.804. Un anticuerpo hMu-9 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDR1 (RSSQSVHSNGNTYLE, SEQ ID NO: 39), CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO: 40) y CDR3 (FQGSRVPT, SEQ ID NO: 41) y las secuencias de la CDR variable de la cadena pesada CDR1 (EYVIT, SEQ ID NO: 42), CDR2 (EIYPGSGTSYNEKFK, SEQ ID NO: 43) y CDR3 (EDL, SEQ ID NO: 44).

Los conjugados terapéuticos que comprenden el MAb hPAM4 pueden usarse para tratar el cáncer de páncreas u otros tumores sólidos, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 7.238.786 y 7.282.567. Un anticuerpo hPAM4 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la región variable de la cadena ligera CDR1 (SASSVSSSYLY, SEQ ID NO: 45); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO: 46); y CDR3 (HQWNRYPY, SEQ ID NO: 47); y secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO: 48); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO: 49) y CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO: 50).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-AFP, como IMM31, para tratar carcinoma hepatocelular, tumores de células germinales y otros tumores productores de AFP usando formas de anticuerpos humanizados, quiméricos y humanos, como se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 7.300.655. Un anticuerpo IMM31 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 (SYVIH, SEQ ID NO: 51), CDR2 (YIHPYNGGTYNEKFKG, SEQ ID NO: 52) y CDR3 (SGGGDPFAY, SEQ ID NO: 53) y la cadena ligera CDR1 (KASQDINKYIG, SEQ ID NO: 54), CDR2 (YTSALLP, SEQ ID NO: 55) y CDR3 (LQYDDLWT, SEQ ID NO: 56).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-HLA-DR, como hL243, para tratar linfoma, leucemia, cánceres de piel, esófago, estómago, colon, recto, páncreas, pulmón, mama, ovario, vejiga, endometrio, cuello uterino, testículos, riñón, hígado, melanoma u otros tumores productores de HLA-DR, como se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 7.612.180. Un anticuerpo hL243 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO: 57), CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO: 58) y CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO: 59) y las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO: 60), CDR2 (AASNLD, SEQ ID NO: 61) y CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO: 62).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-CD20, como veltuzumab (hA20), 1F5, obinutuzumab (GA101) o rituximab, para tratar linfoma, leucemia, linfoma de Burkitt, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma difuso de células B, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 7.435.803 o 8.287.864. Un anticuerpo hA20 (veltuzumab) es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDRL1 (RASSSVSYIH, SEQ ID NO: 63), CDRL2 (ATSNLAS, SEQ ID NO: 64) y CDRL3 (QQWTSNPPT, SEQ ID NO: 65) y las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDRH1 (SYNMH, SEQ ID NO: 66), CDRH2 (AIYPGNGDTSYNQKFKG, SEQ ID NO: 67) y CDRH3 (STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO: 68).

En otro ejemplo de la presente divulgación, pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden un MAb anti-CD19, como hA19, para tratar linfomas y leucemias relacionados con células B, como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfoblástica aguda, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 7.109.304, 7.462.352, 7.902.338, 8.147.831 y 8.337.840. Un anticuerpo hA19 es un anticuerpo humanizado que comprende las secuencias de la CDR de la cadena ligera CDR1 KASQSVYDYGDSYLN (SEQ ID NO: 69); CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO: 70); y CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO: 71) y las secuencias de la CDR de la cadena pesada CDR1 SYWMN (SEQ ID NO: 72); CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 73) y CDR3 RETTTVGRYYYYAMDY (SEQ ID NO: 74).

Pueden usarse conjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-tenascina para tratar tumores hematopoyéticos y sólidos, y pueden usarse conjugados que comprenden anticuerpos para la tenascina para tratar tumores sólidos, preferiblemente cánceres cerebrales como glioblastomas.

Preferiblemente, los anticuerpos que se usan en el tratamiento de enfermedades humanas son versiones humanas o humanizadas (injertadas con CDR) de anticuerpos; aunque pueden usarse versiones murinas y quiméricas de anticuerpos. Se prefieren principalmente las moléculas de IgG de la misma especie que los agentes de administración para minimizar las respuestas inmunes. Esto es particularmente importante cuando se considera la repetición de tratamientos. Para los humanos, es menos probable que un anticuerpo de IgG humano o humanizado genere una respuesta inmune anti-IgG en los pacientes. Los anticuerpos como hLL1 y hLL2 se internalizan rápidamente después de unirse al antígeno de internalización en las células objetivo, lo que significa que el fármaco quimioterapéutico que se transporta también se internaliza rápidamente en las células. Sin embargo, los anticuerpos que tienen tasas de internalización más lentas también pueden usarse para efectuar una terapia selectiva.

El experto en la técnica se dará cuenta de que los inmunoconjugados en cuestión, que comprenden una camptotecina o antraciclina conjugada con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, pueden usarse solos o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, como un segundo anticuerpo, segundo fragmento de anticuerpo, segundo inmunoconjugado, radionúclido, toxina, fármaco, agente quimioterapéutico, radioterapia, quimiocina, citoquina, inmunomodulador, enzima, hormona, oligonucleótido, ARNi o ARNip. Tales agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse por separado, en combinación con, o unidos a los inmunoconjugados anticuerpo-fármaco en cuestión.

En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente terapéutico usado en combinación con los inmunoconjugados de esta invención puede comprender uno o más isótopos. Los isótopos radiactivos útiles para tratar tejidos enfermos incluyen, pero no se limitan a: ^{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 , ^{227}Th y ^{211}Pb . El radionúclido terapéutico tiene preferiblemente una energía de descomposición en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en el intervalo de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. Las energías máximas de descomposición de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20 a 5000 keV, más preferiblemente de 100 a 4000 keV y lo más preferible de 500 a 2500 keV. También se prefieren los radionúclidos que se descomponen sustancialmente con las 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 descomposición de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de <1000 keV, más preferiblemente de <100 keV y lo más preferible de <70 keV. También se prefieren los radionúclidos que se descomponen sustancialmente con la generación de partículas alfa. Tales radionúclidos incluyen, pero no se limitan a: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 y Fm-255. Las energías de descomposición de los radionúclidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente de 2000-10000 keV, más preferiblemente 3000-8000 keV y lo más preferible de 4000-7000 keV. Radionúclidos de uso potenciales adicionales 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 , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , y similares.

Pueden administrarse radionúclidos y otros metales, por ejemplo, usando grupos quelantes unidos a un anticuerpo o conjugado. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se usan con una variedad de metales y radiometales, más particularmente con radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Tales complejos de metal-quelato pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Pueden usarse otros quelatos de tipo anillo, como poliéteres macrocíclicos para formar complejos con ^{223}Ra .

Los agentes terapéuticos de uso en combinación con los inmunoconjugados descritos en la presente también incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos como alcaloides de vinca, antraciclinas, epidioflotoxinas, taxanos, antimetabolitos, inhibidores de tirosina quinasa, agentes alquilantes, antibióticos, inhibidores de Cox-2, antimitóticos, antiangiogénicos y agentes proapoptóticos, particularmente doxorubicina, metotrexato, taxol, otras camptotecinas y otros de estas y otras clases de agentes anticancerígenos y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen mostazas nitrogenadas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), así como ediciones revisadas de estas publicaciones. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos adecuados, como fármacos experimentales.

Los fármacos de uso ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, afatinib, apilidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfano, calicheamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxycamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecanos, crizotrabina, ciclofosfamida, dacarbazina, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina (2P-DOX), ciano-morfolino doxorubicina, doxorubicina glucurónido,

5 epirubicin glucurónido, erlotinib, estramustina, epidofilotoxina, erlotinib, entinostat, agentes de unión al receptor de estrógenos, etopósido (VP16), etopósido glucurónido, etopósido fosfato, exemestano, fingolimod, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, flavopiridol, fostamatinib, ganetespi, GDC-0834, GS-1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorina, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, neratinib, nilotinib, nitrosurea, olaparib, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcaloides de la vinca y ZD1839. Tales agentes pueden ser parte de los conjugados descritos en la presente o alternativamente pueden administrarse en combinación con los conjugados descritos, ya sea antes, simultáneamente con o después del conjugado. Alternativamente, pueden usarse uno o más anticuerpos terapéuticos desnudos como se conoce en la técnica en combinación con los conjugados descritos. Los anticuerpos terapéuticos desnudos ejemplares se han descrito anteriormente.

15 Los agentes terapéuticos que pueden usarse junto con los inmunoconjugados también pueden comprender toxinas conjugadas con fracciones de direccionamiento. Las toxinas que pueden usarse a este respecto incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral de fitolaca, gelonina, toxina de la difteria, exotoxina *Pseudomonas*, y endotoxina *Pseudomonas*. (Ver, por ejemplo, Pastan. et al., Cell (1986), 47:641, y Sharkey y Goldenberg, CA Cancer J Clin. julio-agosto 2006; 56(4):226-43.) Toxinas adicionales adecuadas para su uso son aquellas conocidas por los expertos en la técnica y se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 6.077.499.

25 Otra clase más de agente terapéutico puede comprender uno o más inmunomoduladores. Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse de 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 una combinación de los mismos. Específicamente útiles son las linfoxinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores hematopoyéticos, como la interleucina (IL), el factor estimulante de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón, como interferones $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ o $-\lambda$, y factor de crecimiento de células madre, como el designado "factor S1". Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorexina; hormonas glicoproteicas como la hormona estimulante del foliculo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora de Muller; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones como interferón $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ y $-\lambda$; factores estimulantes de colonias (CSF) como macrófagos-CSF (M-CSF); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit-ligando o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, necrosis tumoral factor y linfoxina (LT). Como se usa en la presente, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

45 Las quimiocinas de uso incluyen RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

Formulación y administración

50 Las vías de administración adecuadas de los conjugados incluyen, sin limitación, administración oral, parenteral, subcutánea, rectal, transmucosal, intestinal, inyección intramuscular, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intravítrea, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Las vías de administración preferidas son la parenteral. Alternativamente, puede administrarse el compuesto de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del compuesto directamente en un tumor sólido.

55 Los inmunoconjugados pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante las cuales el inmunoconjugado se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª edición (Lea y Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de los mismos.

65 En una realización preferida, el inmunoconjugado se formula en tampón biológico de Good (pH 6-7), usando un tampón seleccionado del grupo que consiste de ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES);

ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA); ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES); ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES); ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES); ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS); ácido 3-(N-morfolinil)-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO); y piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) [Pipes]. Los tampones más preferidos son MES o MOPS, preferiblemente en el intervalo de concentración de 20 a 100 mM, más preferiblemente aproximadamente 25 mM. El más preferido es MES 25 mM, pH 6,5. La formulación puede comprender además trehalosa 25 mM y polisorbato 80 al 0,01% v/v como excipientes, con la concentración de tampón final modificada a 22,25 mM como resultado de los excipientes añadidos. El método de almacenamiento preferido es como una formulación liofilizada de los conjugados, almacenados en el intervalo de temperatura de -20° C a 2° C, con el almacenamiento más preferido de 2° C a 8° C.

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

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

Generalmente, la dosificación de un inmunoconjugado administrado para humanos variará dependiendo de factores como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y el historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosificación de inmunoconjugado que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 24 mg/kg como una única infusión intravenosa, aunque también puede administrarse una dosis más baja o más alta según lo requieran las circunstancias. Una dosificación de 1 a 20 mg/kg para un paciente de 70 kg, por ejemplo, es de 70 a 1400 mg o de 41 a 824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosificación puede repetirse según sea necesario, por ejemplo, una vez a la semana durante 4 a 10 semanas, una vez a la semana durante 8 semanas o una vez a la semana durante 4 semanas. También puede administrarse con menos frecuencia, como cada dos semanas durante varios meses, o mensualmente o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento. Las dosificaciones preferidas pueden incluir, pero no se limitan a, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg y 24 mg/kg. Puede usarse cualquier cantidad en el intervalo de 1 a 24 mg/kg. La dosificación se administra preferiblemente varias veces, una o dos veces por semana. Puede usarse un programa de dosificación mínimo de 4 semanas, más preferiblemente 8 semanas, más preferiblemente 16 semanas o más largo. El programa de administración puede comprender la administración una o dos veces a la semana, en un ciclo seleccionado del grupo que consiste de: (i) semanalmente; (ii) cada dos semanas; (iii) una semana de terapia seguido de dos, tres o cuatro semanas de descanso; (iv) dos semanas de terapia seguido de una, dos, tres o cuatro semanas de descanso; (v) tres semanas de terapia seguido de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; (vi) cuatro semanas de terapia seguido de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; (vii) cinco semanas de terapia seguido de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas de descanso; y (viii) mensual. El ciclo puede repetirse 4, 6, 8, 10, 12, 16 o 20 veces o más.

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

En realizaciones preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, los inmunoconjugados

son para su uso para terapia contra el cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o enfermedades malignas linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, 5
Cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer gástrico o de estómago incluyendo 10
cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer de tiroides medular, carcinoma diferenciado de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio de la enfermedad maligna o tumor original) y células o tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a 15
sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

Otros ejemplos de cánceres o enfermedades malignas incluyen, pero no se limitan a: leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma 20
adrenocortical, cáncer hepatocelular (primario) en adultos, cáncer de hígado (primario) en adultos, leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no Hodgkin en adultos, cáncer primario de hígado en adultos, sarcoma de tejidos blandos en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, enfermedades malignas relacionadas con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma de 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 infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario), leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores extracraneales de células germinales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer de hígado 30
primario infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma endocrino de células de los islotes del 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 de ojos, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer de hipofaringe, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer de células de los islotes pancreático, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, 40
cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso primario oculto metastásico, cáncer de cuello escamoso primario metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello escamoso metastásico primario oculto, cáncer de orofaringe, sarcoma fibroso óseo/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, paraproteinemias, policitemia vera, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer primario de hígado, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, 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 tejidos blandos, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos y pineales primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer de testículo, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter, cáncer de pelvis renal y uréter de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, glioma de vías visuales e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra 60
enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerado anteriormente.

Las enseñanzas técnicas de la divulgación pueden usarse para tratar afecciones malignas o premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno, incluyendo pero no limitados a, los trastornos descritos anteriormente. Tales usos están indicados en condiciones que se sabe o sospecha de progresión previa a 65

neoplasia o cáncer, en particular, donde se ha producido un crecimiento de células no neoplásicas que consiste de hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anormales, ver Robbins y Angell, Basic Pathology, 2ª edición, W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79 (1976)).

5 La displasia es con frecuencia un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en el epitelio. Es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de las células. La displasia se produce característicamente cuando hay irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfixiante, displasia auriculodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodifisaria, displasia craneocarpotarsal, displasia craneometafisial, displasia dentinaria, displasia difisial, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epiphysialis hemimelia, displasia epiphysialis multiplex, displasia epiphysialis punctata, displasia epitelial, displasia faciодigitogenital, displasia fibrosa familiar de las mandíbulas, displasia familiar de pliegues blancos, displasia fibromuscular, displasia fibrosa del hueso, displasia ósea florida, displasia retinal renal hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisial, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertbral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cemental periapical, displasia fibrosa polioestótica, displasia pseudocondrolásica espondiloepifisial, displasia retiniana, displasia septo-óptica, displasia espondiloepifisial y displasia ventriculo-radial.

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

En realizaciones preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones se inhibe el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas adicionales incluyen, pero no se limitan a, progresión y/o metástasis de enfermedades malignas y trastornos relacionados como leucemia (incluyendo las leucemias agudas; por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda [incluyendo la mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia]) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica [granulocítica] crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadenas pesadas y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, 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 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, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

En realizaciones específicas de la invención como se define en las reivindicaciones, el inmunoconjugado de ADC y la terapia anticáncer son para su uso en para el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama triple negativo. TNBC, como sugiere el término, se refiere a cánceres de mama que carecen de la expresión de receptores de estrógeno y progesterona (ER, PR), y también HER2 (ERBB2). Este tipo comprende aproximadamente el 15-20% de todos los cánceres de mama invasivos y es muy maligno. Los pacientes con TNBC muestran tasas más altas de recurrencia distante y muerte en comparación con otros cánceres de mama (Millikan et al., Breast Cancer Res Treat 2008; 109:123-139), y la supervivencia mediana de aquellos con enfermedad metastásica es de solo 13 meses (Kassam et al., Clin Breast Cancer 2009; 9:29-33). En términos de prevalencia, el TNBC es más frecuente en pacientes más jóvenes, en portadores de la mutación BRCA1 y en grupos étnicos específicos, como mujeres afroamericanas e hispanas (Bauer et al., Cancer 2007, 109:1721-1728; Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100: 8418-8423; 26-28; Foulkes et al., N Engl J Med 2010, 363: 1938-1948). Esto sugiere que un trasfondo genético de la línea germinal desempeña un papel en la transcripción y diferenciación del TNBC. Histológicamente, la mayoría de los tumores de TNBC son carcinomas ductales invasivos y tienen un grado histológico más alto, un tamaño tumoral más grande y, con mayor frecuencia, son ganglios linfáticos positivos en el momento del diagnóstico (Dent et al., Clin Cancer Res.2007, 13:4429-4434). El pronóstico está relacionado con el comportamiento

metastásico y los diferentes subtipos muestran diferentes patrones de metástasis. El cáncer de mama hace metástasis comúnmente a los huesos, pero la enfermedad de tipo basal está dominada por metástasis al cerebro, pulmón y ganglios linfáticos distantes (Kennecke et al., J Clin Oncol 2010, 28:3271-3277; Sihto et al., Breast Cancer Res 2011, 13: R87). Las formas no basales muestran un patrón de metástasis similar, pero con metástasis hepática más frecuente.

Lehmann et al. (Lehmann et al., J Clin Invest 2011, 121(7):2750-2767) propusieron seis subtipos moleculares específicos para el TNBC: dos de tipo basal, BL1 y BL2, que son los más prevalentes y recibieron esta designación por ser similares al subtipo intrínseco de tipo basal, y expresión de genes expresados por tales células, como citoqueratinas 5, 6 o 17; un tercer subtipo inmunomodulador; subtipos mesenquimatosos (M) y similares a tallos mesenquimales (MSL); y un sexto siendo receptor de andrógenos luminal (LAR).

Los tumores de tipo basal muestran una alta proliferación y mutaciones frecuentes de TP53, y están asociados con el estado de mutación BRCA1. Se piensa que tales tumores han desregulado la reparación del ADN por deficiencia en la recombinación homóloga con BRCA inactivado en portadores de mutaciones BRCA (Rehman et al., Nat Rev Clin Oncol 2010, 7:718-724). Se ha descubierto que las sublíneas BL1 responden preferentemente al cisplatino, que provoca daño al ADN a través de la formación de enlaces cruzados de guanina. Varios ensayos clínicos han evaluado y continúan evaluando el papel de los agentes de platino en los TNBC de tipo basal (Ademuyiwa et al., J Onc 2013; 2013:219869). El tipo LAR puede responder al tratamiento del receptor de antiandrógenos, que se encuentra en evaluación clínica.

El tratamiento del TNBC, similar al cáncer de mama típico, implica cirugía, radioterapia y quimioterapia, ya que actualmente no se dispone de terapias dirigidas. Los agentes quimioterapéuticos más activos son las antraciclinas y los taxanos. Un metaanálisis de siete ensayos clínicos neoadyuvantes mostró una respuesta patológica completa (ausencia de cáncer de mama invasivo en la mama y los ganglios linfáticos) que se logró en el 36% de los pacientes sometidos a terapia con antraciclinas y taxanos (von Minckwitz et al. J Clin Oncol 2012, 30(15): 1796-1804). Un resumen de varios ensayos de terapia neoadyuvante en TNBC ha indicado que tales fármacos comunes contra el cáncer como doxorribina, ciclofosfamida, doxorubicina, taxano, epirubicina, docetaxel, paclitaxel, bevacizumab, gemcitabina, metotrexato, 5-fluorouracilo, capecitabina, vincristina, cisplatino y carboplatino, administrado en varias combinaciones, dio como resultado tasas de pCR del 28-52% en ensayos con más de 100 pacientes (Engelbraaten et al. Am J Pathol octubre 2013; 183(4): 1064-1074). Aunque los regímenes que contienen platino son activos en el cáncer de mama, los resultados de TNBC con tales regímenes no han sido igualmente superiores (Engelbraaten et al. Am J Pathol octubre de 2013; 183(4):1064-1074). La adición de carboplatino a un régimen de epirubicina, ciclofosfamida y docetaxel no mostró una ventaja de añadir carboplatino en el entorno neoadyuvante (Alba et al. Breast Cancer Res Treat noviembre 2012; 136(2):487-493).

En general, los pacientes con TNBC tienen una respuesta más alta a la quimioterapia que aquellos con tumores positivos para ER, negativos para HER2, pero paradójicamente tienen un resultado peor (Carey et al., Clin Cancer Res. 15 de abril de 2007; 13(8):2329-2334). La tasa de pCR en TNBC puede ser del 20% o más alta (Engelbraaten et al. Am J Pathol octubre de 2013; 183(4):1064-1074), y los que responden tienen un buen resultado a largo plazo, pero la mayoría de los pacientes con TNBC no logran pCR y, por lo tanto, progresan de manera más agresiva que los pacientes con enfermedad ER⁺ (Carey et al., Clin Cancer Res. 15 de abril de 2007; 13(8):2329-2334; Liedtke et al., J Clin Oncol. 10 de marzo de 2008; 26(8):1275-1281). Para los pacientes con TNBC que no logran una pCR, la tasa de recurrencia está entre el 40 y el 50% durante un período de cinco años (von Minckwitz et al. J Clin Oncol 2012, 30(15):1796-1804; Liedtke et al., J Clin Oncol. 10 de marzo de 2008; 26(8):1275-1281), lo que confirma el mal resultado a pesar de una quimiosensibilidad probable más alta de los pacientes con TNBC. Esto enfatiza la necesidad crítica insatisfecha de nuevos agentes terapéuticos para lograr una tasa más alta de pCR en TNBC.

También se están evaluando agentes terapéuticos biológicos en pacientes con TNBC, como inhibidores de PARP e inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Schneider et al., J Clin Oncol 2005; 23(8):1782-1790; von Minckwitz et al., N Eng J Med 2012; 366(4):299-309). De hecho, como el TNBC tiene similitudes clínicas con el cáncer de mama asociado a BRCA, los inhibidores de PARP son candidatos atractivos para la terapia de TNBC, pero hasta ahora esto no se ha sustanciado. Sin embargo, IMMU-132, que tiene un mecanismo de acción similar al inhibidor de la topoisomerasa I (Cardillo et al., Clin Cancer Res 2011; 17:3157-3169), ha mostrado regresiones clínicas como monoterapia en pacientes con TNBC metastásico, así como en líneas celulares de TNBC (Cardillo et al., Clin Cancer Res 2011; 17:3157-3169 y los Ejemplos siguientes).

IMMU-132 en terapia neoadyuvante de TNBC

La invención como se define en las reivindicaciones se refiere al uso neoadyuvante en TNBC de IMMU-132, un ADC que comprende múltiples copias del fármaco de tipo camptotecina SN-38 unido al anticuerpo anti-TROP-2 hRS7. SN-38 es el metabolito activo de CPT-11 (irinotecán), que no es un fármaco estándar en el cáncer de mama, pero puede ofrecer un beneficio terapéutico único en el TNBC. Se ha postulado que el TNBC es similar en su fenotipo a los cánceres que expresan la mutación BRCA1 y, por lo tanto, puede responder a agentes que son

eficaces en estos pacientes con BRCA1, como el platino y los agentes alquilantes, así como a los inhibidores de la topoisomerasa I (como las camptotecinas como el topotecan e irinotecán), debido a deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN asociados con BRCA. Estos actúan induciendo roturas en el ADN de doble cadena, afectando a la reparación del ADN y provocando la muerte celular (Hastak et al., *Cancer Res* 2010; 70:7970-7980).

5 Un mecanismo de acción similar, inhibiendo la poli (adenosina difosfato ribosa) polimerasa (PARP), que también desempeña un papel crítico en la reparación del ADN, como BRCA, pero los inhibidores de PARP provocan daño a una cadena de ADN, que no puede repararse por recombinación homóloga debido a la mutación de BRCA y la inhibición de PARP.

10 Hemos descubierto que el inmunoconjugado IMMU-132, que comprende SN-38, un inhibidor de la topoisomerasa I, conjugado con un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) que se dirige selectivamente a una proteína (TROP-2) mejor expresada en TNBC (y otros cánceres epiteliales), tiene un efecto similar de romper las cadenas de ADN mediante la inhibición de PARP (Cardillo et al., *Clin Cancer Res* 2011; 17:3157-3169). Por lo tanto, este inmunoconjugado puede reemplazar al platino y otros fármacos que dañan el ADN (por ejemplo, cisplatino, carboplatino), que tienen altas toxicidades, en una terapia de combinación de TNBC. Los resultados actuales con

15 IMMU-132 en pacientes con cánceres sólidos metastásicos, incluyendo el TNBC metastásico, indican que se tolera mejor que el fármaco irinotecán original debido a su aparente alto índice terapéutico, con toxicidades más manejables que cuando se administra irinotecán. Aunque no se sabe que los inhibidores de irinotecán y topoisomerasa I sean activos en cánceres de mama, incluyendo el TNBC, los ensayos actuales en TNBC con IMMU-132 sugieren que es eficaz en TNBC metastásico (Starodub et al., *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (supl; abstr 3032)), posiblemente porque una proporción más alta de este fármaco que daña el ADN se dirige a los sitios del tumor mediante la unión selectiva del anticuerpo portador a la proteína TROP-2 en las células de TNBC, que cuando se

20 administra irinotecán (en base a los descubrimientos preclínicos analizados en los Ejemplos siguientes). De hecho, nuestros estudios preclínicos han confirmado la actividad de IMMU-132 en modelos de xenoinjerto de TNBC. Otros atributos de IMMU-132 son que implica un anticuerpo de internalización (RS7), incorporando así selectivamente el fármaco tóxico, SN-38, en las células cancerosas objetivo. Además, TROP-2, el objetivo de IMMU-132, es una proteína transdutora de señales de calcio expresada por muchos cánceres epiteliales en cantidades más altas que las células normales, y se ha demostrado en algunos cánceres que es un indicador pronóstico de aumento de malignidad aumentada. La experiencia actual con IMMU-132 en tanto una variedad de cánceres sólidos avanzados, así como TNB, confirma los resultados de estudios de xenoinjertos de cánceres en humanos preclínicos, descritos a

25 continuación y publicado en la técnica. (Cardillo et al., *Clin Cancer Res* 2011; 17:3157-3169).

TROP-2, el antígeno objetivo del inmunoconjugado IMMU-132, es una glicoproteína de superficie celular de 36 kDa expresada en una variedad de carcinomas humanos incluyendo de pulmón, mama, colorrectal, páncreas, próstata y ovario (ver, por ejemplo, Lipinski et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:5147-5150; Stein et al. *Cancer Res* 1990; 50: 1330-1336; Alberti et al. *Hybridoma* 1992; 11:539-545; Wang et al. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:280-285; Cubas et al. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796:309-314). Se ha demostrado que funciona como un transductor de señales de calcio (Ripani et al. *Int J Cancer* 1998; 76:671-676) y está vinculado a la migración celular y al crecimiento independiente del anclaje (Hastak et al., *Cancer Res* 2010;70:7970-7980). Es importante destacar que la

35 alta expresión de TROP-2 se asocia con una enfermedad más agresiva y un mal pronóstico, lo que lo hace un objetivo ideal para la terapia contra el cáncer (Shimada et al. *Cancer Sci* 2005; 96:668-675; Wang et al. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:280-285; Cubas et al. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796:309-314).

40 SN-38 no puede usarse como tal debido a su insolubilidad en medios acuosos. La bioconversión de irinotecán al fármaco activo, SN-38, es muy ineficaz y también varía según el paciente. Para hacer que SN-38 esté directamente disponible para los sitios objetivo, se preparó un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de SN-38 con un anticuerpo anti-TROP-2 (hRS7). Se examinaron una serie de conectores, y se eligió uno, 'CL2A', como el conector de rendimiento óptimo (Cardillo et al., *Clin Cancer Res* 2011; 17:3157-3169; Moon et al. *J Med Chem* 2008. 51, 6916-6926; Govindan et al. *Clin Cancer Res* 2009;15:6052-6061; Govindan et al. *Mol Cancer Ther* junio de 2013; 12(6) 968-978). El conjugado del derivado de SN-38, CL2A-SN-38, que indica el sitio de conjugación y el sitio de escisión del fármaco se muestra en la **FIG. 1**. Se había descrito la conjugación de CL2A-SN-38 con hRS7 levemente reducido (Moon et al. *J Med Chem* 2008. 51, 6916-6926; Govindan et al. *Clin Cancer Res* 2009;15:6052-6061). La unión al antígeno para las líneas celulares TROP-2⁺ se conservó en el ADC, que también mostró una potencia nanomolar de un solo dígito similar a la del fármaco libre, en una serie de líneas celulares TROP-2⁺ in vitro.

45 Se determinó que la relación de sustitución de fármaco-anticuerpo media (DAR) era de 7,6 mediante mediciones espectrales de masas, y lo mismo se corroboró mediante mediciones de absorbancia. El nivel de fármaco libre no conjugado fue del <5%, dentro del límite de especificación para preparaciones de grado clínico.

50 Se han llevado a cabo preparaciones a gran escala del ADC en una escala de 200 gramos del anticuerpo, en condiciones de GMPc y supervisión de QA tanto del componente de CL2A-SN-38 como del ADC. Hasta la fecha se habían preparado ocho de tales preparaciones (8 x 200 gramos) del conjugado, con el producto almacenado a 2-8° C como preparaciones liofilizadas en alícuotas de 100 mg. La estabilidad de la preparación al almacenamiento se ha documentado desde hace 3 años.

65 En suero humano, a 37° C in vitro, se ha demostrado que hRS7-CL2A-SN-38 libera el 50% del fármaco

libre en -24 h. El conector CL2A lleva a una biodisponibilidad mucho más alta del fármaco libre en comparación con el conjugado con un conector diferente altamente estable. Esto se debe a que la liberación de fármaco libre no depende de la internalización del conjugado de anticuerpo y el procesamiento celular posterior, lo que también lo hace atractivo en situaciones en las que la densidad de antígeno en la superficie del tumor es baja.

5

Respuesta patológica completa (pCR) como criterio de valoración sustituto en TNBC

La pCR se ha convertido en un criterio de valoración aceptado para los ensayos de terapia neoadyuvante en pacientes con TNBC (Bardia & Baselga, Clin Cancer Res diciembre 2013 1; 19(23):6360-6370; Ademuyiwa et al., J Onc 2013;2013:219869; Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval. May 2012). La pCR se define en el documento de orientación de la FDA "como la ausencia de cualquier cáncer invasivo residual en la evaluación de hematoxilina y eosina del espécimen de mama resecado y todos los ganglios linfáticos ipsilaterales *muestreados* después de completar la terapia sistémica neoadyuvante (es decir, ypT0 ypN0 en el sistema de estadificación actual del AJCC)" (Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval.. Mayo de 2012) (énfasis en cursiva añadido). Aunque esto permite que los fármacos se prueben rápidamente y en un número relativamente menor de pacientes que en el contexto de la enfermedad metastásica, la evaluación de la eficacia en la cirugía posiblemente lleve a la aprobación acelerada (provisional) del fármaco en base a los resultados quirúrgicos en el plazo de aproximadamente 6 meses o antes después del inicio de la terapia neoadyuvante, todavía se necesita un seguimiento para determinar la supervivencia libre de eventos (SSC) y las tasas de supervivencia general (SG) para sustanciar el beneficio clínico que lleva a la aprobación final del fármaco. Esta vía para la aprobación acelerada significa que el fármaco estará disponible para uso general mucho antes, aumentando su inclusión en una variedad de estudios y entornos clínicos, lo que puede ofrecer un beneficio muy rápido a las mujeres que se enfrentan a una cirugía por TNBC. Si el perfil de toxicidad de IMMU-132 es realmente mejor que el de los fármacos de platino y PARP que abordan un mecanismo de acción similar, entonces la adición de este novedoso agente terapéutico puede provocar un cambio de paradigma en el neoadyuvante (y quizás también adyuvante y metastásica) de la terapia para el TNBC. Además, como el objetivo de IMMU-132, TROP-2, también se expresa en una alta prevalencia en tumores no triple negativos (TN), este agente también puede mostrar una actividad única en estos otros tipos de cáncer de mama. Resultados prometedores en la terapia de TNBC metastásico y temprano animarían a estudiar este agente también en pacientes con cánceres no TN.

Entre los ensayos neoadyuvantes para TNBC revisados en un metanálisis, solo 3 ensayos informaron de supervivencia libre de enfermedad y OS a largo plazo, y estos fueron excelentes para pacientes que recibieron terapia neoadyuvante a base de platino (Petrelli et al. Breast Cancer Res Treat 2014; 144:223-232). Los pacientes con TNBC que lograron un pCR en mama y axila (ypT0N0) tuvieron una mejor supervivencia libre de eventos que los pacientes con enfermedad residual. En otro análisis de 12 ensayos internacionales en los que participaron 11.955 pacientes, la pCR en TNBC demostró ser un criterio de valoración sustituto para mejorar la EFS y la OS (Cortazar et al. Lancet, 12 de julio de 2014; 384(9938): 164-172). En términos de EFSm como a los 3 años, los pacientes con pCR mostraron una tasa del 90% en comparación con aproximadamente el 60% de los pacientes con TNBC sin pCR (Cortazar et al. Lancet 12 de julio de 2014; 384(9938):164-172).

En conclusión, la quimioterapia neoadyuvante se ha convertido en un estándar de atención para un subgrupo respondedor de pacientes con TNBC, a pesar del hecho de que no se ha establecido un régimen terapéutico específico como preferido; sólo el uso de taxanos y antraciclinas parecen ser modalidades estándar. Añadir un nuevo agente terapéutico dirigido que muestre buena actividad en pacientes con TNBC metastásico que no han respondido a tratamientos sistémicos anteriores puede evaluarse mejor y más rápidamente en un entorno neoadyuvante, donde se añade a la terapia de combinación convencional y se compara con la misma terapia sin este agente terapéutico candidato. La prueba de nuevos agentes en ensayos comparativos puede ayudar a establecer una terapia estándar, y también puede permitir la expansión de los tipos respondedores a otros subgrupos y aumentar la tasa de respuesta de pCR más allá de los niveles que se alcanzan actualmente a niveles altos de toxicidad para los pacientes. En general, se está de acuerdo en que las antraciclinas combinadas con taxanos y ciclofosfamida proporcionan una alta tasa de pCR en TNBC (von Minckwitz & Fontanella, Breast agosto 2013; 22 Suppl 2:S149-5151), esto viene con una alta toxicidad. También se está investigando la adición de agentes de platino, como cisplatino y carboplatino. Los estudios a continuación evalúan la adición de IMMU-132, como el inhibidor de la topoisomerasa I, al régimen de TAC, porque el carboplatino tiene una toxicidad aumentada cuando se combina con TAC. Este enfoque debería dar como resultado una mayor conservación de los senos, tratamientos más tolerables y una tasa de curación aumentada.

60

Kits

La presente divulgación también se refiere a kits que contienen componentes adecuados para tratar a un paciente. Los kits ejemplares pueden contener por lo menos un anticuerpo conjugado u otra fracción de direccionamiento como se describe en la presente. Si la composición que contiene los componentes para la

65

administración no está formulada para la administración a través del canal alimenticio, como la administración oral, puede incluirse un dispositivo capaz de administrar los componentes del kit a través de alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones como la administración parenteral, es una jeringuilla que se usa para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También pueden usarse dispositivos de inhalación.

5 Los componentes del kit pueden empaquetarse juntos o separarse en dos o más recipientes. En algunos ejemplos, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles de una composición que son adecuadas para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, una bolsita, bandeja, caja, tubo o similares. Los componentes del kit pueden empaquetarse y mantenerse esterilizados dentro de los recipientes. Otro componente que puede incluirse son las instrucciones para una persona que usa un kit para su uso. Varias realizaciones de la presente divulgación se ilustran mediante los siguientes ejemplos, que son para referencia.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de inmunoconjugados CL2A-SN-38

20 En un esquema de reacción preferido para la síntesis de CL2A-SN-38, se añadió EEDQ (0,382 g) a una mezcla de Fmoc-Lys(MMT)-OH disponible comercialmente (0,943 g) y alcohol p-aminobencílico (0,190 g) en cloruro de metileno (10 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. El tratamiento de extracción seguido de cromatografía ultrarrápida produjo 1,051 g de material como una espuma blanca. El espectro de masas por electropulverización mostró picos en m/e 745,8 (M+H) y m/e 780,3 (M+Cl⁺), consistente con la estructura. El producto intermedio Lys(MMT)-PABOH (0,93 g) se disolvió en dietilamina (10 ml) y se agitó durante 2 h. Después de la eliminación del solvente, el residuo se lavó en hexano para obtener 0,6 g del producto intermedio como un precipitado incoloro (91,6% de pureza por HPLC). tiempo de ret. de HPLC: 2,06 min. El espectro de masas por electropulverización mostró picos a m/e 523,8 (M+H), m/e 546,2 (M+Na) y m/e 522,5 (M-H).

30 Este producto intermedio bruto (0,565 g) se acopló con O-(2-azidoetil)-O'-(N-diglicolil-2-aminoetil)heptaetilenglicol ('PEG-N3', 0,627 g) disponible comercialmente usando EEDQ en cloruro de metileno (10 ml). La eliminación del solvente y la cromatografía ultrarrápida produjeron 0,99 g de producto intermedio azido-PEG-Lys(MMT)-PABOH (en aceite de color amarillo claro; 87% de rendimiento). El espectro de masas por electropulverización mostró picos en m/e 1061,3 (M+H), m/e 1082,7 (M+Na) y m/e 1058,8 (M-H), consistente con la estructura. El producto intermedio 3 (0,92 g) se hizo reaccionar con 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-cloroformiato en cloruro de metileno (10 ml) durante 10 min bajo argón. La mezcla se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para obtener 0,944 g de azido-PEG-Lys(MMT)-PAB-O-SN-38-TBDMS (rendimiento = 68%) como un aceite amarillo claro. A este producto intermedio (0,94 g) en cloruro de metileno (10 ml) se le añadió una mezcla de TBAF (1M en THF, 0,885 ml) y ácido acético (0,085 ml) en cloruro de metileno (3 ml), luego se agitó durante 10 min. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno (100 ml) y se lavó con citrato de sodio 0,25 M y salmuera. La eliminación del solvente proporcionó 0,835 g de azido-PEG-Lys(MMT)-PAB-O-SN-38 como un producto aceitoso amarillo (99% de pureza). El espectro de masas por electropulverización mostró picos en m/e 1478 (M+H), m/e 1500,6 (M+Na), m/e 1476,5 (M-H), m/e 1590,5 (M+TFA), consistente con la estructura.

45 Este producto intermedio de SN-38 derivatizado con azido (0,803 g) se hizo reaccionar con 4-(N-maleimidometil)-N-(2-propinil)ciclohexano-1-carboxamida ("MCC-ino"; 0,233 g) en cloruro de metileno (10 ml) en presencia de CuBr (0,0083 g), DIEA (0,01 ml) y trifetilfosfina (0,015 g), durante 18 h. El tratamiento de extracción, que incluyó el lavado con EDTA 0,1M (10 ml) y la cromatografía ultrarrápida produjeron 0,891 g de producto intermedio MCC-PEG-Lys(MMT)-PAB-O-SN-38 (rendimiento = 93%) como una espuma amarilla. El espectro de masas por electropulverización mostró picos en m/e 1753,3 (M+H), m/e 1751,6 (M-H), 1864,5 (M+TFA), consistente con la estructura. Finalmente, la desprotección con una mezcla de ácido dicloroacético (0,3 ml) y anisol (0,03 ml) en cloruro de metileno (3 ml), seguido de precipitación con éter produjo 0,18 g (97% de rendimiento) de producto final CL2A-SN-38 en forma de polvo amarillo claro. El espectro de masas por electropulverización mostró picos en m/e 1480,7 (M+H), 1478,5 (M-H), consistente con la estructura.

55 *Conjugación con anticuerpos*

60 El MAb humanizado anti-CEACAM5, hMN-14, el MAb humanizado anti-CD22, hLL2, el MAb humanizado anti-CD20, hA20, el MAb humanizado anti-EGP-1, hRS7, y el MAb humanizado anti-mucina, hPAM4, se conjugaron con CL2A-SN-38 para preparar inmunoconjugados. Cada anticuerpo se redujo levemente con Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en tampón de fosfato a un pH en el intervalo de 7-7,4, el pH se ajustó a 6,5 y se hizo reaccionar con un exceso molar de ~10 veces de CL2A-SN-38 usando DMSO al 5-10% v/v como cosolvente e incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Cualquier exceso de tiol se tapó con N-etilmaleimida usada como una solución acuosa en un exceso molar de 10 veces con respecto al anticuerpo.

65 El conjugado se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF), usando 20-30 volúmenes de

5 diafiltración del tampón de formulación final, MES 25 mM, pH 6,5. Este método evitó la engorrosa purificación secuencial en columnas de exclusión por tamaño e hidrófobas, permitiendo purificar de este modo cientos de gramos de conjugados de una manera sencilla. El producto se analizó para SN-38 mediante absorbancia a 366 nm y correlacionando con valores estándar. La concentración de proteína se dedujo de la absorbancia a 280 nm, corregida por el desbordamiento de la absorbancia de SN-38 a esta longitud de onda. A partir de estos, se determinaron las relaciones de sustitución de SN-38/MAB (DAR). Los conjugados purificados se almacenaron como formulaciones liofilizadas en viales de vidrio, se taparon al vacío y se almacenaron en un congelador a -20° C. Las relaciones de fármaco-anticuerpo (DAR) estaban típicamente en el intervalo de 5 a 7 (es decir, de 5 a 7 fracciones de fármaco por fracción de anticuerpo).

10 Los ADC descritos anteriormente se purificaron y se intercambiaron con tampón con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), pH 6,5, y se formularon adicionalmente con trehalosa (concentración final 25 mM) y polisorbato 80 (concentración final 0,01% v/v), con la concentración de tampón final llegando a 22,25 mM como resultado de la adición de excipiente. Los conjugados formulados se liofilizaron y almacenaron en viales sellados, con almacenamiento a 2° C - 8° C. Los inmunconjugados liofilizados eran estables en las condiciones de almacenamiento y mantuvieron sus actividades fisiológicas.

15 **Ejemplo 2. Estudios preclínicos en varios tumores sólidos tratados con IMMU-132**

20 *Caracterización in vitro* - Se usó una línea celular de carcinoma de próstata humano positiva para TROP-2, PC-3, como objetivo para evaluar los posibles cambios en la unión al antígeno por IMMU-132 en comparación con la IgG de hRS7 no conjugada. Como se midió en tres ocasiones separadas, no hubo diferencia significativa entre la unión de IMMU-132 y la IgG de hRS7 no conjugada (valor de K_D , $0,658 \pm 0,140$ nM frente a $0,564 \pm 0,055$ nM, respectivamente).

25 La unión del receptor neonatal humano (FcRn) se determinó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (BIACore) usando un chip biosensor de FcRn de baja densidad. Tres ciclos de unión usando tres conjuntos separados de cinco diluciones para cada agente de prueba demostraron que la conjugación de SN-38 con hRS7 IgG no afectó significativamente a su afinidad de unión por FcRn (valores de K_D $92,4 \pm 5,7$ nM y $191,9 \pm 47,6$ nM, respectivamente; $P = 0,07$).

30 TROP-2 se expresa en una amplia variedad de líneas celulares de tumores sólidos humanos, incluyendo las líneas celulares de TNBC (por ejemplo, MDA-MB-231 y MDA-MB-268). Los niveles de expresión varían entre los tipos de tumores y dentro de los tipos (**Tabla 2**). Por ejemplo, hay aproximadamente 10 veces más TROP-2 expresados por MDA-MB-468 en comparación con MDA-MB-231, pero no hay diferencia cuando se compara con la línea tumoral HER2⁺ SK-BR-3. Todos estos tipos de tumores son sensibles a los efectos citotóxicos de IMMU-132. Las concentraciones necesarias para causar un 50% de inhibición del crecimiento (valores de IC_{50}) están en el intervalo nanomolar bajo. En estos ensayos, el SN-38 libre tiende a ser más citotóxico que el ADC, pero esto se debe más probablemente a la disponibilidad inmediata del fármaco en forma libre frente al tiempo que tarda el IMMU-132 en unirse y ser captado por la célula. No parece haber una correlación entre los niveles de expresión de TROP-2 y la sensibilidad a SN-38. BxPC-3 tiene el nivel de expresión más alto de TROP-2, pero hay una diferencia de 4 veces en los valores de IC_{50} entre el SN-38 libre e IMMU-132, mientras que COLO 205 expresaron aproximadamente 8 veces menos TROP-2 en comparación, pero muestra sólo una diferencia de 2 veces en los valores de IC_{50} .

Tabla 2. Niveles de expresión de TROP-2 y valores de IC₅₀ calculados (nM) para SN-38 libre e IMM-132 en varias líneas de tumores de cánceres sólidos

Línea celular	Tipo de tumor	¹ Expresión de TROP-2	SN-38 libre	² IMMU-132	³ actividad de ADC/SN-38
Capan-1	Pancreático	157,376 ± 36,976	6	9	1,5
BxPC-3	Pancreático	493,773 ± 97,779	1	4	4
Calu-3	NSCLC	128,201 ± 50,708	7	20	2.9
SK-MES-1	Pulmón de células escamosas	29.488 ± 5.824	9	23	2.6
NCI-N87	Gástrico	246,857 ± 64,651	4	4	1
COLO 205	Colon	58.179 ± 6.909	1	2	2
SK-OV-4	Ovario	n.d.	18	18	1
PC-3	Próstata	n.d.	2	4	2
MDA-MB-468	TNBC	301.603 ± 29.470	2	4	2
MDA-MB-231	TNBC	32.380 ± 5.460	6	19	3.2
SK-BR-3	Mama HER2 ⁺	328 281 ± 47 996	2	3	1,5

¹ Número de moléculas de TROP-2 de superficie por célula; ² el valor de IC₅₀ se muestra como SN-38 equivalentes de IMM-132; ³ diferencia de veces en los valores de IC₅₀ entre SN-38 libre y ADC. n.d. No realizado (expresión de TROP-2 confirmada por análisis FACS, pero no se ha determinado el número de copias por célula).

Eficacia in vivo en varios tumores sólidos - Los estudios iniciales de eficacia de IMM-132 se realizaron en múltiples modelos de xenoinjerto de tumores sólidos (Cardillo et al., Clin Cancer Res 2011; 17:3157-3169). Estos incluyeron cánceres de páncreas, pulmón, colon y gástrico (**FIG. 3**; las dosis se dan en equivalentes de SN-38). En los 6 tumores sólidos examinados, IMM-132 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina (P<0,043, área bajo la curva AUC). En 5 de 6, la terapia con IMM-132 específica proporcionó una respuesta antitumoral significativa cuando se compara con un ADC de control de direccionamiento no tumoral (P<0,05, AUC). Además, IMM-132 proporcionó un efecto antitumoral significativamente mayor en comparación con los ratones a los que se les administró el equivalente a 10 veces más de SN-38 en forma de irinotecán (FIGS. 3A, C y D). Solo cuando se administró la MTD de irinotecán a los animales se logró la paridad con el ADC en estos experimentos (**FIGS. 3B y E**). Sin embargo, los equivalentes totales de SN-38 contenidos en el régimen de irinotecán administrado a ratones totalizaron ~2400 µg, que fue 37,5 veces mayor que los equivalentes de SN-38 administrados con el régimen de tratamiento de IMM-132 (64 µg). Es importante destacar que los ratones convierten el irinotecán en SN-38 de manera más eficiente, entre 5 y 10 veces más que los humanos (Morton et al. Cancer Res 2000; 60(15):4206-4210; Furman et al. J Clin Oncol 1999; 17(6) 1815-1824; Zamboni et al. Clin Cancer Res 1998; 4(2):455-462). Por tanto, incluso con esta gran ventaja del irinotecán en los ratones, IMM-132 proporcionó un efecto antitumoral equivalente.

Ejemplo 3. Estudios in vivo en TNBC tratados con IMM-132

Se evaluó IMM-132 en ratones portadores de tumores TNBC MDA-MB-468 (**FIG. 4A**; las dosis se dan en equivalentes de SN-38). IMM-132 (0,2 mg/kg) provocó regresiones tumorales significativas en comparación con la solución salina, irinotecán (6 mg/kg) o control anti-CD20 ADC, hA20-CL2A-SN-38 (P<0,0012, AUC). Incluso cuando la dosis se redujo a 0,12 mg/kg, IMM-132 redujo significativamente el volumen tumoral en los ratones (P<0,0017, AUC). Es importante destacar que la cantidad total de equivalentes de SN-38 administrados a esta baja cantidad de IMM-132 fue de solo 9,6 µg, mientras que los 6 mg/kg administrados a los ratones representaron una ventaja de 62,5 veces (dosis acumulada de 600 µg). Sin embargo, en el momento en que se perdió el primer ratón del grupo de irinotecán debido a la progresión de la enfermedad, los volúmenes tumorales (TV) en los ratones tratados con IMM-132 (0,12 mg/kg) eran significativamente más pequeños que en los ratones tratados con irinotecán (TV=0,17 ± 0,12 cm³ frente a 0,53 ± 0,29 cm³, respectivamente; P=0,0094, prueba t de dos colas). Como se encontró en los otros modelos de tumores sólidos, el direccionamiento específico de una pequeña cantidad de SN-38 al tumor con IMM-132 fue mucho más eficaz que una dosis mucho mayor de fármaco no dirigido.

En el día 56 de la terapia (día 78 después del trasplante), los tumores en ratones del grupo de control de dosis baja de hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) (0,12 mg/kg) progresaron hasta un punto en el que no eran diferentes de los ratones de control de solución salina (TV=0,74 ± 0,41 cm³ frente a 0,63 ± 0,37 cm³, respectivamente). En ese punto temporal, se decidió determinar si estos tumores responderían al tratamiento con IMM-132, a pesar de su progresión a un tamaño considerablemente más grande (**FIG. 4B**). Todos los ratones demostraron una respuesta positiva con los tumores significativamente más pequeños cinco semanas después que cuando la terapia con IMM-132 comenzó el día 78 (TV=0,14 ± 0,14 cm³ frente a 0,74 ± 0,41 cm³, respectivamente; P=0,0031, prueba t de dos colas), incluso los tumores que eran mayores de 1,0 cm³ en el momento en que comenzó el tratamiento con IMM-

132, reversionaron más del 88% (1,32 cm³ reversionaron a 0,06 cm³ y 1,08 cm³ reversionaron a 0,13 cm³). Al contrario que los efectos observados en MDA-MB-468, los ratones portadores de tumores de TNBC MDA-MB-231 no respondieron al tratamiento con IMMU-132 (**FIG. 4C**), lo que puede estar relacionado con la muy rápida proliferación de este tumor y/o su muy baja expresión de TROP-2.

5

Ejemplo 4. Ensayos clínicos en humanos con IMMU-132

IMMU-132 completó un ensayo de Fase I de búsqueda de dosis en 25 pacientes con diversos cánceres sólidos metastásicos, que recayeron después de su última terapia y tuvieron una mediana de 3 terapias anteriores. Veintitrés de los 25 fueron evaluables para RECIST1.1 mediante tomografía computarizada (TC), y los descubrimientos fueron los siguientes. (1) Un programa de dosis de tratamiento en los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, administrando 8-10 mg/kg por dosis, fue tolerable y eficaz. (2) Podrían administrarse ciclos repetidos, incluso hasta 10 meses, con retrasos de la dosis ocasionales y/o reducciones de la dosis, pero con una necesidad mínima de soporte hematopoyético con G-CSF. (3) A pesar de los cursos repetidos de terapia, no se detectaron anticuerpos antifármaco o anti-anticuerpos mediante una prueba ELISA sensible. (4) Las principales toxicidades fueron neutropenia, diarrea y alopecia, en consonancia con las del irinotecán, el compuesto original de SN-38 cuando se administra solo, pero más manejable con IMMU-132. (5) IMMU-132 mostró actividad antitumoral en sujetos humanos in vivo al lograr enfermedad estable en 13 pacientes, respuesta parcial en 3 (TNBC, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer colorrectal) y enfermedad progresiva en 7, como mejor respuesta. El tiempo más largo hasta la progresión fue de casi 57 semanas, en un paciente con cáncer de próstata refractario de hormonas metastásico en el estudio de Fase I.

Estos resultados están siendo confirmados en un ensayo de Fase II, que ya ha inscrito a más de 100 pacientes con diversos cánceres sólidos metastásicos en las dosis de 8 o 10 mg/kg administrada los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días, repetidas con tanta frecuencia como la condición y la tolerancia del paciente lo permiten. Los efectos secundarios no fueron diferentes a los experimentados en la experiencia de Fase I, pero la eficacia ha sido bastante alentadora, especialmente en pacientes con TNBC metastásico.

En la actualidad, entre 14 pacientes con TNBC evaluables por TC, 4 han experimentado una respuesta parcial, 6 tienen estabilización de la enfermedad (uno muestra una contracción del 27% por RECIST1.1) y 4 tienen enfermedad progresiva como mejor respuesta (**FIG. 5A-B**). La inscripción de TNBC en este ensayo continúa, con la expectativa de que se evalúe la seguridad y respuesta de 20 pacientes. Estos pacientes con TNBC tenían de 1 a 9 terapias anteriores, recayendo a la última antes de ser inscritos. Cabe destacar que los pacientes de 12 a 14 años, que mostraban RP, habían recibido de 2 a 6 terapias anteriores antes de inscribirse.

El primer paciente que respondió en la parte de la Fase I mostró una respuesta impresionante entre la afectación de la piel antes y después de la terapia (no mostrado). Otros pacientes con respuestas parciales en la Fase II incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de esófago y cáncer de vejiga urinaria.

Estos resultados confirman que IMMU-132 tiene un mejor índice terapéutico que el irinotecán, ya que es activo a dosis menos tóxicas, lo que indica que las dosis más altas de SN-38 dirigidas selectivamente por el anticuerpo anti-TROP-2 proporcionan suficiente daño selectivo al ADN por este inhibidor de la topoisomerasa I para lograr respuestas en más tipos de cáncer de los que se conoce que responden a esta clase de agentes. Es sorprendente la alta tasa de respuesta observada en pacientes con TNBC metastásico después de que fracasaron terapias anteriores repetidas, ya que es bien sabido que las respuestas disminuyen con cada terapia sucesiva. La evaluación por inmunohistoquímica ha demostrado que casi todos los especímenes tumorales archivados en este ensayo expresaron el antígeno objetivo, TROP-2. En un estudio separado de micromatrices tumorales de TNBC y no TNBC, hemos confirmado que más del 90% expresan TROP-2, de los cuales más del 65% tienen tinción 2+ y 3+ intensa. Por tanto, concluimos que el TNB, y probablemente también los no TBC, son neoplasias sensibles a este anticuerpo conjugado SN38 dirigido a TROP-2 en estos cánceres, lo que representa por tanto la primera terapia dirigida al tumor para TNBC.

Toxicidades limitantes de la dosis y posibles preocupaciones cuando se combinan con otros agentes

La neutropenia tolerable (sin evidencia de neuropatías u otros efectos secundarios que son prominentes para las adriamicinas, taxanos y agentes de platino) sugiere que IMMU-132 puede combinarse con uno o más de estos agentes, especialmente en pacientes sin tratamiento previo en un entorno neoadyuvante. Dado el uso prolongado de paclitaxel seguido o precedido por doxorubicina + ciclofosfamida, razonamos que IMMU-132 debe administrarse en combinación con paclitaxel durante doce semanas, donde el ciclo típico de IMMU-132 es de 8 mg/kg administrado los días 1 y 8 cada 21 días. Después de completar el régimen de tratamiento de 12 semanas con paclitaxel ± IMMU-132, se administran doxorubicina y ciclofosfamida durante 4 ciclos, cada dos semanas, según los protocolos estándar que se estén usando (ejemplos a continuación). El brazo de control solo tiene terapia con paclitaxel, doxorubicina + ciclofosfamida, según el brazo de investigación donde IMMU-132 es un complemento. Para limitar la neutropenia y evitar la neutropenia febril, se permite la reducción de la dosis de IMMU-132 en su

65

régimen de acuerdo con el grado y la duración de la neutropenia experimentada por la combinación. Como en la experiencia actual, el paclitaxel también puede necesitar reducción, y la opción de soporte hematopoyético con G-CSF (por ejemplo, Neupogen) se deja a criterio del médico tratante para el primer ciclo de terapia. Sin embargo, necesitamos una terapia profiláctica con G-CSF después de comenzar la segunda rama de doxorubicina + ciclofosfamida (en base a la recomendación de los coinvestigadores).

En base a nuestra experiencia con IMMU-132 en más de 125 pacientes con cáncer metastásico tratados hasta la fecha con múltiples ciclos de terapia, y donde los pacientes recibieron muchas terapias citotóxicas anteriores, se usan la siguiente dosis y programa de IMMU-132. Aunque los pacientes con varias terapias anteriores han tolerado múltiples dosis de IMMU-132 a 8, 10 e incluso 12 mg/kg, estamos usando 8 mg/kg para esta combinación ya que este nivel de dosis rara vez da como resultado neutropenia >grado 2, incluso después de múltiples dosis, y es terapéuticamente activo a este nivel. Aunque esperamos que se produzcan efectos neutropénicos con paclitaxel, el nivel de dosis de 8,0 mg/kg de IMMU-132 mitiga los resultados más graves en esta combinación.

Ejemplo 5: Farmacocinética e inmunogenicidad de pacientes con diversos cánceres avanzados que reciben IMMU-132

En el ensayo de Fase I analizado anteriormente, las muestras de suero se recogieron en el plazo de los 30 minutos posteriores al final de la infusión (la mayoría de las infusiones duraron de 2 a 3,5 h), lo que representa los niveles "máximos", y luego justo antes de la siguiente dosis, lo que representa los niveles "mínimos", para cada tratamiento. Se usaron dos ensayos ELISA para medir muestras de suero máximo y mínimo. Un ensayo usa placas recubiertas con un anticuerpo anti-SN-38 (desarrollado por Immunomedics) para capturar el producto uniendo el SN-38 unido al conjugado intacto (ADC). Luego, el producto unido se identifica como el anticuerpo de interés usando un anticuerpo anti-idiotipo específico (es decir, IgG anti-hRS7). Por tanto, este ensayo mide el conjugado intacto. El otro ensayo está configurado para detectar IgG de hRS7 en el suero. La **FIG. 6A** muestra los niveles máximos de IgG y ADC en los 4 niveles de dosis. Cuando los niveles máximos se normalizan al peso del paciente (es decir, $\mu\text{g/ml/kg}$), se observa una tendencia a aumentar las concentraciones a medida que aumenta la dosis (**FIG. 6B**).

El análisis de la concentración de los 2 productos en el suero de un paciente representativo sobre múltiples dosis mostró que los niveles máximos permanecieron en niveles similares, ajustándose a más bajos cuando se redujo la dosis (no mostrado). No hubo ADC presente en ninguna de las muestras mínimas, pero se pudieron detectar concentraciones bajas de IgG en el plazo de 7-14 días de la dosis anterior (no mostrado). Este descubrimiento es consistente con los datos de estabilidad in vitro que indican que el 50% del SN-38 se libera de la IgG en ~1 día (Cardillo et al., Clin Cancer Res 2011; 17:3157-3169).

Las muestras de suero máximas y mínimas seleccionadas de los pacientes inscritos en la parte de la Fase I del ensayo se sometieron a determinaciones de SN-38 extrayendo suero, con análisis por HPLC de fase inversa. El análisis se realizó en 2 partes, una que detectó SN-38 no unido en el suero extraído (libre), mientras que el otro proceso incluyó un paso de hidrólisis de ácido antes de la extracción que liberó SN-38 unido a la IgG (total), que luego se mediría como parte del total de SN-38 (es decir, unido + SN-38 libre). En 5 pacientes con determinaciones de SN-38 no unido, su nivel fue $\leq 3\%$ de la cantidad total de SN-38 encontrada en el suero (**Tabla 3**). Por tanto, $\geq 97\%$ del SN-38 en el suero se unió a la IgG en el plazo de los 30 minutos posteriores al final de la infusión.

Tabla 3. Concentraciones séricas (ng/ml) de SN-38, no unido (libre) y total (después de la hidrólisis de ácido). Se tomaron muestras 0,5 h después de la primera dosis en pacientes seleccionados

Nº de paciente	10 mg/kg	
	Total	Libre
10	7355	179
	12 mg/kg	
15	3230	97
17	3081	65
18	6675	118
22	6138	183

En pacientes seleccionados inscritos en la parte de expansión del ensayo, se recogieron muestras de PK adicionales 1, 2 y 3 días después de la primera y la segunda dosis para examinar la tasa de depuración de IgG, conjugado y SN-38 con más cuidado. La **FIG. 7** muestra un paciente representativo que recibió 8 mg/kg, con muestras adicionales recogidas 1 y 2 días después de cada uno de los 2 primeros tratamientos. La **FIG. 7A** traza la depuración de IgG e IMMU-132 para las 2 primeras dosis, y las muestras de máximo/mínimo que se recogieron para el siguiente ciclo (días 21 y 28). Estos datos confirman que el conjugado intacto se depura más rápidamente que la IgG, pero de nuevo, esto se produce porque el SN-38 está siendo liberado. Para el día 7, todo el SN-38 se habría liberado y, por lo tanto, no se detectó IMMU-132, mientras que todavía había una pequeña cantidad de IgG presente.

La **FIG. 7B** proporciona las concentraciones correspondientes de SN-38, TOTAL y LIBRE. De nuevo, la cantidad de SN-38 LIBRE fue sólo del 1,8 al 6,1% del total de SN-38 en las muestras. Para el día 7, solo queda una cantidad traza de SN-38 en el suero. La **FIG. 7C** traza el depuración de IMMU-132 en base al método de detección ELISA o en la concentración de SN-38 en el suero. Ambos conjuntos de datos se superponen, proporcionando evidencia de que el ELISA es una determinación sustituta razonable para la depuración de SN-38, lo que refleja el hecho de que la mayor parte del SN-38 en el suero está unido a la IgG.

IMMU-132 carece de inmunogenicidad, incluso después de repetidas inyecciones durante muchos meses. Los ensayos ELISA para detectar respuestas de anticuerpos a IgG o SN-38 de hRS7 se realizan antes del inicio del estudio y durante los tratamientos cada 4 a 6 semanas. Solo un paciente analizado hasta la fecha tenía un anticuerpo basal positivo para hRS7 IgG (es decir, >50 ng/ml). Sin embargo, no se han detectado respuestas de IgG anti-hRS7 ni de anticuerpos anti-SN-38 durante el curso del tratamiento en ningún paciente hasta la fecha, y esto es en pacientes que han recibido hasta 30 inyecciones.

15 Ejemplo 6. Esquemas de dosificación clínicos

Clínicamente, IMMU-132 se está administrando a 8 mg/kg (es decir, ~0,16 µg/kg de equivalentes de SN-38). Una dosis humana de 8 mg/kg se traduce en una dosis de ratón de 98,4 mg/kg o aproximadamente 2 mg en un ratón de 20 g. Esta dosis se fraccionó en uno de tres esquemas de dosificación diferentes, con un grupo de animales que recibió dos dosis de IMMU-132 de 1 mg (días 1 y 15), lo que representa un régimen de dosificación cada dos semanas, un grupo recibió cuatro dosis de 500 µg (días 1, 8, 22 y 29), lo que representa una vez a la semana durante 2 semanas en un ciclo de tratamiento de 21 días, y un grupo final que recibió ocho dosis de 250 µg (días 1, 4, 8, 11, 22, 25, 29 y 32), lo que representa dos veces por semana durante 2 semanas en un ciclo de tratamiento de 21 días. Estos esquemas de dosificación se probaron en modelos de xenoinjerto de carcinoma gástrico y adenocarcinoma pancreático humanos (**FIG. 8**).

En animales portadores de xenoinjertos de carcinoma gástrico humano NCI-N87 (**FIG. 8A**), las tres dosificaciones (2x1 mg, 4x0,5 mg y 8x0,25 mg) proporcionaron un efecto antitumoral significativo en comparación con los animales de control no tratados ($P < 0,0001$; AUC). Aunque no hubo diferencias significativas en la supervivencia, los grupos de 4x0,5 mg y 8x0,25 mg dieron como resultado tasas de respuesta positiva del 88% y el 100% frente a solo el 22% para el grupo de 2x1 mg. Además, el día 49 (el día en que el primer ratón del grupo de 2x1 mg alcanzó un volumen tumoral >1,0 cm³), los tumores eran significativamente más pequeños en el grupo de 4x0,5 mg (TV medio = 0,637 ± 0,274 cm³ frente a 0,341 ± 0,255 cm³, respectivamente; $P = 0,0259$). En total, 3 de los 8 ratones seguían vivos y aún demostraban una respuesta positiva en el grupo de 4x0,5 mg cuando el estudio finalizó el día 98 frente a 0 de 9 en el grupo de 2x1 mg.

De igual manera, en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 (**FIG. 8B**), las tres dosificaciones (2x1 mg, 4x0,5 mg y 8x0,25 mg) inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los animales de control no tratados ($P < 0,0009$; AUC). Tanto el grupo de 4x0,5 mg como el de 8x0,25 mg dieron como resultado tumores significativamente más pequeños el día 32 de la terapia en comparación con el grupo de tratamiento de 2x1 mg (día en que los primeros ratones fueron sacrificados para la progresión de la enfermedad; $P < 0,0093$). En general, los ratones tratados con 4x0,5 mg de IMMU-132 demostraron un efecto antitumoral significativo en comparación con el grupo de tratamiento de 2x1 mg ($P = 0,0357$). En términos de supervivencia, no hubo diferencias entre el grupo de 2x1 mg y el grupo de 4x0,5 mg (supervivencia mediana = 35 y 46 días, respectivamente). Sin embargo, los ratones tratados con 8x0,25 mg demostraron un beneficio de supervivencia superior en comparación con los otros dos grupos de tratamiento (MST = 53 días; $P < 0,0349$; rango logarítmico). Los tres tuvieron una tasa de respuesta positiva superior al 70% y no hubo una diferencia significativa en el tiempo hasta la progresión del tumor. En general, estos datos sugieren que fraccionar la dosis proporciona un mejor control del crecimiento que administrar una dosis en bolo grande cada dos semanas. Esto respalda que se implemente clínicamente la dosificación semanal.

50 Ejemplo 7. Tolerabilidad

Se utilizaron tanto ratones como monos cynomolgus para evaluar la toxicocinética de IMMU-132 (Cardillo et al., Clin Cancer Res 2011; 17:3157-3169) En ratones Swiss-Webster, se administraron dos dosis de IMMU-132 a equivalentes de SN-38 de 4, 8 o 12 mg/kg (dosis de proteína de 250, 500 o 750 mg/kg) con tres días de diferencia. No se observaron signos evidentes de toxicidad en los animales, como lo indica la ausencia de pérdida de peso corporal (resultados en el archivo). No se produjeron toxicidades hematopoyéticas y la química sérica solo reveló niveles elevados de aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) siete días después de la segunda inyección. Sin embargo, estas enzimas volvieron a la normalidad y no hubo evidencia de lesiones hepáticas en el examen histopatológico.

Como IMMU-132 no reacciona de manera cruzada con el TROP-2 expresado por ratones, se realizó un segundo estudio en un modelo de mono cynomolgus, cuyo TROP-2 es reconocido por IMMU-132. En este experimento, un grupo de seis monos (3 machos y 3 hembras) recibió 0,96 mg/kg de equivalentes de SN-38 (dosis

de proteína de 60 mg/kg) IMMU-132 mientras que un segundo grupo de seis recibió 1,92 mg/kg (dosis de proteína de 120 mg/kg). Las dosis se administraron con tres días de diferencia. Todos los monos toleraron las dos dosis de 0,96 mg/kg de IMMU-132 con solo disminuciones transitorias en los recuentos sanguíneos, todos los cuales permanecieron en el intervalo normal. La pérdida de peso fue menor al 8%, que volvió a la línea de referencia en el plazo de 15 días después de la inyección. La histopatología mostró solo cambios microscópicos de mínimos a moderados en los órganos hematopoyéticos y gastrointestinales, así como en los órganos reproductores femeninos, ocho días después de la segunda inyección. Todos estos volvían a la normalidad el día 32, el final del período de recuperación. Por el contrario, las dos dosis de 1,92 mg/kg (dosis de proteína de 120 mg/kg) resultaron ser tóxicas para los monos. Un animal murió como resultado de complicaciones gastrointestinales y supresión grave de la médula ósea. Los animales restantes de este grupo también demostraron toxicidades orgánicas similares a las observadas en los monos que recibieron las dosis de 0,96 mg/kg, pero a un nivel mucho más grave. Estas toxicidades en los órganos finales fueron consistentes con el irinotecán, pero lo más importante es que no hubo evidencia de toxicidad dirigida a TROP-2 en los muchos tejidos normales diferentes que expresan TROP-2. Este estudio sugirió que la dosis máxima tolerada para dos inyecciones de IMMU-132 estaba entre 0,96 y 1,92 mg/kg, lo que en la dosis equivalente en humanos estaría entre 20 y 40 mg/kg (dosis de proteínas).

Ejemplo 8. Mecanismo de acción

En general, las células cancerosas pueden experimentar apoptosis a través de una de las dos vías principales denominadas vías apoptóticas extrínsecas o intrínsecas (Fulda y Debatin, *Oncogene* 2006;25(34):4798-4811). La vía extrínseca se caracteriza por el acoplamiento de los receptores de muerte de la superficie celular (por ejemplo, receptores de la familia TNF) que lleva a la activación de la caspasa-8, que lleva a la activación de caspasas en sentido descendente como la caspasa-3 y, en última instancia, a la escisión de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), fragmentación del ADN y muerte celular. Por el contrario, la vía intrínseca puede desencadenarse o por daño directo del ADN (por ejemplo, radiación ionizante) o por otras tensiones celulares (por ejemplo, detención del ciclo celular) que llevan a la liberación del citocromo c de las mitocondrias al citoplasma. El citocromo c luego forma un complejo con el factor 1 de activación de proteasa apoptótica (APAF-1), que actúa como una plataforma para activar la caspasa-9, que luego comienza la cascada de activación de caspasa que incluye caspasa 3 y 7, escisión de PARP y muerte celular.

SN-38 es un conocido inhibidor de la topoisomerasa-I que induce un daño significativo al ADN de una célula. Interviene en la regulación por incremento de las proteínas proapoptóticas tempranas, p53 y p21^{WAF1/Cip1}, lo que da como resultado la activación de caspasa y la escisión de PARP (Cusack et al. *Cancer Res* 2001; 61:3535-3540; Liu et al. *Cancer Lett* 2009; 274:47-53; Lagadec et al. *Br J Cancer* 2008; 98:335-344; Whitacre et al. *Clin Cancer Res* 1999; 5:665-672). La expresión de p21^{WAF1/Cip1} se asocia con la detención de G₁ del ciclo celular y, por lo tanto, es un sello distintivo de la vía intrínseca (Sherr & Roberts, *Genes Dev* 1995; 9:1149-1163). Anteriormente demostramos que IMMU-132 podría mediar de igual manera la regulación por incremento de eventos de señalización de proapoptosis temprana (p53 y p21^{WAF1/Cip1}), lo que resulta en la escisión de PARP en líneas celulares de NSCLC (Calu-3) y pancreáticas (BxPC-3) (Cardillo et al., *Clin Cancer Res* 2011; 17:3157-3169).

Para definir mejor la vía apoptótica utilizada por IMMU-132, la línea celular de carcinoma gástrico humano NCI-N87 se expuso a 1 μ M de SN-38 libre o la cantidad equivalente de IMMU-132 (**FIG. 9A**). Tanto el SN-38 libre como el IMMU-132 median en la regulación por incremento de p21^{WAF1/Cip1}, aunque no es hasta 48 h que la cantidad de regulación por incremento es la misma entre las células expuestas a SN-38 libre frente a IMMU-132. Esto puede deberse al retraso en la captación y liberación de SN-38 del ADC en comparación con la disponibilidad inmediata cuando solo se añade el fármaco libre a las células cultivadas. Debido a la rápida depuración de irinotecán en relación con IMMU-132 in vivo, se esperaría que la ventaja de la acumulación de SN-38 en los tumores fuera con IMMU-132, como se demuestra a continuación en los estudios fármaco-toxicológicos.

En términos de activación de caspasa, tanto el SN-38 libre como el IMMU-132 demuestran la escisión de caspasa 9 y 7 en el plazo de las 48 h posteriores a la exposición. Este resultado es consistente con un informe anterior en una línea celular colónica de HT-29 en la que 10 nM provocaron la escisión de la caspasa 9 después de una exposición de 72 h (Lagadec et al. *Br J Cancer* 2008; 98:335-344). Sin embargo, en ese mismo informe, no vieron la escisión de la caspasa-3, mientras que nosotros mostramos la escisión. Podría ser que este sea un evento temprano que no se detecta a las 72 h o que la cantidad de SN-38 que usaron (10 nM) no fue lo suficientemente alta para mostrar esto en comparación con el 1 μ M que usamos en nuestros ensayos. Finalmente, tanto el SN-38 libre como el IMMU-132 median la escisión de PARP. Esto se hace evidente primero a las 24 h con un aumento de la escisión a las 48 h. Tomados en conjunto, estos datos confirman que el SN-38 contenido en IMMU-132 tiene la misma actividad que el SN-38 libre y que la vía apoptótica intrínseca está siendo inducida por este ADC.

El inhibidor de microtúbulos, paclitaxel, media la inducción de p21^{WAF1/Cip1} en carcinomas de mama humanos (Blagosklonny et al. *Cancer Res* 1995; 55: 4623-4626). Esta inducción puede ser independiente del estado de p53 (Li et al. *Cancer Res* 1996; 56: 5055-5062). Además, se ha demostrado que el paclitaxel activa la caspasa-2 en células de cáncer de mama humano, lo que a su vez comienza la cascada de activación de caspasa y la escisión de PARP (Jelinek et al. *Cancer Cell Int* 2013; 13:42). Como se muestra (**FIG. 9B**), IMMU-132 demostró de igual

madera que media la escisión de PARP en dos líneas celulares de mama humanas diferentes, incluyendo la TNBC MDA-MB-468. La escisión casi completa fue evidente en el plazo de 48 h de la exposición a 1 μM de SN-38 libre o la cantidad equivalente de IMMU-132. Además, p21^{WAF1/Cip1} se reguló por incremento en MDA-MB-468, que contiene p53 mutante. Los experimentos en curso ampliarán la determinación de qué caspasas se activan en las células de cáncer de mama por IMMU-132 y qué superposición, si la hay, puede existir con paclitaxel.

Un escenario en el mejor de los casos cuando se combinan dos quimioterapéuticos sería el logro de una sinergia. Para hacer esto, los dos agentes deberían trabajar por dos vías independientes que lleven al mismo fin o trabajar en conjunto para amplificar una única vía. Un ejemplo de esto en TNBC se mostró cuando el ácido metilselenínico se combinó con paclitaxel (Qi et al. PLoS ONE 2012; 7: e31539). Ambos agentes fueron capaces de activar la caspasa 3 e inducir la escisión de PARP solos, pero cuando se combinaron, aumentaron el grado de esta activación con el resultado de inhibir sinérgicamente el crecimiento celular. Al igual que el ácido metilselenínico, IMMU-132 utiliza muchas de estas mismas vías apoptóticas y, por lo tanto, también podría funcionar en sinergia con paclitaxel para amplificar estas señales.

Se ha demostrado que las combinaciones de paclitaxel con 5-FU, gemcitabina y carboplatino son antagónicas si no se administran en la secuencia correcta (Qi et al. PLoS ONE 2012; 7: e31539; Johnson et al. Clin Cancer Res 1997; 3: 1739-1745; Johnson et al. Clin Cancer Res 1999; 5: 2559-2565; Sui et al. Cancer Biol Ther 2006; 5: 1015-1021; Xiong et al. Cancer Biol Ther 2007; 6: 1067-1073). En el caso de gemcitabina y carboplatino, la administración de paclitaxel antes de estos otros agentes fue necesaria para prevenir el antagonismo (Sui et al. Cancer Biol Ther 2006; 5: 1015-1021; Xiong et al. Cancer Biol Ther 2007; 6: 1067-1073). Sin embargo, para el 5-FU, la secuenciación no cambió este resultado antagonista (Johnson et al. Clin Cancer Res 1999; 5: 2559-2565). Un hallazgo clave fue que el 5-FU bloqueó la inducción de paclitaxel de p21^{WAF1/Cip1}. Curiosamente, cuando SN-38 se combinó con 5-FU, se observó antagonismo si se añadía 5-FU antes que SN-38 o si se añadían simultáneamente. Solo cuando las células se expusieron primero a SN-38, pudo añadirse 5-FU para lograr la sinergia (Torigoe et al. Anticancer Res 2009; 29: 2083-2090). Como IMMU-132, como el paclitaxel, media en la regulación por incremento de p21^{WAF1/Cip1}, usa vías apoptóticas similares, y ambos tenían problemas antagónicos similares con el 5-FU, es posible que los dos agentes trabajen en sinergia. Los experimentos en curso están examinando los posibles beneficios de combinar la terapia de IMMU-132 con paclitaxel. Estos incluyen eventos de señalización de apoptosis in vitro y modelos in vivo de TNBC, en los que los ratones están siendo tratados con la combinación de IMMU-132 y paclitaxel.

Ejemplo 9. Estudios de farmacotoxicología de IMMU-132 frente a irinotecán en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas

Se examinaron la depuración y la captación de SN-38 en los tejidos en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas Capan-1 (~0,06-0,27 g) inyectados IV con 40 mg/kg de irinotecán (773 μg ; equivalentes totales de SN-38 = 448 μg) o IMMU-132 (1,0 mg con un DAR = 7,6, equivalentes de SN-38 = 20 μg). La dosis de irinotecán es la MTD en ratones y es equivalente en humanos a 3,25 mg/kg o ~126 mg/m². La dosis de IMMU-132 está muy por debajo de la MTD en ratones y representa una dosis equivalente humana de ~4 mg/kg de IMMU-132 (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ equivalentes de SN-38). Se realizaron necropsias de grupos de animales (n=3) en 5 intervalos; para irinotecán: 5 min, 1, 2, 6 y 24 h y para IMMU-132: 1, 6, 24, 48, 72 h. El suero tomado de los animales se diluyó 1:2 en agua y luego se extrajo con partes iguales de metanol: etilenglicol: ZnSO₄ 1M. En este medio, SN-38, SN-38G (glucuronidato) e irinotecán pasan a la fase orgánica, mientras que las proteínas se precipitan. Por tanto, cualquier SN-38 unido a la IgG se precipitaría y no se detectaría.

Para detectar el SN-38 unido a la IgG, la muestra de suero tuvo que hidrolizarse con ácido primero con HCl 6M y luego neutralizarse antes de añadir el medio de extracción. Este proceso libera todo el SN-38 unido a IgG, que se aislaría en la fase orgánica del medio de extracción, junto con cualquier SN-38 no unido (es decir, libre) que estuviera en la muestra. Se dice que las muestras extraídas hidrolizadas con ácido miden la cantidad TOTAL de SN-38 en la muestra, mientras que las muestras que solo se extraen miden el SN-38 no unido o libre en la muestra. La cantidad de SN-38 unido a IgG puede derivarse restando el libre del TOTAL. Por lo tanto, los homogeneizados de suero y tejido de animales tratados con IMMU-132 se procesan de 2 maneras, muestras no hidrolizadas/extraídas para aislar el SN-38 no unido y muestras hidrolizadas/extraídas con ácido que dan el SN-38 TOTAL. El tumor, el hígado y el contenido del intestino delgado se homogeneizó primero en agua (10 partes de agua por 1 parte de tejido). Todas las muestras antes de la extracción se enriquecen con un estándar interno, 10-hidroxi-camptotecina (10-OH CT), que ayuda en la cuantificación y el seguimiento de la recuperación. Se aplica una pequeña porción (por ejemplo, de 5 a 50 μl) de la fase orgánica del extracto a una columna de HPLC C-18 analítica que se precalibró con estándares de cada uno de los productos de interés. Se determina el AUC para cada pico de producto (es decir, SN-38, SN-38G, irinotecán y 10-OH CT). Se calcula una proporción entre el pico del producto y el pico del estándar interno y se representa frente a una curva estándar que varía de 10 a 10.000 ng/ml para cada agente. Los datos transformados logarítmicamente se ajustan usando regresión lineal. La sensibilidad del ensayo para las muestras de suero fue de 20 ng/ml, ya que las muestras se diluyeron 2:1 para análisis, mientras que la sensibilidad para las muestras de tejido fue de 110 ng/ml, ya que el homogeneizado se diluyó a 11:1 (1 parte de tejido por 10 partes de agua).

En los animales tratados con irinotecán, SN-38 solo pudo detectarse en los tumores a los 5 min, 1 y 2 h), sin embargo, se detectaron irinotecán y SN-38G en estas mismas muestras y en la muestra de 6 h (**FIG. 10**); ninguno de estos productos se detectó en la muestra de 24 h. A pesar de tener altos niveles de irinotecán en los tumores, las concentraciones de SN-38 o SN-38G fueron muy pequeñas. Por ejemplo, a las 2 h, con una media de $101,6 \pm 58,6$ $\mu\text{g/g}$ de irinotecán en los tumores, solo había $1,6 \pm 1,0$ (1,6%) y $1,3 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ (1,3%) de SN-38 y SN-38G en los tumores, respectivamente. Por tanto, aunque se introdujo una cantidad considerable de irinotecán en los tumores de Capan-1 muy rápidamente, el irinotecán dentro del tumor se convirtió muy deficientemente en SN-38.

Para los animales que recibieron IMMU-132, no hubo niveles detectables de SN-38 o SN-38G no unidos en el tumor; sin embargo, se detectaron niveles altos de SN-38 [TOTAL]. Como no se detectó SN-38 o SN-38G no unido, esto significa que todo el SN-38 en el tumor de los animales tratados con IMMU-132 estaba unido a la IgG, lo que ilustra que se mantiene la integridad del producto, con el SN-38 siendo administrado al tumor exclusivamente por la unión del conjugado al tumor. Es importante tener en cuenta que los equivalentes molares de SN-38 inyectados con IMMU-132 son solo una fracción de los equivalentes molares de SN-38 contenidos en los animales inyectados con irinotecán (por ejemplo, 448 μg de SN-38, o si se basa en una conversión del 25%, ~ 115 μg frente a 20 μg para IMMU-132).

Comparando el AUC para SN-38 administrado a los tumores para irinotecán (3.9 $\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$) con el de SN-38 [TOTAL] en los tumores para IMMU-132 (474 $\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$), se encuentra que IMMU-132 tiene la capacidad de administrar casi 120 veces más SN-38 al tumor Capan-1 que el irinotecán, aunque, como en este estudio, a los animales se les dieron 22 veces menos equivalentes de SN-38 con IMMU-132 que con irinotecán (448 frente a 20 μg).

Se realizó un análisis similar en animales que portaban tumores Capan-1 a los que se les administró un conjugado de anticuerpo irrelevante y no dirigido. Las concentraciones en tumor/sangre de IMMU-132 fueron 4 veces más altas que las proporciones encontradas en los animales que recibieron el conjugado de anticuerpo SN-38 no dirigido, confirmando los beneficios de usar un conjugado que se une específicamente al tumor.

Análisis de hígado y heces: Los niveles de SN-38 no unido en el hígado de los animales que recibieron IMMU-132 fueron muy bajos, con una media de 130 ± 58 ng/g a 1 h, sin niveles detectables encontrados en un momento posterior. Incluso las concentraciones de SN-38 [TOTAL] fueron relativamente bajas, promediando de 1023 ± 202 , 909 ± 186 y 203 ± 29 ng/g a 1, 6 y 24 h, respectivamente, sin niveles detectables encontrados en el hígado a las 48 y 72 h. Esto concuerda con las concentraciones relativamente bajas de SN-38 libre en las heces aisladas del intestino delgado (442 ± 103 ng y 912 ± 373 ng en todo el contenido a las 1 y 6 h). Las concentraciones de SN-38 en las muestras TOTAL-procesadas (unido + no unido) fueron solo ligeramente más altas que en las muestras procesadas LIBRES (no unido), lo que confirma que el conjugado intacto no atraviesa la vía de eliminación hepatobiliar hacia el intestino.

En los animales tratados con irinotecán, las concentraciones de SN-38 fueron mucho más altas, alcanzando un máximo en el hígado a los 5 min (3511 ± 476 ng/g), disminuyendo a 1296 ± 505 ng/g a la 1 h (en este momento, es casi 10 veces mayor que el SN-38 no unido en animales que recibieron IMMU-132), y finalmente midiendo 638 ng/g a las 6 h antes de volverse indetectable a las 24 h. Sorprendentemente, SN-38 pudo detectarse en el contenido del intestino delgado incluso a los 5 min (799 ± 550 ng/g) y manteniendo un nivel de ~ 10.000 ng/g durante 6 h antes de volverse indetectable a las 24 h. Esto ilustra la rapidez con la que el irinotecán se convierte en SN-38 y SN-38G. Como se ha mencionado anteriormente, los datos de depuración sanguínea mostraron que más del 98% del producto se eliminó de la sangre en solo 5 minutos.

Ejemplo 10: Conjugados anti-CD74-CL2A-SN-38 para el tratamiento de cánceres humanos CD74+ (no reivindicado)

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

Milatuzumab-doxorrubicina fue más eficaz en el modelo de linfoma, mientras que en A-375 y Capan-1, solo el milatuzumab-CL2A-SN-38 mostró un beneficio terapéutico. A pesar de una expresión de superficie mucho más baja de CD74 que TROP-2 o CEACAM6, milatuzumab-CL2A-SN-38 tuvo una eficacia similar en Capan-1 como anti-

TROP-2-CL2A-SN-38, pero en NCI-N87, los conjugados anti-CEACAM6 y anti-TROP-2 fueron superiores. Los estudios en 2 líneas celulares de hepatoma a un nivel de dosis única mostraron un beneficio significativo sobre los animales tratados con solución salina, pero no frente a un conjugado de IgG irrelevante. CD74 es un objetivo adecuado para los ADC en algunos xenoinjertos de tumores sólidos, con eficacia influenciada en gran medida por la uniformidad de la expresión de CD74, y con conjugados de SN-38 ligados a CL2A que proporcionan las mejores respuestas terapéuticas.

Materiales y métodos

Líneas de células tumorales humanas. Las líneas celulares de linfoma Raji Burkitt, A-375 (melanoma), Capan-1 (adenocarcinoma pancreático), NCI-N87 (carcinoma gástrico), hepatoma Hep-G2 y mieloma MC/CAR se adquirieron de American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). La línea celular de hepatoma HuH-7 se adquirió del Japan Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japón). Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora de CO₂ humidificada (5%) a 37° C en un medio recomendado que contenía entre un 10% y un 20% de suero de ternero fetal y suplementos. Las células se pasaron <50 veces y se revisaron regularmente para detectar micoplasmas.

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

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

Citometría de flujo e inmunohistología. La citometría de flujo se realizó de una manera que proporcionó una evaluación de sólo el antígeno unido a la membrana, de membrana o citoplasmático. La inmunohistología se realizó en secciones de xenoinjertos tumorales subcutáneos embebidas en parafina y fijadas con formalina, teñidas sin métodos de recuperación de antígenos, usando anticuerpos a 10 µg/ml que se revelaron con un conjugado anti-IgG humana.

Estudios In Vivo. Se adquirieron ratones desnudos hembra (4-8 semanas de edad) o ratones SCID hembra (7 semanas de edad) de Taconic (Germantown, NY) y se usaron después de una cuarentena de 1 semana. Todos los agentes, incluyendo los controles de solución salina, se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas. Las dosis específicas se dan en los Resultados. La toxicidad se evaluó mediante mediciones de peso semanales. Para el modelo de linfoma de Raji Burkitt, los ratones SCID se inyectaron por vía intravenosa con 2,5 x 10⁶ células Raji en 0,1 ml de medio. Cinco días después, los animales recibieron una única inyección intravenosa (0,1 ml) del conjugado o solución salina (N=10/grupo). Los ratones se observaron diariamente en busca de signos de angustia y parálisis, y se sacrificaron cuando se desarrolló cualquiera de parálisis de las extremidades traseras, >15% de pérdida de peso inicial o si estaban moribundos (criterios de valoración sustitutos de supervivencia).

Se midieron tumores subcutáneos mediante un calibre en dos dimensiones, y el volumen tumoral (TV) se calculó como $L \times w^2/2$, donde L es el diámetro más largo y w es el más corto. Las mediciones se realizaron por lo menos una vez a la semana, y los animales terminaron cuando los tumores crecieron hasta 1,0 cm³ (es decir, criterio de valoración de supervivencia sustituto). La línea celular de melanoma A-375 (6 x 10⁶ células en 0,2 ml) se implantó en ratones desnudos y la terapia se inició cuando los tumores promediaron 0,23 ± 0,06 cm³ (N = 8/grupo). Se implantó Capan-1 por vía subcutánea en ratones desnudos usando una combinación de suspensión tumoral de tumores sometidos a pases en serie (0,3 ml de una suspensión tumoral al 15% p/v) combinada con 8 x 10⁶ células de cultivo de tejido. Los tratamientos se iniciaron cuando el TV promedió 0,27 ± 0,05 cm³ (N = 10/grupo). Los xenoinjertos de tumor gástrico NCI-N87 se iniciaron mediante la inyección de 0,2 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de matrigel y 1x10⁷ células de cultivo de terminal por vía subcutánea. La terapia se inició cuando el TV promedió 0,249 ± 0,045 cm³ (N = 7/grupo). Se siguió el mismo procedimiento para desarrollar los xenoinjertos de hepatoma Hep-G2 y HuH-7 en ratones desnudos. La terapia se inició cuando Hep-G2 promedió 0,364 ± 0,062 cm³ (N = 5/grupo) y HuH-7 promedió 0,298 ± 0,055 cm³ (N = 5/grupo).

La eficacia se expresa en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, usando los criterios de valoración sustitutos mencionados anteriormente para determinar los tiempos de supervivencia medianos. El análisis se realizó mediante una prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox) usando el software Prism GraphPad (LaJolla, CA), con

significancia a $P < 0,05$.

Resultados

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

Tabla 4. Expresión de CD74 por citometría de flujo expresada como intensidad fluorescente media (MFI) de las células cerradas positivas para milatuzumab.

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

ND, no realizado
^aMFI de fondo de células incubadas con GAH-FITC solamente.

30 La inmunohistología mostró que los xenoinjertos subcutáneos de Raji tenían una tinción en gran medida uniforme e intensa, con un prominente marcado de la superficie celular (no mostrado). La línea celular de hepatoma Hep-G2 tuvo la captación más uniforme de los tumores sólidos, con tinción moderadamente fuerte, pero predominantemente citoplásmica (no mostrada), seguida de la línea celular de melanoma A-375 que tenía una tinción algo menos uniforme con expresión más intensa, sin embargo principalmente citoplásmica (no mostrado).
 35 Las líneas celulares de carcinoma gástrico pancreático Capan-1 (no mostrado) y NCI-N87 (no mostrado) tenían una tinción de CD74 de moderada (Capan-1) a intensa (NCI-N87), pero no estaba distribuida uniformemente. La línea celular de hepatoma HuH-7 (no mostrado) tenía la tinción menos uniforme y la más débil.

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

45 Liberación de fármacos in vitro y estabilidad en uso de conjugados. Los mecanismos de liberación de SN-38 de los conectores CL2A y CL2E cubiertos con mercaptoetanol se determinaron en un entorno que simulaba parcialmente las condiciones lisosomales, concretamente pH bajo (pH 5,0) y en presencia o ausencia de catepsina B. El sustrato de CL2E-SN-38 era inerte a pH 5 en ausencia de la enzima (no mostrado), pero en presencia de catepsina B, la escisión en el sitio Phe-Lys procedió rápidamente, con una vida media de 34 min (no mostrado).
 50 La formación de SN-38 activo requiere la ciclación intramolecular del enlace carbamato en la 10^a posición de SN-38, que se produjo más lentamente, con una vida media de 10,7 h (no mostrado).

55 Como era de esperar, la catepsina B no tuvo ningún efecto sobre la liberación de SN-38 activo en el conector de CL2A. Sin embargo, CL2A tiene un enlace de carbonato de bencilo escindible, que libera el SN-38 activo a una tasa similar al conector de CL2E a pH 5,0, con una vida media de $\sim 10,2$ h (no mostrado). El conjugado de milatuzumab-doxorubicina, que tiene un enlace de acilhidrazona sensible al pH, tuvo una vida media de 7 a 8 h a pH 5,0 (no mostrado).

60 Aunque todos estos conectores liberan el fármaco a tasas relativamente similares en condiciones lisosómicamente relevantes, tienen estabilidades muy diferentes en suero. EL milatuzumab-CL2A-SN-38 liberó el 50% de SN-38 libre en $21,55 \pm 0,17$ h (no mostrado), consistente con otros conjugados CL2A-SN-38. El conjugado CL2E-SN-38, sin embargo, fue altamente inerte, con una vida media extrapolada a ~ 2100 h. El conjugado de milatuzumab-doxorubicina liberó el 50% de la doxorubicina en 98 h, que fue similar a otros 2 conjugados de anticuerpo-doxorubicina (no mostrado).

65 • [0296]

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

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

El SN-38 estable enlazado a CL2E funcionó comparativamente bien en la línea celular Raji, en comparación con el SN-38 libre, pero tuvo una potencia sustancialmente menor (de 7 a 16 veces) en las 4 líneas celulares de tumores sólidos, lo que sugiere que un nivel de expresión superficial relativamente bajo de CD74 puede desempeñar un papel en la minimización del transporte de fármacos en estos tumores sólidos. El conjugado de milatuzumab-doxorubicina tenía diferencias sustanciales en su potencia en comparación con la doxorubicina libre en todas las líneas celulares, que era de magnitud similar a la de los conjugados CL2E-SN-38 con SN-38 libre en las líneas celulares de tumores sólidos.

En las 6 líneas celulares adicionales mencionadas anteriormente, el conjugado milatuzumab-CL2A-SN-38 fue de 9 a 60 veces más potente que el conjugado milatuzumab-doxorubicina (no mostrado), pero de nuevo, este resultado fue influenciado en gran medida por el hecho de que el conjugado enlazado a CL2A libera la mayor parte de su SN-38 al medio durante el período de incubación de 4 días, mientras que el conjugado de doxorubicina liberaría como máximo el 50% de su fármaco durante este mismo tiempo. El milatuzumab enlazado a CL2E no se examinó en estas otras líneas celulares.

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

Los estudios iniciales examinaron primero los conjugados de doxorubicina y SN-38 en un modelo de linfoma Raji diseminado para evaluar cómo se comparaba el conjugado de milatuzumab-doxorubicina con los 2 conjugados de SN-38 (no mostrado). Todos los conjugados específicos fueron significativamente mejores que el conjugado de labetuzumab-SN-38 no de direccionamiento o los animales tratados con solución salina, que tuvieron una supervivencia mediana de solo 20 días ($P < 0,0001$). A pesar de que los estudios in vitro indicaron una ventaja de hasta 8 veces para los conjugados SN-38 en Raji, la mejor supervivencia se observó con los conjugados milatuzumab-doxorubicina, donde todos los animales recibieron una dosis única de 17,5 mg/kg (350 μ g) y 7/10 animales que recibieron 2,0 mg/kg (40 μ g) estaban vivos al final del estudio (día 112) (por ejemplo, dosis de 17,5 mg/kg de milatuzumab-doxorubicina frente a milatuzumab-CL2A-SN-38, $P = 0,0012$). La supervivencia fue significativamente más baja para los conjugados CL2E-SN-38 más estables ($P < 0,0001$ y $P = 0,0197$, dosis de 17,5 y 2,0 mg/kg para CL2A frente a CL2E, respectivamente), incluso aunque los estudios in vitro sugirieron que ambos conjugados liberarían SN-38 activo a tasas similares cuando se internalizaron.

Se examinaron cinco líneas de células tumorales sólidas, comenzando con la línea celular de melanoma A-375, ya que tenía la mejor respuesta in vitro tanto a la doxorubicina como al SN-38. Los xenoinjertos de A-375 crecieron rápidamente, teniendo los animales de control tratados con solución salina una supervivencia mediana de sólo 10,5 días (no mostrado). Una dosis de 12,5 mg/kg (0,25 mg por animal) dos veces a la semana del conjugado de milatuzumab-CL2A-SN-38 prolongó la supervivencia a 28 días ($P = 0,0006$), que fue significativamente mejor que el conjugado epratuzumab-CL2A-SN-38 de control que tiene una supervivencia mediana de 17,5 días ($P = 0,0089$),

no siendo este último significativamente diferente de los animales tratados con solución salina ($P = 0,1967$). El conjugado milatuzumab-CL2A proporcionó una supervivencia significativamente más prolongada que el conjugado milatuzumab-CL2E-SN-38 ($P = 0,0014$), que tuvo la misma supervivencia mediana de 14 días que su conjugado epratuzumab-CL2E-SN-38 de control. A pesar de dar una dosis 2 veces más alta del milatuzumab-doxorrubicina que los conjugados de SN-38, la supervivencia mediana no fue mejor que la del animales tratados con solución salina (10,5 días).

Al igual que con el modelo de melanoma A-375, en Capan-1, solo el conjugado SN-38 enlazado a CL2A fue efectivo, con una supervivencia mediana de 35 días, significativamente diferente de los animales no tratados ($P < 0,036$) (no mostrado), incluso a una dosis más baja (5 mg/kg; 100 μ g por animal) ($P < 0,02$). Ni el milatuzumab-CL2E ni los conjugados epratuzumab-CL2A-SN-38 no de direccionamiento, o una dosis 2 veces más alta del conjugado milatuzumab-doxorrubicina, proporcionaron ninguna ventaja de supervivencia ($P = 0,44$ frente a solución salina). Es de destacar que en el mismo estudio con animales que recibieron la misma dosis del conjugado de internalización anti-TROP-2 CL2A-SN-38 (hRS7-SN-38; IMMU-132), la supervivencia mediana fue igual a milatuzumab-CL2A-SN-38 (no mostrado). El conjugado hRS7-CL2A-SN-38 se había identificado anteriormente como un ADC de interés para tratar una variedad de tumores sólidos (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). El MFI para hRS7 de unión a la superficie en Capan-1 fue 237 (no mostrado), en comparación con 22 para milatuzumab (ver **Tabla 4**). Por tanto, a pesar de tener una expresión de antígeno de superficie sustancialmente menor, el conjugado milatuzumab-CL2A-SN-38 funcionó tan bien como el conjugado hRS7-CL2A-SN-38 en este modelo.

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

En el modelo de tumor gástrico, NCI-N87, los animales que recibieron 17,5 mg/kg/dosis (350 μ g) de milatuzumab-CL2A-SN-38 proporcionaron alguna mejora en la supervivencia, pero no alcanzó significancia estadística en comparación con los animales tratados con solución salina. (31 frente a 14 días; $P = 0,0760$) o al conjugado de veltuzumab anti-CD20-CL2A-SN39 no de unión (21 días; $P = 0,3128$) (no mostrado). Sin embargo, los conjugados hRS7- y hMN-15-CL2A mejoraron significativamente la supervivencia mediana a 66 y 63 días, respectivamente ($P = 0,0001$). El MFI para TROP-2 y CEACAM6 expresados en superficie fueron 795 y 1123, respectivamente, mucho más altos que CD74 que era solo 5 (ver **Tabla 4**). La inmunohistología mostró una expresión citoplásmica relativamente intensa de CD74 en el xenoinjerto de esta línea celular, pero lo que es más importante, estaba dispersa, apareciendo solo en bolsas definidas dentro del tumor (no mostrado). CEACAM6 y TROP-2 se expresaron de manera más uniforme que CD74 (no mostrado), con CEACAM6 estando presente más intensamente tanto citoplásmicamente como en la membrana, y TROP-2 se encuentra principalmente en la membrana. Por tanto, la supervivencia mejorada con los conjugados anti-CEACAM6 y anti-TROP-2 refleja muy probablemente tanto una mayor densidad de antígeno como una expresión más uniforme en NCI-N87.

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

Otro estudio que usó la línea celular de hepatoma HuH-7 (no mostrado), que tenía una expresión superficial similar, pero niveles citoplásmicos ligeramente más bajos que Hep-G2 (ver **Tabla 4**), descubrió que el conjugado hMN-15-SN-38 proporciona una ventaja supervivencia más larga (35 frente a 18 días), aunque no significativamente diferente, que el conjugado milatuzumab-CL2A ($P = 0,2944$). Aunque los conjugados de tanto hMN-15 como de milatuzumab fueron significativamente mejores que los animales tratados con solución salina ($P = 0,008$ y $0,009$, respectivamente), de nuevo, ninguno de los conjugados fue significativamente diferente del conjugado de veltuzumab-SN-38 no dirigido a este nivel de dosis. ($P = 0,4602$ y $0,9033$, respectivamente). La expresión de superficie de CEACAM6 fue relativamente baja en esta línea celular (MFI = 81), y la inmunohistología mostró que tanto CD74 (no mostrado) como CEACAM6 (no mostrado) eran muy débiles y muy dispersos.

Estos estudios muestran que el uso neoadyuvante de conjugados anticuerpo-fármaco de SN-38 no se limita al anticuerpo anti-TROP2 (hRS7), sino que también puede utilizar anticuerpos contra diferentes objetivos antigénicos, como CD74.

5 Ejemplo 11. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de colon metastásico refractario a terapia (mCRC)

10 La paciente era una mujer de 62 años con mCCR que inicialmente presentó enfermedad metastásica en enero de 2012. Se sometió a colectomía transversa ileal laparoscópica como primera terapia un par de semanas después del diagnóstico, y luego recibió 4 ciclos de quimioterapia FOLFOX (leucovorina, 5-fluorouracilo, oxaliplatino) en un entorno neoadyuvante antes de la hepatectomía derecha en marzo de 2012 para la extirpación de las lesiones metastásicas en el lóbulo derecho del hígado. A esto le siguió un régimen adyuvante de FOLFOX que se reanudó en junio de 2012, para un total de 12 ciclos de FOLFOX. En agosto, se eliminó el oxaliplatino del régimen debido al empeoramiento de la neurotoxicidad. Su último ciclo de 5-FU fue el 25 del 9de 2012.

15 La CT realizada en enero de 2013 mostró metástasis en el hígado. Luego fue evaluada como una buena candidata para la inscripción en el estudio de investigación IMMU-132 (hRS7-CL2A-SN-38). Las comorbilidades en su historial médico incluyen asma, diabetes mellitus, hipertensión, hipercolesteremia, soplo cardíaco, hernia hialal, hipotiroidismo, síndrome del túnel carpiano, glaucoma, depresión, síndrome de piernas inquietas y neuropatía. Su historial quirúrgico incluye tubo-ligadura (1975), tiroidectomía (1983), colecistectomía (2001), liberación del túnel carpiano (2008) y cirugía de glaucoma.

20 En el momento de la entrada en este ensayo, su lesión objetivo era un tumor de 3,1 cm en el lóbulo izquierdo del hígado. Las lesiones no objetivo incluyeron varias masas hipoatenuadas en el hígado. Su CEA basal era de 781 ng/m.

25 Después de que el paciente firmase el consentimiento informado, se administró IMMU-132 en un esquema semanal por infusión durante 2 semanas consecutivas, luego un descanso de una semana, esto constituye un ciclo de tratamiento. Estos ciclos se repitieron según se toleraran. La primera infusión de IMMU-132 (8 mg/kg) se inició el 15 de febrero de 2013 y se completó sin eventos notables. Experimentó náuseas (grado 2) y fatiga (grado 2) durante el transcurso del primer ciclo y ha continuado el tratamiento desde entonces sin efectos adversos importantes. Informó alopecia y estreñimiento en marzo de 2013. La primera evaluación de respuesta realizada (después de 6 dosis) el 8 de abril de 2013 mostró una contracción de la lesión objetivo en un 29% mediante tomografía computarizada (CT). Su nivel de CEA disminuyó a 230 ng/ml el 25 de marzo de 2013. En la segunda evaluación de respuesta (después de 10 dosis) el 23 de mayo de 2013, la lesión objetivo se había contraído un 39%, constituyendo así una respuesta parcial según los criterios RECIST. Ha continuado el tratamiento a partir del 14 de junio de 2013, recibiendo 6 ciclos que constituyen 12 dosis de hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) a 8 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde que comenzó este tratamiento de investigación.

40 Ejemplo 12. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de mama metastásico refractario con terapia

45 La paciente era una mujer de 57 años con cáncer de mama en estadio IV, triple negativo (ER/PR negativo, HER-neu negativo), diagnosticado originalmente en 2005. Se sometió a una lumpectomía de la mama izquierda en 2005, seguida de ACT de dosis alta en un entorno adyuvante en septiembre de 2005. Luego recibió radioterapia, que se completó en noviembre. La recurrencia local de la enfermedad se identificó cuando la paciente palpó un bulto en la mama contralateral (derecha) a principios de 2012 y luego fue tratada con quimioterapia CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo). Su enfermedad reapareció en el mismo año, con lesiones metastásicas en la piel de la pared torácica. Luego recibió un régimen de quimioterapia con carboplatino + TAXOL®, durante el cual resultó trombocitopenia. Su enfermedad progresó y comenzó con doxorubicina semanal, que se continuó durante 6 dosis. La enfermedad de la piel también estaba progresando. Una exploración con FDG-PET realizada el 26 de septiembre de 2012 mostró progresión de la enfermedad en la pared torácica y ganglios axilares sólidos y agrandados. La paciente recibió oxicodona para controlar el dolor.

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

65 La primera infusión de IMMU-132 (12 mg/kg) se inició el 12 de marzo de 2013 y fue bien tolerada. Su

segunda infusión se retrasó debido a la reducción del recuento absoluto de neutrófilos (ANC) de grado 3 (0,9) en el día programado de infusión, una semana después. Después de una semana de retraso y después de recibir NEULASTA®, se le administró su segunda IMMU-132, con una reducción de dosis del 25% a 9 mg/kg. A partir de entonces, ha estado recibiendo IMMU-132 según lo programado según el protocolo, una vez a la semana durante 2 semanas, luego una semana de descanso. Su primera evaluación de respuesta el 17 de mayo de 2013, después de 3 ciclos de terapia, mostró una disminución del 43% en la suma del diámetro largo de las lesiones objetivo, lo que constituye una respuesta parcial según los criterios RECIST. Continúa el tratamiento con una dosis de 9 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde que comenzó el tratamiento con IMMU-132.

Ejemplo 13. Uso neoadyuvante de IMMU-132 para tratar TNBC

El estudio está abierto a mujeres mayores de 18 años con TNBC operable, estadios II y III. Las pacientes elegibles se inscriben y asignan al azar por ordenador a uno de los dos brazos de terapia que son idénticos, excepto por un brazo en el que se añade IMMU-132 a paclitaxel en el primer ciclo de terapia de combinación, como se muestra en el siguiente régimen de tratamiento (**FIG. 11**). Se establecen reglas de reducción de dosis y retraso de dosis para IMMU-132 si la toxicidad excede la predicha en ensayos previos, de tal manera que el paclitaxel se mantenga en la dosis prescrita si es posible. El uso de factores de crecimiento mielóide, como el G-CSF, queda a discreción del médico tratante para este primer ciclo de combinación en el brazo de investigación, pero cuando los pacientes reciben la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida como ciclo final de quimioterapia antes de la cirugía, la administración profiláctica de G-CSF es obligatoria para reducir el riesgo de neutropenia febril.

Criterios de inclusión

1. Consentimiento informado por escrito de mujeres con cáncer de mama invasivo diagnosticado que tengan \geq 18 años.
2. Cáncer de mama invasivo confirmado histológicamente mediante biopsia con aguja gruesa o por incisión (no por escisión). Estadio clínico T2-4 N0-2 o T1 N1-2 mediante examen físico o estudios radiológicos.
3. Prueba de mutación de la línea germinal del gen del cáncer de mama (BRCA) documentado.
4. Cáncer de mama con receptor de estrógeno (ER) negativo, receptor de progesterona negativo y factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativo (triple negativo).
5. Estado funcional ECOG 0-1.
6. Función cardíaca normal confirmada por ECG y ecografía cardíaca (LVEF o fracción de acortamiento) en el plazo de 1 mes desde el registro.
7. Función adecuada de la médula ósea reflejada por los niveles de CBC y Hgb.
8. No en edad fértil O una prueba de embarazo en suero negativa antes de la aleatorización.

Criterios de exclusión

1. Terapia previa contra el cáncer sistémica o locorregional, incluyendo agentes en investigación con intención terapéutica para el cáncer de mama actual.
2. Tratamiento previo con cualquiera de los agentes incluidos en este ensayo.
3. Cáncer de mama metastásico
4. Tratamiento concurrente con una terapia de reemplazo de ovario o con agentes hormonales o cualquier modulador del receptor de estrógeno en el momento de la aleatorización.
5. Historial de convulsiones en los 12 meses anteriores al ingreso al estudio.
6. Neuropatía preexistente por cualquier causa superior al Grado 1.
7. Valores anormalmente bajos preexistentes de leucocitos (neutrófilos), plaquetas, eritrocitos o hemoglobina.
8. Historial en 5 años de un cáncer que no sea cáncer de cuello uterino in situ o carcinoma de células basales de la piel.
9. Condiciones médicas que indiquen intolerancia a la terapia neoadyuvante (enfermedad pulmonar no controlada, diabetes mellitus, infección grave, úlcera péptica activa, trastorno de coagulación, enfermedad del tejido conectivo, enfermedad mielosupresora).
10. Función hepática o renal inadecuada.
11. Contraindicación para el uso de dexametasona o corticosteroides en dosis altas.
12. Historial de insuficiencia cardíaca congestiva u otras afecciones cardíacas graves, incluyendo hipertensión no controlada.
13. Embarazo o lactancia.
14. Tratamiento con cualquier fármaco en investigación en los 30 días anteriores a comenzar el tratamiento de este estudio.

Seguridad y tolerabilidad - La seguridad y la tolerabilidad se evalúan a partir de eventos adversos, laboratorios de seguridad estándar (CBC, recuentos diferenciales y de plaquetas, química sérica y análisis de orina), examen físico, signos vitales y EKG. Se realiza una monitorización cardíaca adicional según se requiera para el tratamiento estándar para la terapia con doxorubicina. Los eventos adversos se clasifican por el sistema MedDRA, y

5 todos los eventos adversos y laboratorios anormales se clasifican según su gravedad usando los grados de toxicidad NCI CTCAEv4.0. La farmacocinética (PK) para IMMU-132 y también para paclitaxel en el grupo de investigación se evaluaron en un grupo representativo de pacientes. Los resultados se caracterizan por parámetros PK estándar, que incluyendo valores máximos y mínimos, área bajo la curva (AUC), Cmax y T1/2. La inmunogenicidad de IMMU-132 se evalúa por prueba ELISA midiendo los títulos anti-RS7 y anti-SN-38 en la sangre de los pacientes.

10 Plan estadístico y análisis de datos - Nuestro objetivo es lograr un aumento en la tasa de pCR con la adición de IMMU-132 de por lo menos 20 puntos porcentuales (aumento del 57%) para que sea clínicamente significativo. Para los cálculos de potencia, asumimos una tasa de pCR del 35% en el brazo de control sin IMMU-132 y del 55% en el brazo con IMMU-132. Con una aleatorización 1:1 y estadísticas estándar que comparan proporciones, un mínimo de 94 pacientes en cada brazo proporcionará una potencia del 80% para detectar con un 95% de confianza si esta ventaja existe entre los dos brazos. Por tanto, el tamaño de muestra mínimo requerido para este criterio de valoración sería de aproximadamente 200 pacientes.

15 Además, se realiza un seguimiento de los pacientes para determinar la recurrencia y la supervivencia durante un período de hasta 5 años. Se acepta que una mejora del 10% en la supervivencia libre de eventos (EFC o la supervivencia general (OS) con la adición de IMMU-132 proporciona un beneficio clínicamente significativo. Varios estudios de TNBC muestran tasas de EFS a 3 años con quimioterapia neoadyuvante estándar del 60-80%. Para los cálculos, asumimos el 70% en el brazo de control, ya que esto se determina a partir del gran metanálisis de 1157
20 pacientes con TNBC (43) y, por lo tanto, el 80% en el brazo con IMMU-132. Suponiendo que la EFC es aproximadamente una función en declive exponencial, la mediana de EFS es de 5,8 años en el brazo de control y de 9,4 años en el brazo con IMMU-132, con una razón de riesgo (HR) de 0,62 entre los brazos de tratamiento. Suponiendo que la acumulación no haya transcurrido antes de los 3 años con análisis no antes de los 4 años de seguimiento, aproximadamente 200 pacientes en cada brazo proporcionarán un 85% de potencia para detectar con un 95% de confianza si existe esta diferencia de EFC entre los dos brazos. Por tanto, usando EFS para demostrar un beneficio clínicamente significativo, el tamaño de muestra requerido para este criterio de valoración es de aproximadamente 400 pacientes, pero con un exceso del 10% para proporcionar abandonos, estimamos que se inscriben 440 pacientes para este ensayo.

30 La mayoría de los estudios de terapia neoadyuvante en TNBC consideran criterios de valoración de recurrencia, no supervivencia. Si bien este estudio no se ha desarrollado para la OS, un estudio del MD Anderson (Liedtke et al., J Clin Oncol. 10 de marzo de 2008; 26(8) 1275-1281) informó que las tasas de OS a los 5 años estaban cerca de su tasas de PFS a los 3 años. Esto sugiere que habrían ocurrido eventos suficientes después de aproximadamente 2 años adicionales de seguimiento para tener una potencia similar para demostrar la misma
35 medida de mejora del 10% en puntos de beneficio clínicamente significativo en base a OS.

Ejemplo 14. Uso de hRS7-SN-38 (IMMU-132) para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas, metastásico, refractario

40 A un hombre de 60 años de edad se le diagnostica cáncer de pulmón de células no pequeñas. Luego el paciente presenta una masa mediastínica izquierda de 6,5 x 4 cm y derrame pleural. Después de firmar el consentimiento informado, al paciente se le administra IMMU-132 a una dosis de 18 mg/kg cada dos semanas. Durante las dos primeras inyecciones, se experimentan breves períodos de neutropenia y diarrea, con 4
45 evacuaciones intestinales en 4 horas, pero estas se resuelven o responden a los medicamentos sintomáticos en 2 días. Después de un total de 6 infusiones de IMMU-132, la evaluación por CT de la lesión índice muestra una reducción del 22%, justo por debajo de una respuesta parcial pero una contracción tumoral definida. El paciente continúa con esta terapia durante otros dos meses, cuando se observa por CT una respuesta parcial del 45% de contracción tumoral de la suma de los diámetros de la lesión índice, constituyendo por tanto una respuesta parcial según los criterios RECIST.

50 Luego, al paciente se le administran regímenes de quimioterapia de carboplatino, bevacizumab durante 6 meses y muestra una respuesta, y luego, después de progresar, recibe más ciclos de quimioterapia con carboplatino, etopósido, TAXOTERE® y gemcitabina. El tumor mediastínico se elimina con el uso neoadyuvante de ADC combinado con quimioterapia.

Ejemplo 15. Tratamiento del cáncer de páncreas metastásico con inmunoc conjugado anti-MUC5ac-CL2A-SN-38

60 Este paciente de 44 años tiene historial de carcinoma de páncreas metastásico, con adenocarcinoma ductal de páncreas en la cabeza del páncreas, y presenta metástasis a los lóbulos izquierdo y derecho del hígado, el primero de 3 x 4 cm y el segundo de 2 x 3 cm. Al paciente se le administra un ciclo de gemcitabina pero no muestra una respuesta objetiva. Cuatro semanas más tarde, se le administra hPAM4-CL2A-SN-38 i.v. a una dosis de 8 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas, con una semana de descanso, y luego se repite durante otros 2 ciclos. Se realizan estudios de CT una semana después y la eliminación de las metástasis y una reducción de la masa del
65 tumor primario del 32% (respuesta parcial), junto con una caída en su título de CA19-9 en sangre de 220 al valor de

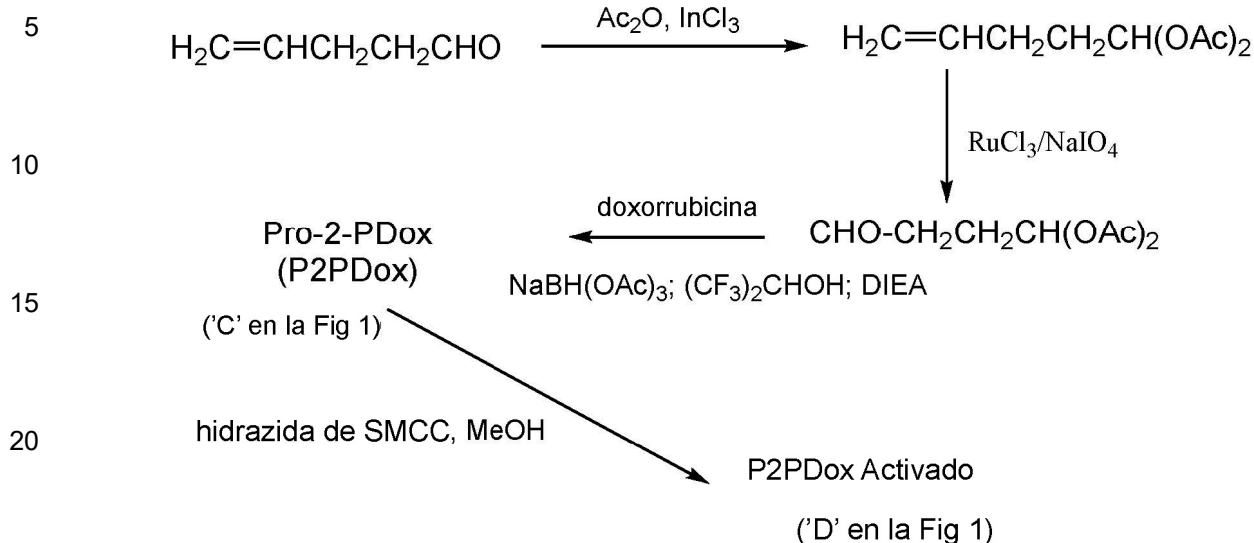
referencia del estudio a 75 en el momento de la evaluación radiológica. El paciente muestra solo náuseas y vómitos de grado 1 después de cada tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco, y una neutropenia de grado 2 al final del último ciclo de tratamiento, que se resuelve 4 semanas después. La eliminación de las lesiones metastásicas y la reducción del tamaño del tumor primario permite la extirpación quirúrgica de la masa tumoral anteriormente inoperable. Seis meses después del tratamiento quirúrgico, el paciente no presenta signos de recurrencia del carcinoma de páncreas.

Ejemplo 16. Producción y uso de pro-2-pirrolinodoxorubicina (P2PDox) (no reivindicado)

Síntesis - En la presente se divulgan estructuras de productos intermedios en la vía sintética de P2PDox, así como un derivado maleimida de P2PDox adecuado para la conjugación con anticuerpos u otras proteínas o péptidos que contienen sulfhidrilo. En el Esquema 1 siguiente se muestra un esquema general para producir un P2PDox ejemplar. Hemos realizado reacciones a escala de 1 g para generar >1 g de 4,4-diacetoxibutiraldehído con un rendimiento del ~40%. Para evitar el uso de cianoborohidruro de sodio que potencialmente puede contaminar los productos con cianuro, el agente reductor se cambió a triacetoxiborohidruro de sodio en alquilación reductora. En una escala exploratoria, se registró una conversión de >80% de doxorubicina en P2PDox. Esto se aumentó a una escala de 2 g para generar >1 g de P2PDox. (Esquema 1). El 4,4-diacetoxibutiraldehído se preparó mediante una modificación del método informado (Nagy et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:1794-9), que fue necesaria para evitar un paso de ozonólisis peligroso. La diacetoxilación de 4-penten-1al disponible comercialmente con catálisis de anhídrido acético y cloruro de indio, seguido por la excisión oxidativa de olefina por combinación de cloruro de rutenio y peryodato de sodio (Yang & Zhang, 2001, 66:4814-8) proporcionó el 4,4-diacetoxibutiraldehído, que se acopló de manera reductora a doxorubicina para obtener P2PDox.

Estuvieron implicados los siguientes pasos: (i) A una mezcla de anhídrido acético (7,45 ml) y cloruro de indio (0,56 g) en diclorometano (20 ml) se le añadieron 5,05 g de 4-penten-1-al. Después de 10 a 30 min, la mezcla de la reacción se trató con acetato de sodio acuoso al 25% (20 ml) y la capa orgánica se lavó con salmuera y se secó. La eliminación del solvente dio 15,3 g del producto líquido, que se llevó al siguiente paso; (ii) Se añadió una solución madre de cloruro de rutenio 3,5 mM en agua (69,4 ml) a la solución del producto del paso (i) en diclorometano en acetonitrilo-agua 6:1 (350 ml). Se añadió peryodato de sodio (29,7 g) en porciones. Una vez completada la reacción, según se juzgó por análisis de TLC, la mezcla de la reacción se trató con 30 ml de tiosulfato de sodio saturado, se filtró a través de una almohadilla de celite y se evaporó el acetonitrilo. La capa acuosa restante se extrajo con acetato de etilo, se lavó con acetato de sodio al 25%, agua y salmuera y se secó. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando una mezcla de acetato de etilo-hexano para elución. El producto puro se usó para la alquilación reductora de doxorubicina en el siguiente paso; (iii) Se disolvieron 1,5 gramos de clorhidrato de doxorubicina en 1,1,1,3,3,3,-hexafluoroisopropanol (195 ml) y diisopropiletilamina (2,7 ml), y se hicieron reaccionar con 3,4 g (exceso molar de 7 veces) del aldehído del paso (ii) y 0,66 g de triacetoxiborohidruro de sodio. La reacción se completó en 10 min y el producto se purificó sobre gel de sílice usando mezclas de cloruro de metileno-isopropanol para elución, dando como resultado 0,96 g de producto puro. El espectro de masas por electropulverización mostró la masa a m/z 716.2570 (M+H) consistente con la estructura del producto. La estructura también fue confirmada por espectros de NMR de protones y C-13. (iv) el P2PDox del paso iii se convirtió en hidrazona de MCC usando hidrazida de SMCC de la siguiente manera: A 0,6 g de P2PDox disuelto en 75 ml de metanol anhidro y tratado con 0,34 g de hidrazida de SMCC, calculado como un exceso de 1,8 veces en base a la cuantificación espectrofotométrica de la cantidad de P2PDox usada. Se consideró que el porcentaje de conversión era del 88% por HPLC. El análisis de LC-MS mostró el máximo del producto a m/z de 949.3734 (M+H), consistente con la masa calculada (m/z) de 949.3713 (M+H). El material, después de la eliminación del solvente, se usó como tal para la conjugación, ya que el material de partida no derivatizado no se conjugó y se eliminó durante el proceso de purificación del conjugado.

Esquema 1



25 Preparación del conjugado a pequeña escala - La preparación del conjugado siguió una metodología general de reducción suave de disulfuros intercatenarios de IgG con TCEP en PBS, seguido de acoplamiento a un exceso de 10 veces de P2PDox activado. Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) centrifugada en SEPHADEX® equilibrado en ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 25 mM, pH 6,8, seguido de pase sobre una columna hidrófoba. Los productos se formularon con trehalosa y polisorbato 80 y se liofilizaron. El producto conjugado, con una sustitución en el intervalo de 4-7 fármaco/IgG, eluyó como un pico individual mediante HPLC de exclusión por tamaño y contenía típicamente <1% de fármaco libre no conjugado mediante HPLC de fase inversa.

35 Preparación del conjugado a escala aumentada - Se preparó un conjugado de anticuerpo anti-TROP-2 humanizado, hRS7, en una escala de 5 g y 10 g, mediante reducción de TCEP de un anticuerpo, seguido de conjugación in situ usando un exceso de 12 veces de P2PDox activado, con DMSO como cosolvente (5% v/v). El producto se purificó mediante filtración de flujo tangencial usando tampón MOPS 25 mM, pH 6,8, con 20 volúmenes de diafiltración para la purificación. El producto se formuló con trehalosa 25 mM y TWEEN® 80 al 0,01%, se dividió en alícuotas en lotes de 20 mg o 100 mg y se liofilizó.

40 Conjugados representativos

45

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

55 También se han preparado conjugados para hPAM4-P2PDox, hLL2-P2PDox y RFB4-P2PDox, con una recuperación y pureza de proteínas similares (no se muestra).

Ejemplo 17; Estudios preclínicos in vitro con P2PDox (no reivindicado)

60 Estudios de unión celular in vitro - La retención de la unión del anticuerpo se confirmó mediante ensayos de unión celular que compararon la unión del anticuerpo conjugado con el no conjugado (Chari, 2008, Acc Chem Res 41: 98-107). La potencia del conjugado se probó en un ensayo MTS de 4 días usando células objetivo apropiadas. El conjugado hRS7-P2PDox mostró valores de IC₅₀ de 0,35 a 1,09 nM en líneas celulares de cáncer gástrico (NCI-N87), pancreático (Capan-1), y de mama (MDA-MB-468) humanos, con el fármaco libre mostrando 0,02-0,07 nM de potencia en las mismas líneas celulares.

65

Estabilidad en suero - La estabilidad en suero del conjugado prototípico P2PDox, hRS7-P2PDox, se determinó incubando en suero humano a una concentración de 0,2 mg/ml a 37° C. La incubación se analizó mediante HPLC usando una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de butilo en la que había buena separación del tiempo de retención entre el máximo debido al fármaco libre y el debido a especies conjugadas o de peso molecular más alto. Este análisis mostró que no hubo liberación de fármaco libre del conjugado, lo que sugiere una alta estabilidad en suero del conjugado. Cuando se repitió el mismo experimento con conjugado de hRS7-doxorrubicina, que contenía el mismo conector escindible que hRS7-P2PDox, y donde se verificó independientemente que el fármaco libre se liberaba con una vida media de 96 h, se observó una formación clara del máximo del fármaco libre, concretamente máximo de doxorubicina, en HIC HPLC.

Sorprendentemente, se determinó que el conjugado P2PDox se mantenía firmemente unido al anticuerpo porque reticulaba juntas las cadenas peptídicas del anticuerpo. La reticulación estabiliza la unión del fármaco al anticuerpo de tal manera que el fármaco solo se libera intracelularmente después de que se ha metabolizado el anticuerpo. La reticulación ayuda a minimizar la toxicidad, por ejemplo la cardiotoxicidad, que resultaría de la liberación del fármaco libre en circulación. El uso anterior de conjugados de péptidos 2-PDox fracasó porque el fármaco reticuló el péptido con otras proteínas o péptidos in vivo. Con los presentes conjugados, el P2PDox se une a grupos disulfuro tiol entre cadenas mientras está en forma de profármaco. La protección del profármaco se elimina rápidamente in vivo poco después de la inyección y la porción de 2-PDox resultante del conjugado reticula las cadenas peptídicas del anticuerpo, formando reticulación intramolecular dentro de la molécula de anticuerpo. Esto tanto estabiliza el ADC como evita la reticulación con otras moléculas en circulación.

Ejemplo 18: Estudios preclínicos in vivo con P2PDox (no reivindicado)

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

Una única dosis intravenosa de $\geq 300 \text{ µg}$ [$\sim 10 \text{ µg}$ de P2PDox] del conjugado fue letal, pero todos los animales toleraron 4 dosis de 45 µg administradas en 2 semanas. Usado este régimen de dosificación, examinamos el efecto terapéutico de hRS7-P2PDox en 2 modelos de xenoinjerto tumoral humano, Capan-1 (cáncer de páncreas) y NCI-N87 (cáncer gástrico). La terapia comenzó 7 días después del trasplante de tumor en ratones desnudos. En el modelo Capan-1 establecido de 7 días de edad, el 100% de los tumores establecidos reversionaron rápidamente, sin evidencia de recrecimiento (**FIG. 12**). Este resultado se reprodujo en un experimento repetido (no mostrado). Se realizaron descubrimientos similares en el modelo NCI-N87 establecido (no mostrado), donde un 2º ciclo de terapia, administrada después del día 70, se toleró de manera segura y llevó a regresiones adicionales del tumor residual (no mostrado). El conjugado hRS7-SN-38 de internalización, dirigido a Trop-2, proporcionó mejores respuestas terapéuticas que un conjugado de un anticuerpo anti-CEACAM5 pobremente internalizado, hMN-14 (**FIG. 2**). Un ADC anti-CD20 no dirigido, hA20-P2PDox, fue ineficaz, lo que indica una eficacia terapéutica selectiva (**FIG. 2**). Los datos de un xenoinjerto de cáncer de mama (MDA-MB-468) y un segundo xenoinjerto de cáncer de páncreas (no mostrado) reiteran la misma tendencia de los efectos antitumorales significativos y específicos del conjugado.

PK y toxicidad de hRS7-P2PDox con sustituciones de 6,8 o 3,7 Fármaco/IgG - Se sabe que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que llevan hasta 8 fármacos/MAb ultratoxicos se depuran más rápido que el MAb no modificado y aumentan la toxicidad fuera del objetivo, un descubrimiento que ha llevado a las tendencias actuales a usar sustituciones de fármacos de ≤ 4 (Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res 10:7063-70). Los conjugados se prepararon y evaluaron con proporciones medias de sustitución de fármaco/MAB (MSR) de $\sim 6:1$ y $\sim 3:1$. Se administraron a grupos de ratones normales ($n = 5$), dosis únicas i.v. de hRS7 o hRS7-P2PDox sin modificar con sustitución de fármaco de 6,8 o 3,7 (misma dosis de proteína), y se recogieron muestras de suero a los 30 min, 4 h, 24 h, 72 h y 168 h después de la inyección. Estos se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de anticuerpos. No hubo diferencias significativas en las concentraciones en suero en varios momentos, lo que indica que estos se depuraron de manera similar. Los parámetros PK (C_{max} , AUC, etc.) fueron similares. Los conjugados con una sustitución de fármaco o más alta o más baja tuvieron una tolerabilidad similar en ratones desnudos, cuando se administraron a la misma dosis de fármaco conjugado.

Eficacia terapéutica a la dosis mínima eficaz (MED) - Se evaluó el conjugado de anticuerpo anti-TROP-2, hRS7-P2PDox, en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 mediante la administración de una dosis única de proteína en bolo de 9 mg/kg, 6,75 mg/kg, 4,5 mg/kg, 2,25 mg/kg o 1 mg/kg. La terapia se inició cuando el volumen tumoral medio (mTV) fue de 0,256 cm³. El día 21, la mTV en el grupo de control de solución salina (grupo sin tratamiento) fue de 0,801 ± 0,181 cm³ que fue significativamente mayor que la de los ratones tratados con dosis de 9, 6,75, 4,5 o 2,25 mg/kg con mTV de 0,211 ± 0,042 cm³, 0,239 ± 0,054 cm³, 0,264 ± 0,087 cm³ y 0,567 ± 0,179 cm³, respectivamente (P<0,0047, prueba t de una cola). A partir de estos, se consideró que la dosis mínima eficaz era de 2,25 mg/kg, mientras que 9 mg/kg representaba la MTD.

10 **Ejemplo 19. MTD del anticuerpo-P2PDox** (no reivindicado)

Un estudio MTD que comparó los conjugados 2-PDox y P2PDox del anticuerpo prototipo, hLL1, en ratones demostró que el conjugado P2PDox era mucho más potente (no mostrado). La MTD de una única inyección i.v. fue de entre 100 y 300 µg. Luego se determinó la MTD de múltiples inyecciones, en un programa de cada cuatro días para un total de cuatro inyecciones (q4d x 4), usando dosis de proteínas entre 25 µg y 150 µg por inyección. A estas dosis, se administró a los animales una dosis acumulativa de entre 100 y 600 µg. La **Tabla 5** siguiente resume los varios grupos.

Tabla 5. Dosificación y programa para MTD de anticuerpo-P2PDox

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

Los gráficos que muestran la pérdida de peso se muestran en la **FIG. 13A-D**. Solo los ratones tratados con 25 µg de P2PDox-ADC continúan sin mostrar signos de toxicidad. Esta es una dosis acumulativa de 100 µg que también fue la dosis tolerada cuando se administró como una sola inyección (no mostrado). Por lo tanto, la MTD para múltiples inyecciones de P2PDox-ADC en ratones es de 25 µg q4dx4 de este experimento. Un análisis cuidadoso de los datos y la repetición del experimento establecieron que la MTD para la dosificación fraccionada era de 45 µg de dosis de proteína del conjugado, administrada cada 4 días durante 2 semanas (programa de 45 µg, q4dx4).

15 **Ejemplo 20. Estudios adicionales con conjugados P2PDox** (no reivindicado)

No se observó ninguna diferencia significativa en la unión de la fracción del anticuerpo a las células de carcinoma gástrico NCI-N87 entre hRS7 no conjugado y P2PDox-hRS7 conjugado con 6 moléculas de P2PDox por anticuerpo (no mostrado). La falta de efecto de la conjugación sobre la unión del anticuerpo al antígeno objetivo se confirmó para los conjugados P2PDox-hMN-15 (anti-CEACAM6), P2PDox-hLL2 (anti-CD22) y P2PDox-hMN-24 (anti-CEACAM5). Se concluye que la conjugación de P2PDox con anticuerpos no afecta a la actividad de unión anticuerpo-antígeno.

Se examinó la citotoxicidad de los conjugados P2PDox-mAb para las células objetivo. hRS7-P2PDox y hMN-15-P2PDox fueron citotóxicos para las líneas de células tumorales sólidas MDA-MB-468, AG S, NCI-N87 y Capan-1 (no mostrado). hMN-14-P2PDox fue citotóxico para líneas tumorales pancreáticas humanas Capan-1, BxPC-3 y AsPC-1 y líneas tumorales gástricas AGS, NCI-N87 y LS147T y colónicas humanas (no mostradas). hLL2-P2PDox fue citotóxico para las líneas tumorales hematopoyéticas Daudi, Raji, Ramos y JVM-3 (no mostradas). Los valores de IC₅₀ para los conjugados estaban en el intervalo de concentración nanomolar (no mostrado).

Se realizaron estudios adicionales de eficacia in vivo en ratones desnudos implantados con xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 (**FIG. 14A-F**). Un ciclo de tratamiento con 4 x 45 µg de hRS7-P2PDox hizo que todos los tumores reverteran rápidamente (**FIG. 14D**). Se inició un segundo ciclo de tratamiento aproximadamente 2 meses después del final del primer ciclo, lo que dio como resultado una regresión completa de todos los animales tratados con hRS7-P2PDox excepto uno. Los conjugados hA20, hLL1 y hMN-14 tuvieron poco efecto sobre la progresión tumoral (**FIGS. 14A, 14B, 14E y 14F**). La administración de P2PDox-hMN-15 dio como resultado una regresión retardada del cáncer gástrico, que fue menos eficaz que el conjugado de hRS7.

Se examinó el efecto del programa de dosificación variable sobre la eficacia antitumoral (**FIG. 15**). El experimento comenzó 9 días después de la implantación del tumor cuando el volumen tumoral medio para todos los grupos fue de 0,383 cm³ y finalizó el día 93 (84 días después del inicio de la terapia). En este estudio, una sola dosis de 180 µg, dos dosis semanales de 90 µg y q4dx4 de 45 µg dieron como resultado una supervivencia significativamente mejorada (**FIG. 15**). Para el control de solución salina, sobrevivieron 0 de 9 ratones (no mostrado). Para los ratones que recibieron 45 µg de q4dx4 de hRS7-P2PDox, 8 de 9 ratones estaban vivos el día 94 (no

mostrado). Para los ratones que recibieron 90 µg semanales x 2 de hRS7-P2PDox, 9 de los 9 ratones estaban vivos el día 94 (no mostrado). Para los ratones que recibieron una única dosis de 180 µg de hRS7-P2PDox, 78 de 9 ratones estaban vivos el día 94 (no mostrado).

5 Con el mismo programa de dosificación, el conjugado de hA20 de control no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia (**FIG. 15**). Un estudio de toxicidad mostró que los tres programas de dosificación de hRS7-P2PDox dieron como resultado niveles de toxicidad igualmente bajos (no mostrado).

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

20 hRS7-P2PDox fue sustancialmente más eficaz que hRS7-SN-38 para inhibir el crecimiento del cáncer de páncreas P_xPC-3 (no mostrado) y fue ligeramente más eficaz que hRS7-SN-38 para inhibir el crecimiento del cáncer de mama MDA-MB-468 (no mostrado).

25 En la FIG. 16 se muestra el efecto de diferentes dosis individuales de hRS7-P2PDox sobre el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma gástrico NCI-N87. Usando una única dosis, el efecto máximo sobre el crecimiento tumoral se observó a 90 µg o más (**FIG. 16**). Una dosis única de 45 µg fue el mínimo requerido para ver un beneficio de supervivencia significativo en comparación con el control de solución salina (**FIG. 17**).

30 La actividad ADCC de varios conjugados hRS7-ADC se determinó en comparación con hRS7 IgG (**FIG. 18**). Las PBMC se purificaron a partir de sangre adquirida del Blood Center de Nueva Jersey. Se usó una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano positiva para Trop-2 (B_xPC-3) como línea celular objetivo con una proporción de efector a objetivo de 100: 1. La ADCC mediada por hRS7 IgG se comparó con hRS7-Pro-2-PDox, hRS7-CL2A-SN-38 y hRS7-NEM reducido y protegido. Todos se usaron a 33,3 nM.

35 Los resultados se muestran en la **FIG. 18**. La actividad general fue baja, pero significativa. Hubo un 8,5% de lisis específica para hRS7 IgG que no fue significativamente diferente de hRS7-Pro-2-PDox. Ambos fueron significativamente mejores que el control de hLL2 y hRS7-NEM y hRS7-SN-38 (P<0,02, prueba t de dos colas). No hubo diferencias entre hRS7-NEM y hRS7-SN-38.

40 **Ejemplo 21. Tratamiento del cáncer de mama triple negativo con P2PDox-hRS7 ADC (no reivindicado)**

El ADC de P2PDox-hRS7 se prepara como se describe en los Ejemplos anteriores. Los pacientes con cáncer de mama triple negativo que no han respondido por lo menos en dos terapias estándar reciben 3 ciclos de 70 mg de P2PDox-hRS7 inyectados i.v. cada 3 semanas. Se observan respuestas objetivas a este nivel de dosis de P2PDox-hRS7, con una disminución media del volumen tumoral del 35%, después de dos ciclos de terapia. Todas las muestras de suero evaluadas para el anticuerpo anti-hRS7 humano (HAHA) son negativas. La reducción de la masa tumoral va seguida de la extirpación quirúrgica del tumor.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> USO NEOADYUVANTE DE CONSJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

55 <130> IMM350WO1

<140>

<141>

60 <150> 62/060,858

<151> 2014-10-07

<160> 74

65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 892 525 T3

<210> 1
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

60

65

ES 2 892 525 T3

	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	145					150					155					160
5	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165					170					175	
10	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
15	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
20	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
25	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
	225					230					235					240
30	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
35	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
40	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
45	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290					295					300				
50	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	305					310					315					320
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325						330						
55	<210> 2															
	<211> 330															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
60	<220>															
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético															
65	<400> 2															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1			5						10					15	

ES 2 892 525 T3

	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
5	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
10	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
15	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70				75						80
20	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
25	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
30	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
35	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
40	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	145					150					155					160
45	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
50	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
55	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
60	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
65	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235					240
70	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
75	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260						265					270		

ES 2 892 525 T3

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

5 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

10 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

15 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 3

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
 1 5 10

30 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <400> 4

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

45 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <400> 5

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5

60 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

70 <400> 6

ES 2 892 525 T3

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

5 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 7

15 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

20 <210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 8

30 Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35 <210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 9

45 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
1 5 10

50 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 10

60 Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
1 5

65 <210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 892 525 T3

<400> 11

Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
1 5

5 <210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 12

Thr Tyr Trp Met Ser
1 5

15 <210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 13

Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

30 **Asp**

35 <210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 14

Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

45 <210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 15

55 **Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu**
1 5 10 15

60 <210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 16

5 **Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser**
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 17

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1 5

20 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 18

30 **Asn Tyr Gly Met Asn**
 1 5

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <400> 19

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

45

Gly

50 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 20

60 **Lys Gly Trp Met Asp Phe Asn Ser Ser Leu Asp Tyr**
 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 892 525 T3

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 21

Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10

10 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 22

20 Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 23

Gln Gln Trp Ser Tyr Asn Pro Pro Thr
 1 5

35 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 24

45 Asp Tyr Tyr Met Ser
 1 5

50 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 25

Phe Ile Ala Asn Lys Ala Asn Gly His Thr Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
 1 5 10 15

60 Val Lys Gly

65 <210> 26

ES 2 892 525 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 26

10

Asp	Met	Gly	Ile	Arg	Trp	Asn	Phe	Asp	Val
1				5					10

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 27

20

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Arg	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

30

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

35

Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29

45

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29

50

Ser	Gln	Ser	Ser	His	Val	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 30

60

Asn	Tyr	Gly	Val	Asn
1				5

<210> 31
 <211> 17

65

ES 2 892 525 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 31

10 **Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys**
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 32

25 **Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr**
 1 5 10

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 33

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ala Asn His Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10 15

40 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 34

50 **Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser**
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

60 <400> 35

His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe
 1 5

65

ES 2 892 525 T3

5
 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10
 <400> 36

Ser Tyr Trp Leu His
 1 5

15
 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 37

25
 Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

30
 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 38

40
 Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr
 1 5

45
 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 39

55
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

60
 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 40

ES 2 892 525 T3

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

5 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 41

15 Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 42

Glu Tyr Val Ile Thr
1 5

30 <210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 43

40 Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

45 <210> 44
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 44

Glu Asp Leu
1

55 <210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

65 <400> 45

ES 2 892 525 T3

		Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Tyr
		1				5					10		

5 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 46

			Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
			1			5			

15 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 47

			His	Gln	Trp	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Thr
			1			5					

25 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 48

			Ser	Tyr	Val	Leu	His
			1			5	

35 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 49

		Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Gln	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
		1			5						10				15		

45 **Gly**

50 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 892 525 T3

<400> 50

5 Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 51

Ser Tyr Val Ile His
1 5

20 <210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 52

30 Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

35 Gly

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <400> 53

Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr
1 5

50 <210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 54

60 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 892 525 T3

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 55

Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro
 1 5

10 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 56

20 Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <400> 57

Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

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

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 58

45 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

50 Gly

<210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

60 <400> 59

Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

65 <210> 60

ES 2 892 525 T3

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 60

10 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 61

25 Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 62

35 Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp Ala
1 5

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 63

50 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

60 <400> 64

65 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 65

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 65

10 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 66

25 Ser Tyr Asn Met His
 1 5

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 67

35 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

40 Gly

<210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <400> 68

55 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 69

65 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

ES 2 892 525 T3

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

5

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para su uso en un método para el tratamiento neoadyuvante del cáncer que comprende:

a) administrar el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una fracción de anticuerpo conjugada con un fármaco, a un sujeto con cáncer, en donde la fracción de anticuerpo es un anticuerpo anti-Trop2 hRS7 y el fármaco es SN-38; y

b) tratar al sujeto con una terapia estándar anticáncer seleccionada del grupo que consiste de cirugía, y radioterapia, y

en donde el ADC se administra antes de la terapia anticáncer estándar.

2. Una terapia estándar anticáncer para su uso en un método para el tratamiento neoadyuvante del cáncer que comprende:

a) administrar el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una fracción de anticuerpo conjugada con un fármaco, a un sujeto con cáncer, en donde la fracción de anticuerpo es un anticuerpo anti-Trop2 hRS7 y el fármaco es SN-38; y

b) tratar al sujeto con la terapia estándar anticáncer, en donde la terapia estándar anticáncer se selecciona del grupo que consiste de cirugía, y radioterapia, y

en donde el ADC se administra antes de la terapia anticáncer estándar.

3. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde la fracción de anticuerpo comprende regiones constantes humanas seleccionadas del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

4. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde la fracción de anticuerpo tiene un alotipo seleccionado del grupo que consiste de no-G1m1 (nGm1), G1m3 y Km3.

5. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde el ADC comprende un conector que une el fármaco con la fracción de anticuerpo.

6. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 5 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 5, en donde el fármaco es SN-38 y el conector es CL2A.

7. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, que comprende además administrar por lo menos un agente terapéutico a dicho sujeto.

8. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 7 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 7, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de una toxina, una enzima, una hormona, un segundo anticuerpo, un segundo fragmento de anticuerpo, un inmunoconjugado, un radionúclido, un oligonucleótido antisentido, y un ARNi.

9. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 8 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 8, en donde el radionúclido se une a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno y se selecciona del grupo que consiste de ^{111}In , ^{111}At , ^{177}Lu , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{152}Dy , ^{166}Dy , ^{161}Ho , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{211}Pb , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{58}Co , $^{80\text{m}}\text{Br}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, ^{109}Pt , ^{119}Sb , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{221}Fr , ^{255}Fm , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{224}Ac , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{227}Th , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{76}Br y ^{169}Yb .

10. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de tiroides medular, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de recto, y melanoma.

11. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de colon metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) metastásico,

cáncer de páncreas metastásico, carcinoma de células renales metastásico, cáncer gástrico metastásico, cáncer de próstata metastásico, y cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico.

- 5 12. El conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) para el uso de la reivindicación 1 y la terapia estándar anticáncer para el uso de la reivindicación 2, en donde el cáncer es refractario a otras terapias pero responde a terapia con ADC neoadyuvante.

10

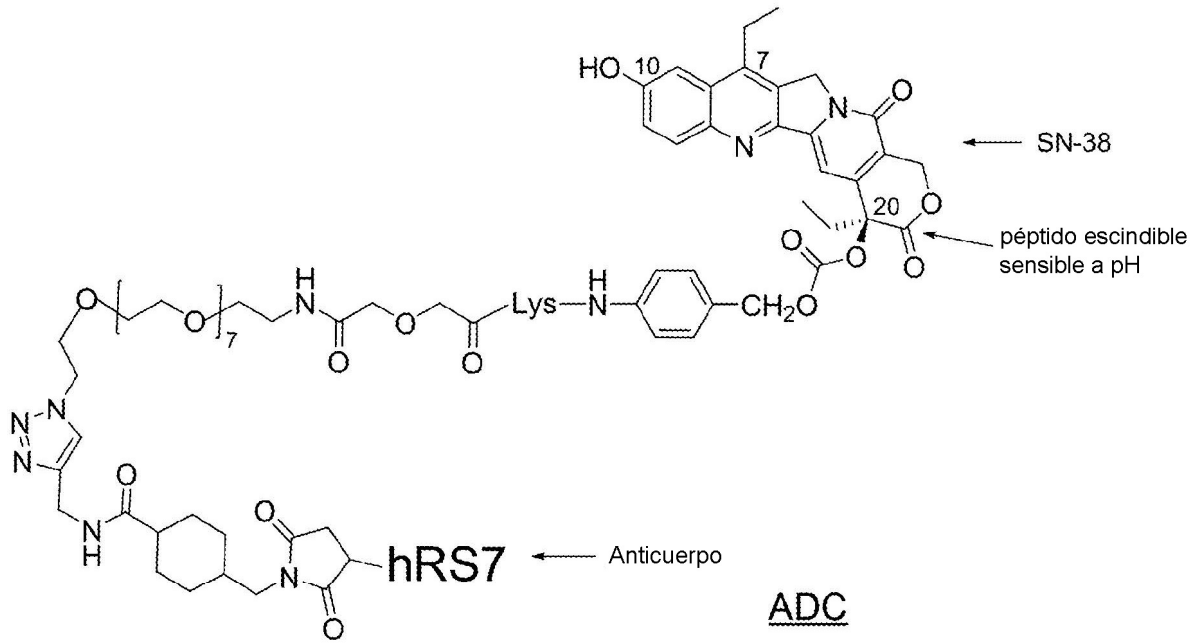
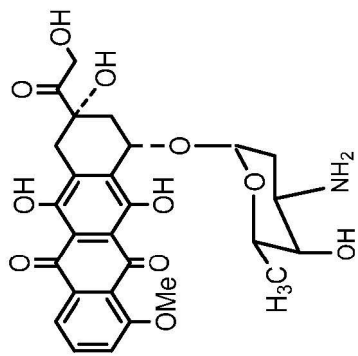
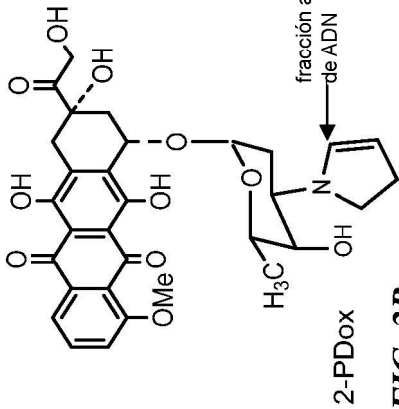


FIG. 1



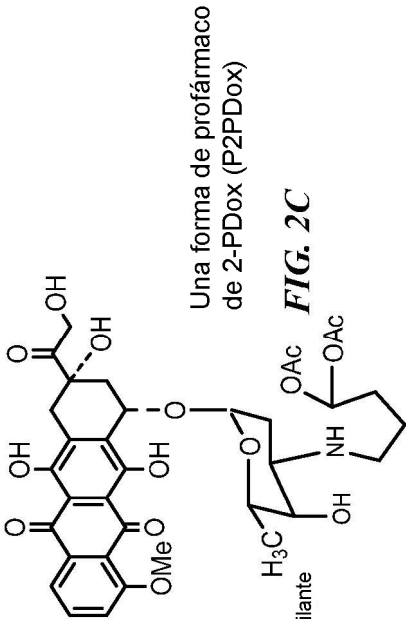
Doxorrubicina

FIG. 2A



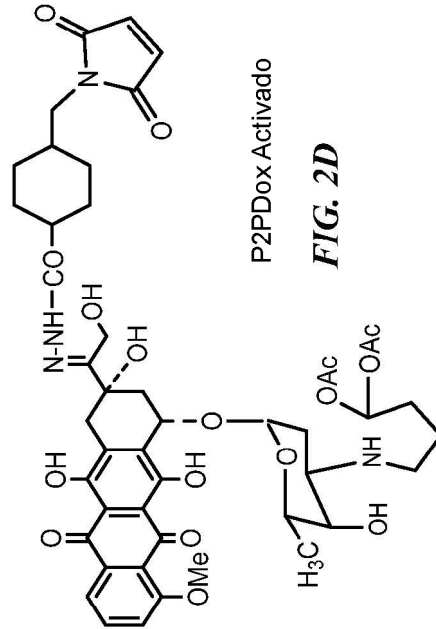
2-PDox

FIG. 2B



Una forma de profármaco de 2-PDox (P2PDox)

FIG. 2C



P2PDox Activado

FIG. 2D

FIG. 3A

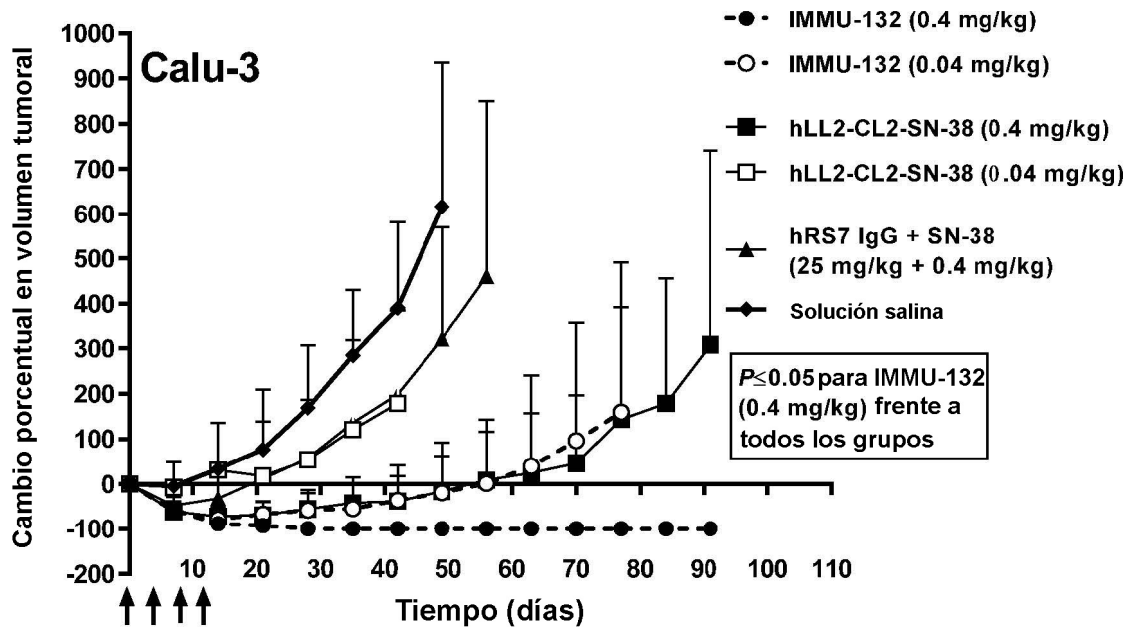


FIG. 3B

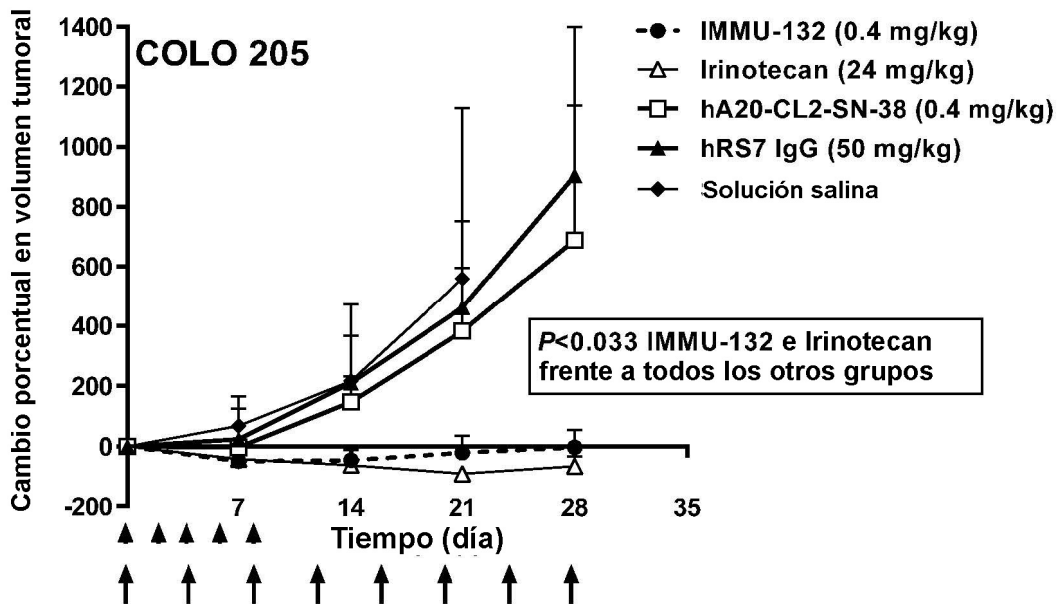


FIG. 3C

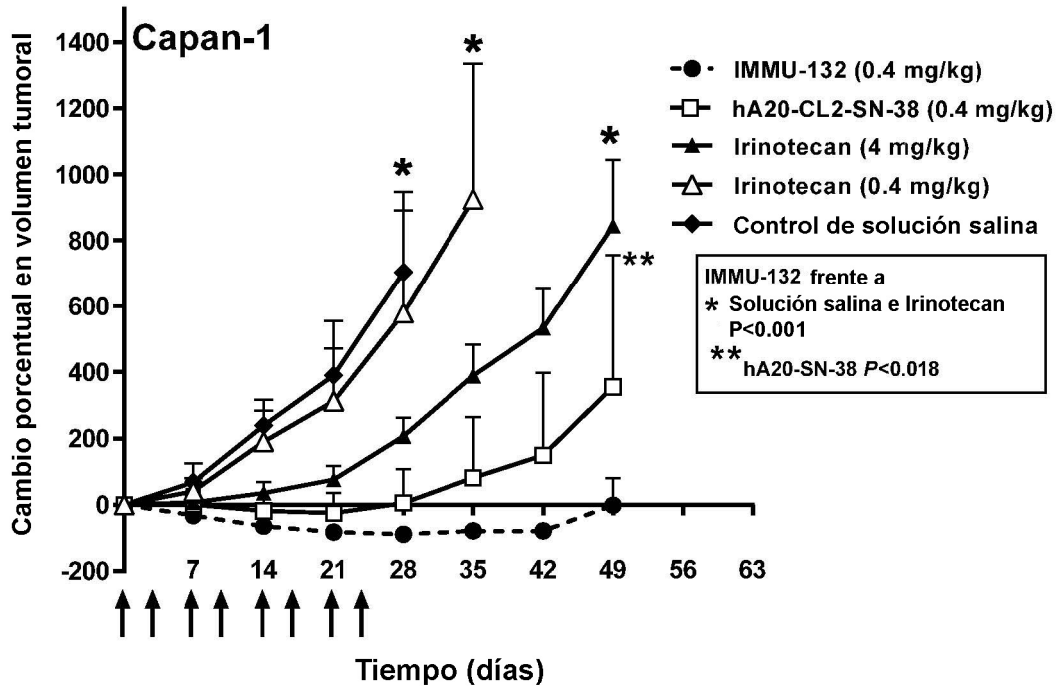


FIG. 3D

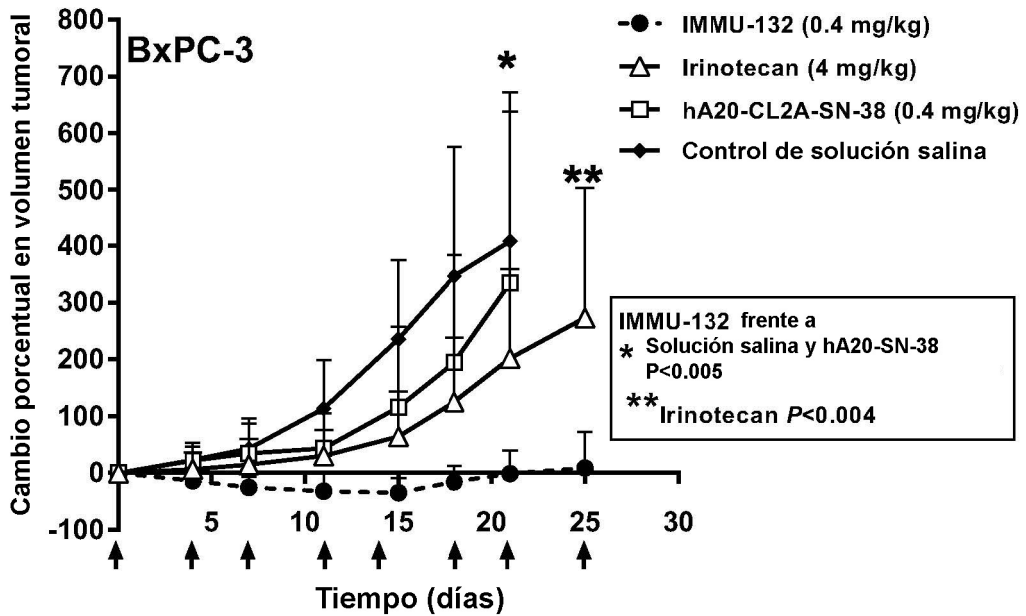


FIG. 3E

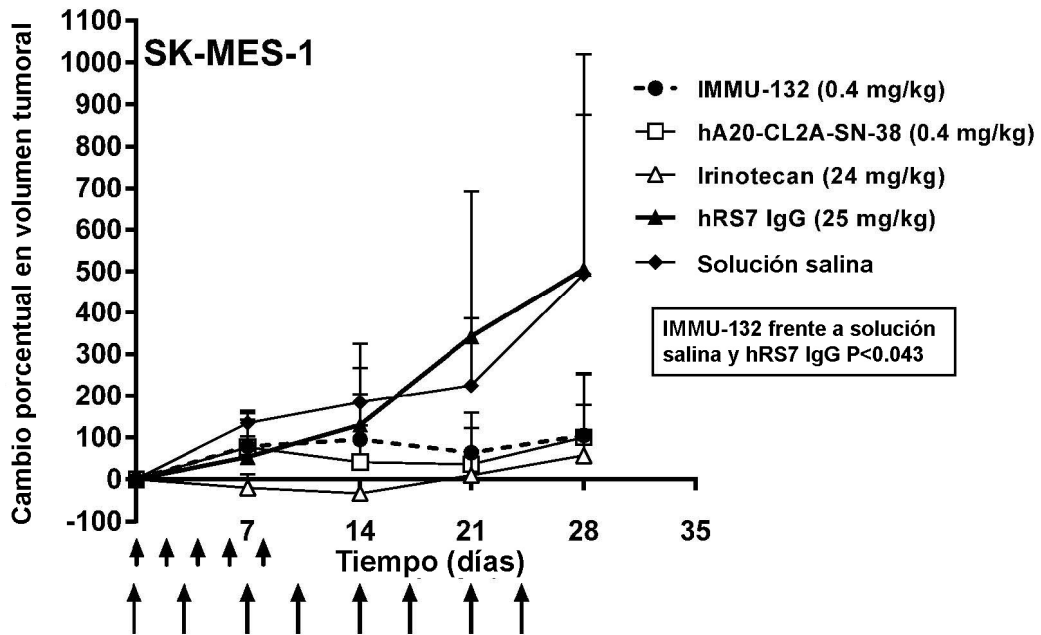


FIG. 3F

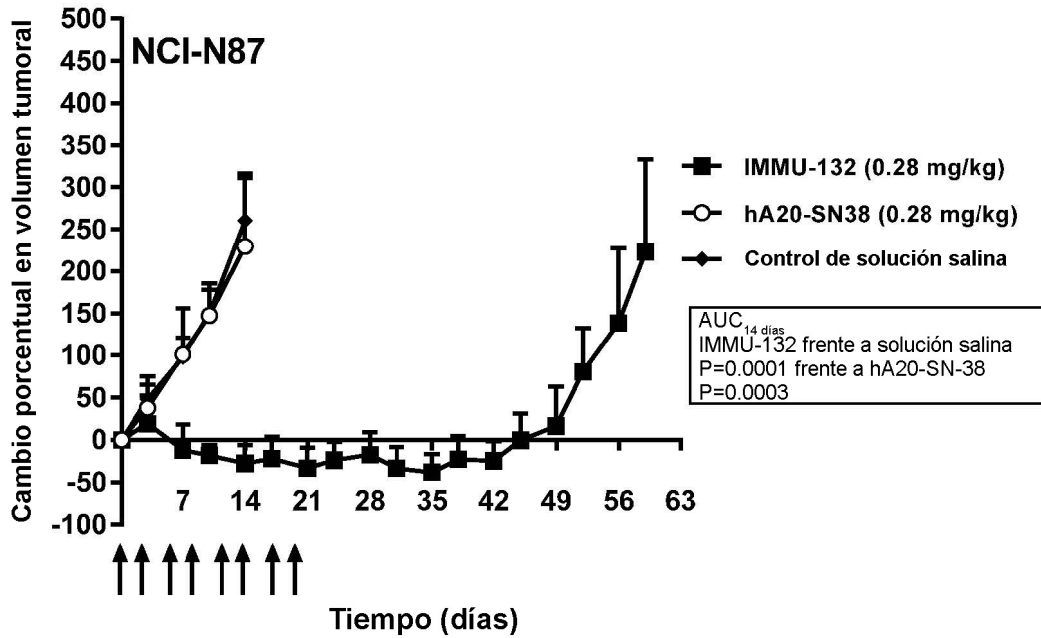


FIG. 4A

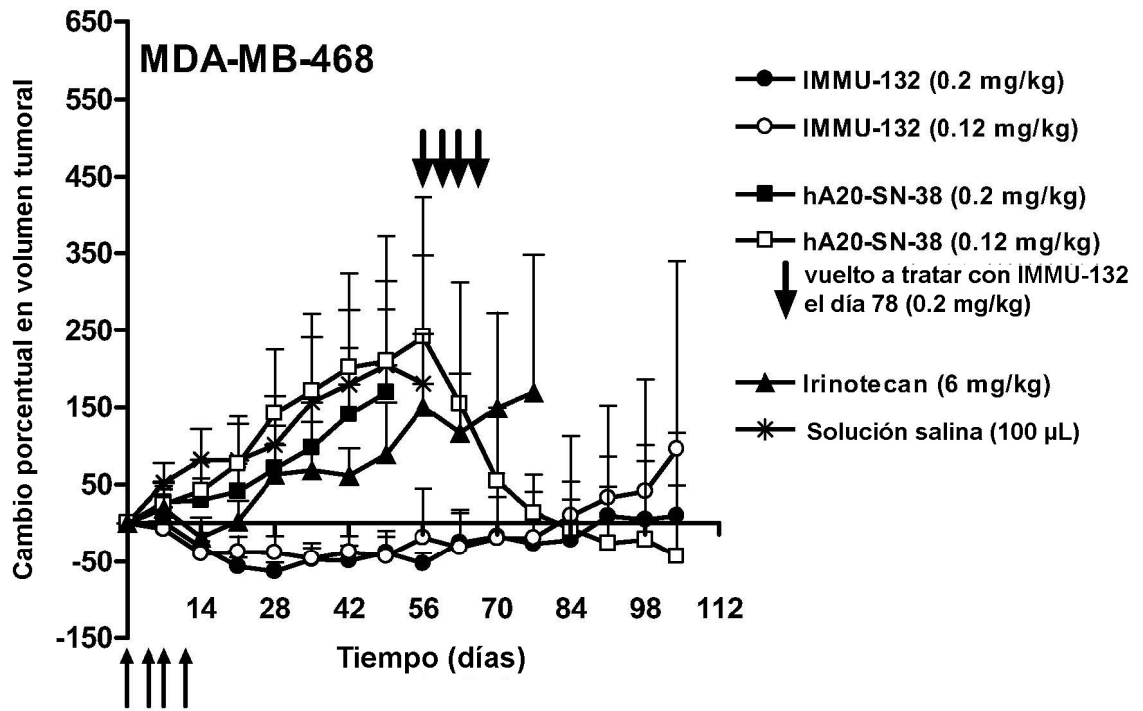


FIG. 4B

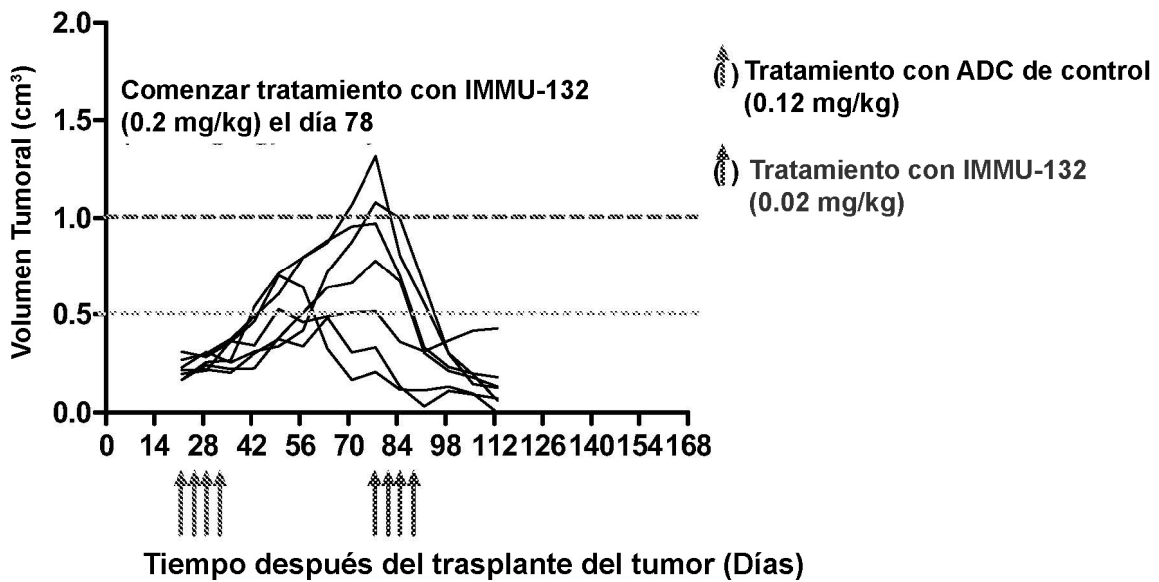


FIG. 4C

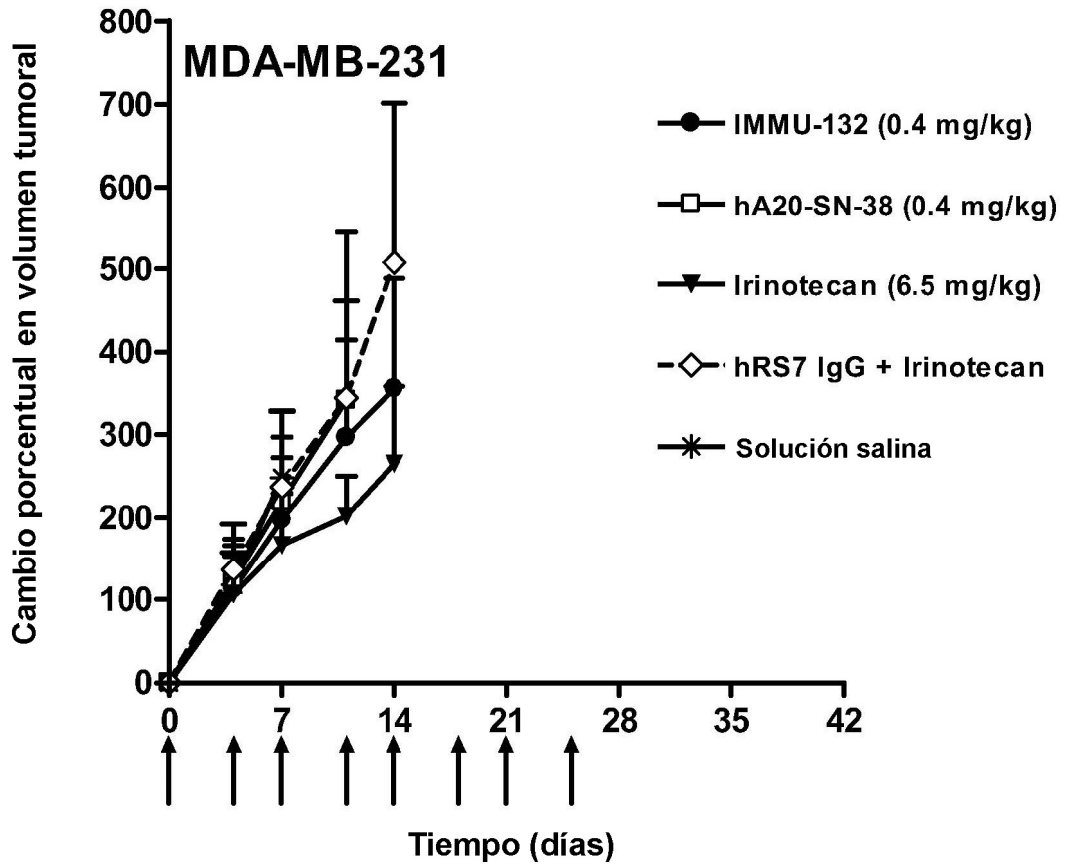


FIG. 5A

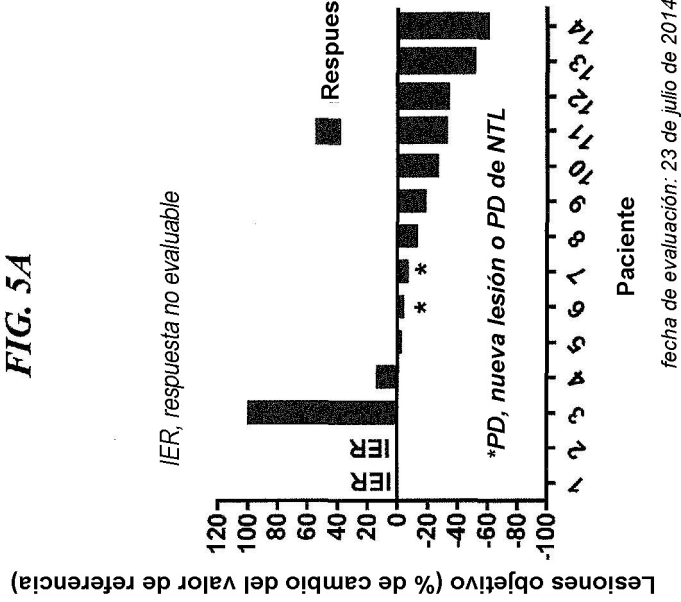


FIG. 5B

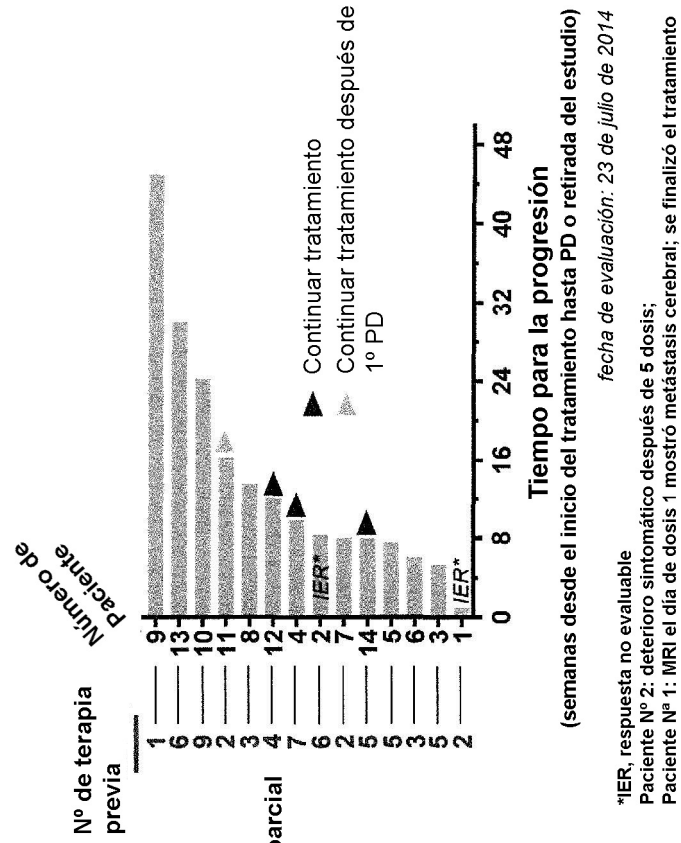


FIG. 6A

Concentraciones en suero máximas de IMMU-132
Dosis N° 1

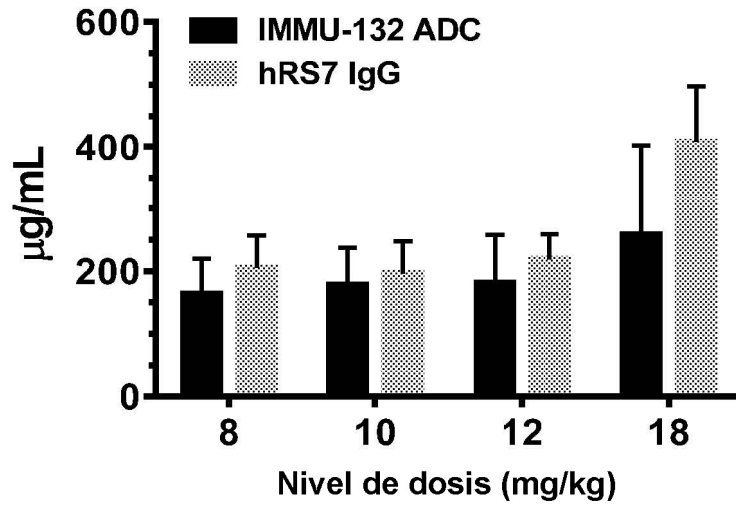


FIG. 6B

Concentraciones en suero máximas de IMMU-132
Dosis N° 1 (normalizadas a peso)

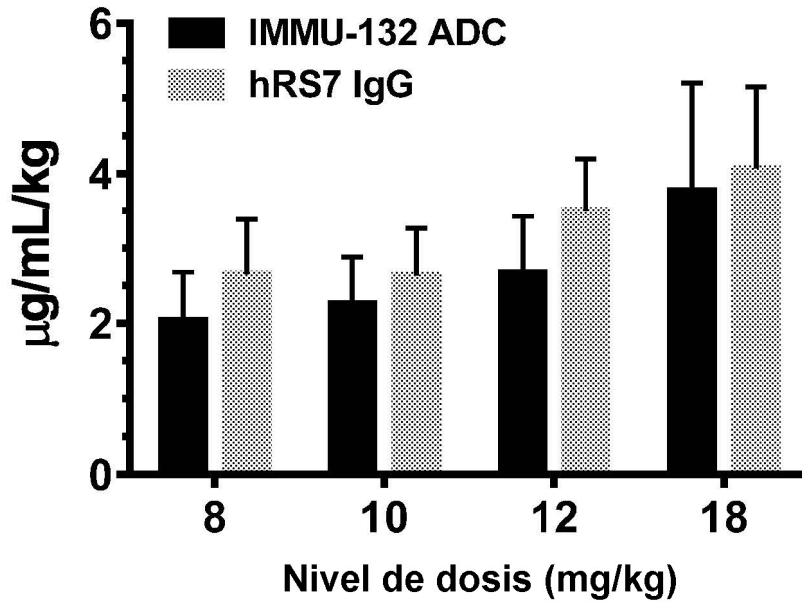


FIG. 7A

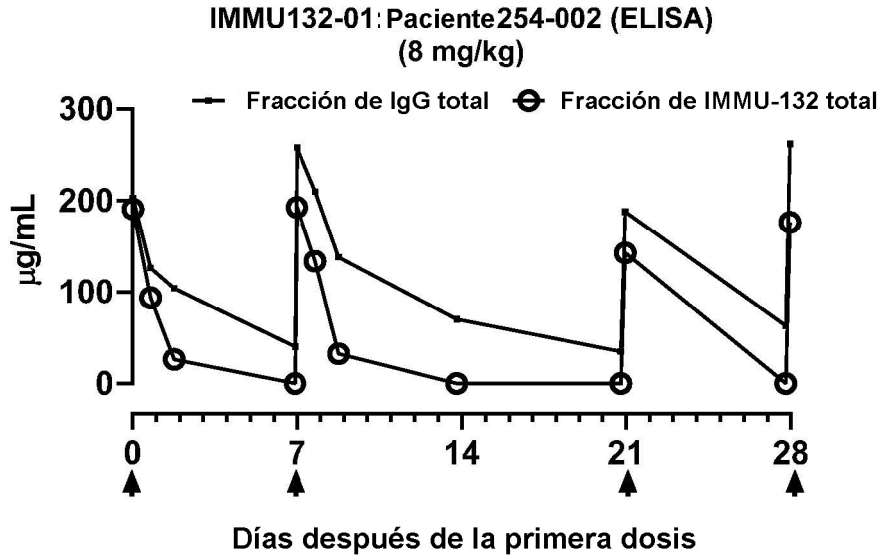


FIG. 7B

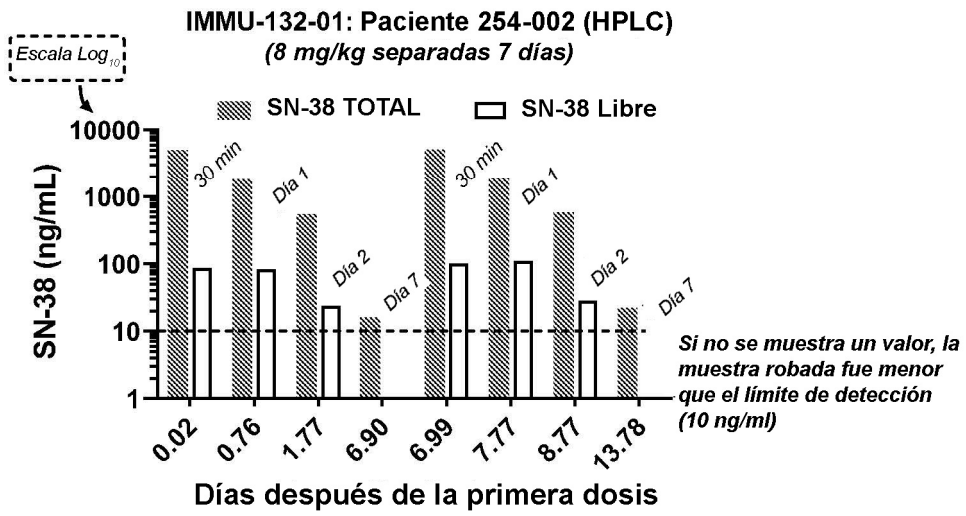


FIG. 7C

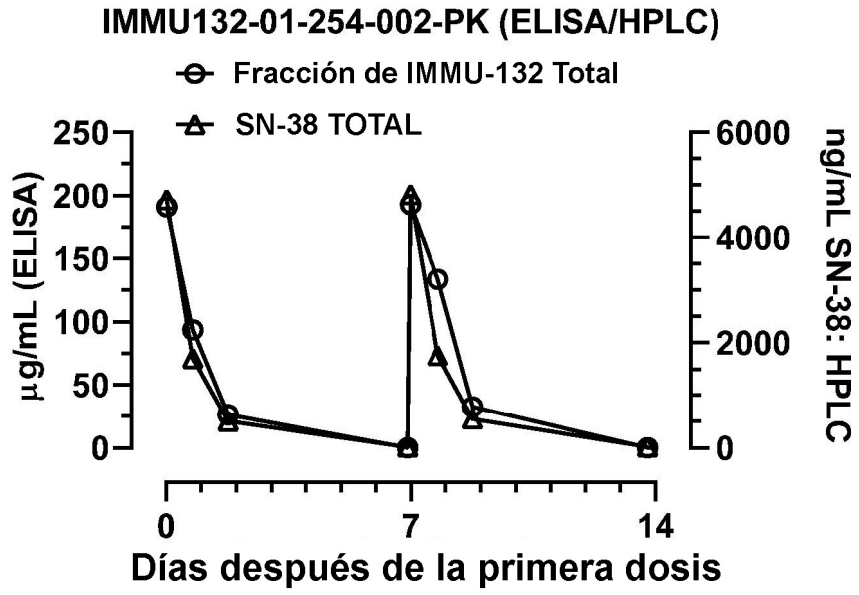


FIG. 8B

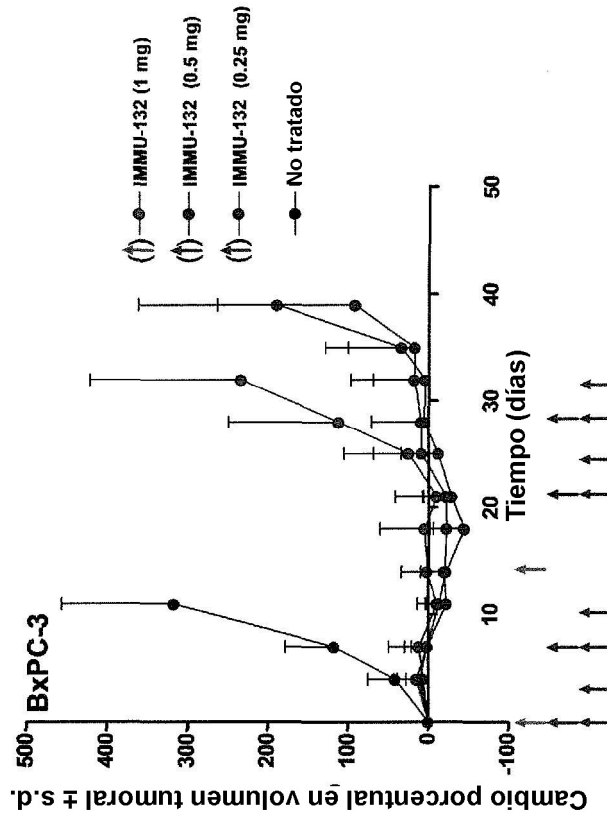


FIG. 8A

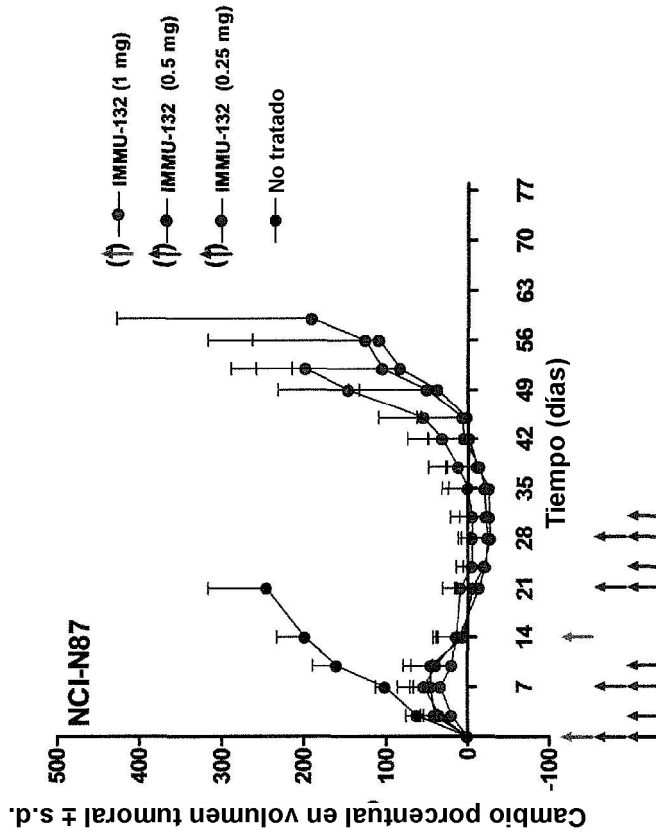


FIG. 9B

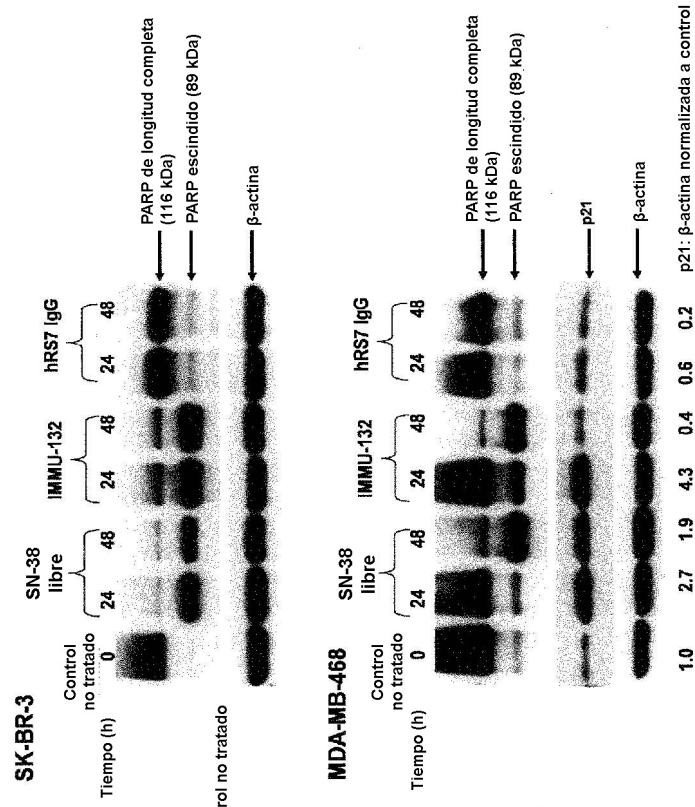


FIG. 9A

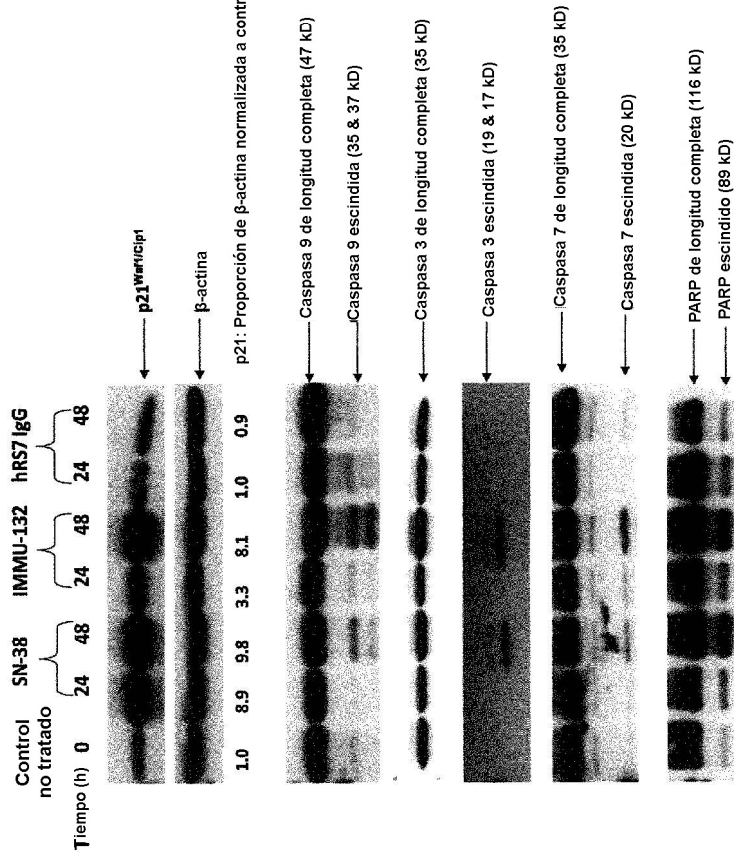
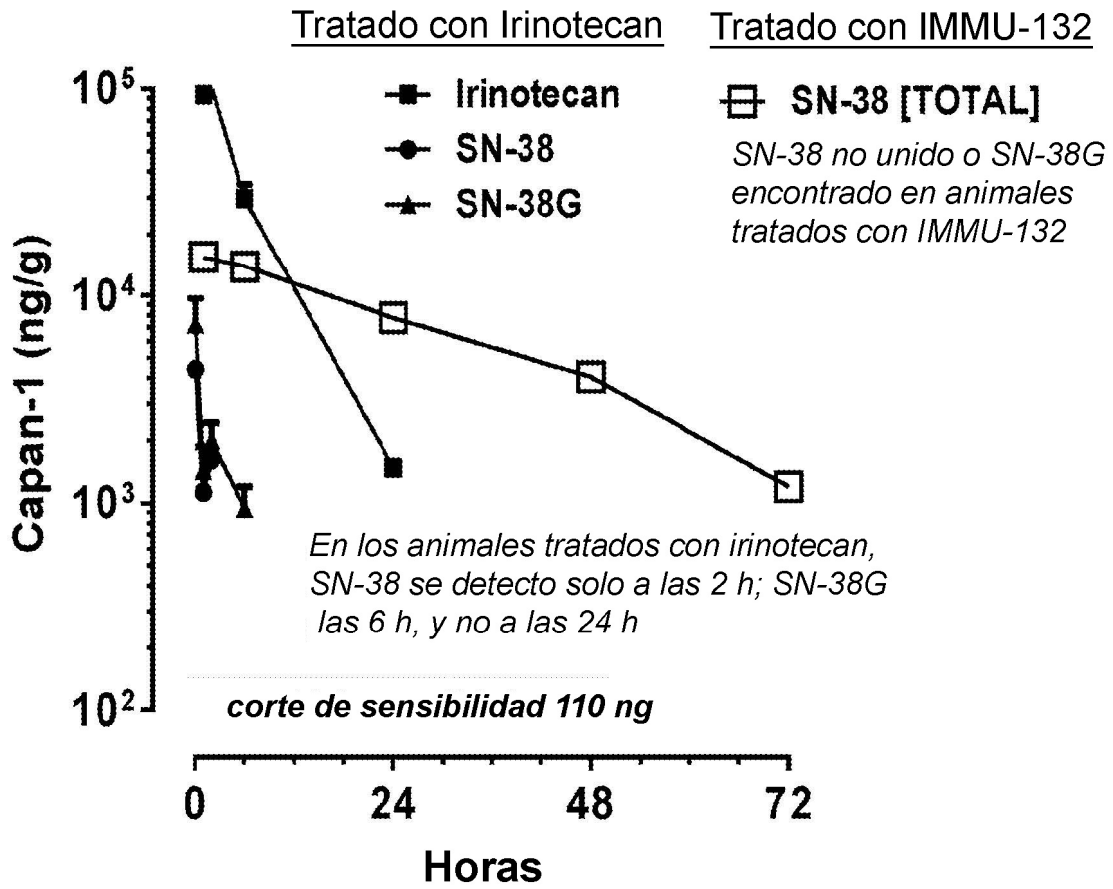


FIG. 10



Análisis AUC

Tratado con irinotecan	($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
Irinotecan (5 min - 24 h)	740
SN-38 (5 min - 2 h)	3.9
SN-38G (5 min - 6 h)	11.6
Tratado con IMMU-132	
SN-38 [TOTAL] (1 h-72 h)	474

FIG. 11

**Borrador de protocolo 2
Neoadyuvante +/- IMMU-132 en TNBC**

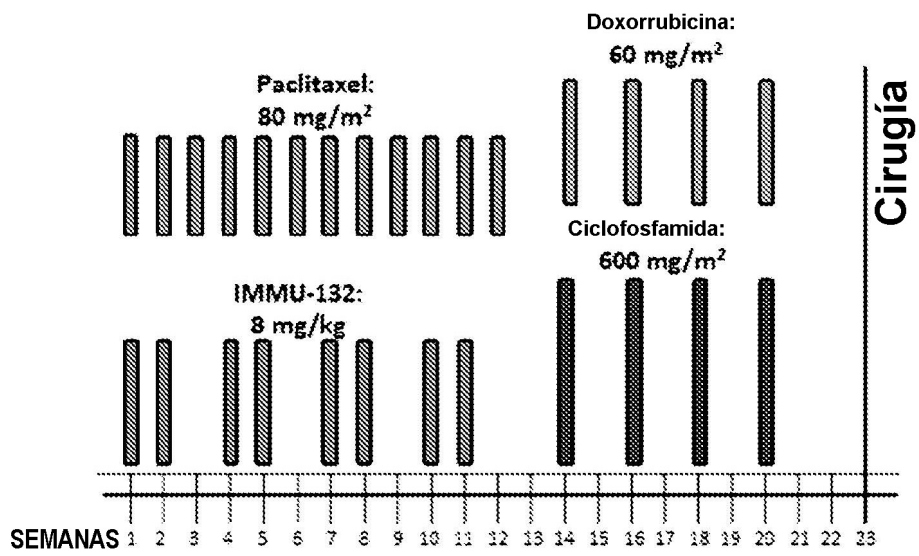


FIG. 12

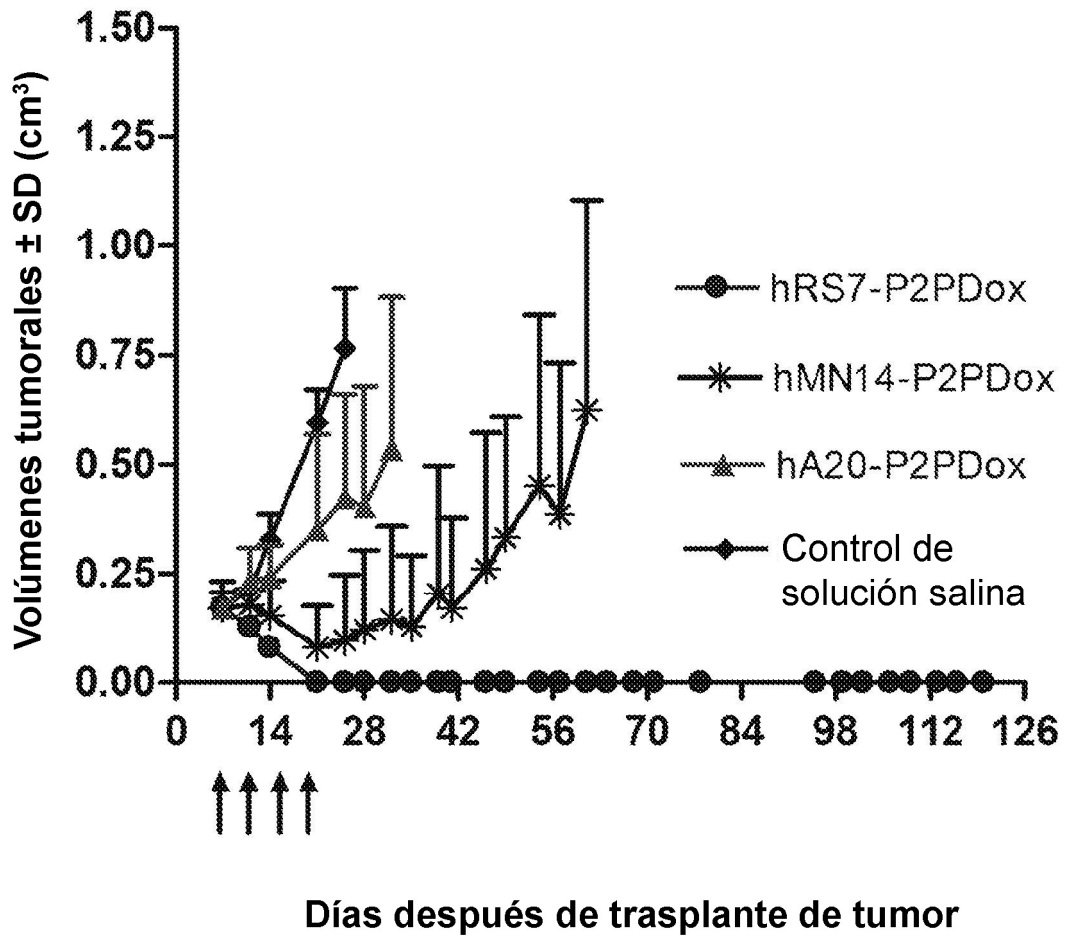


FIG. 13A

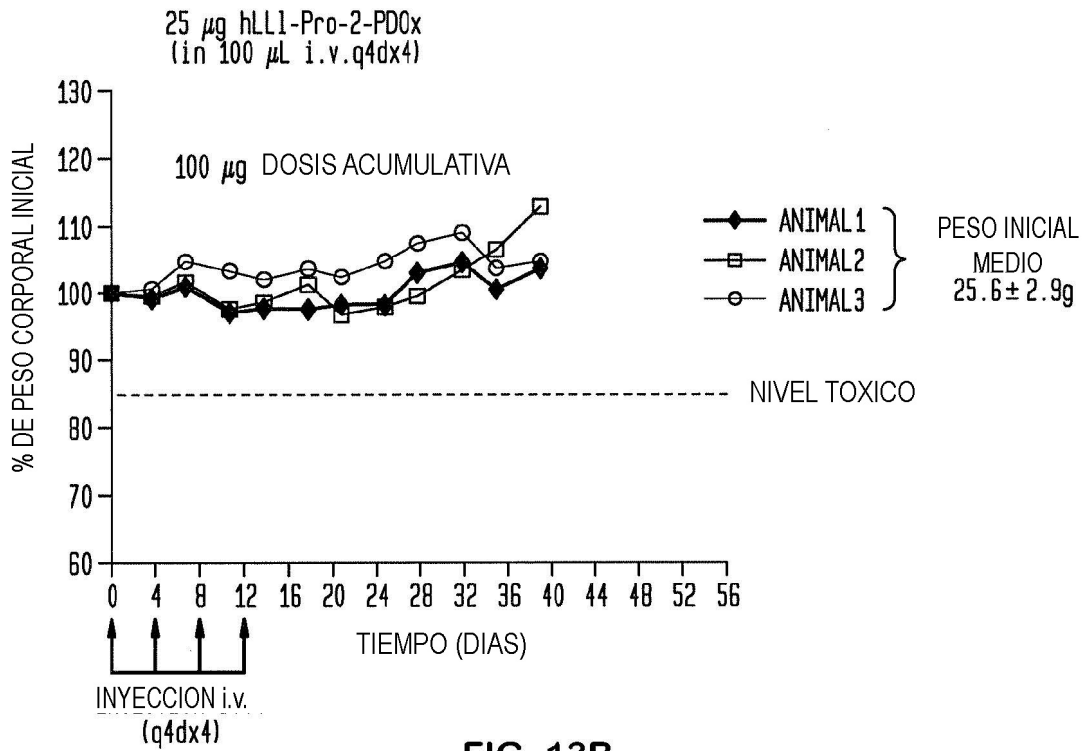


FIG. 13B

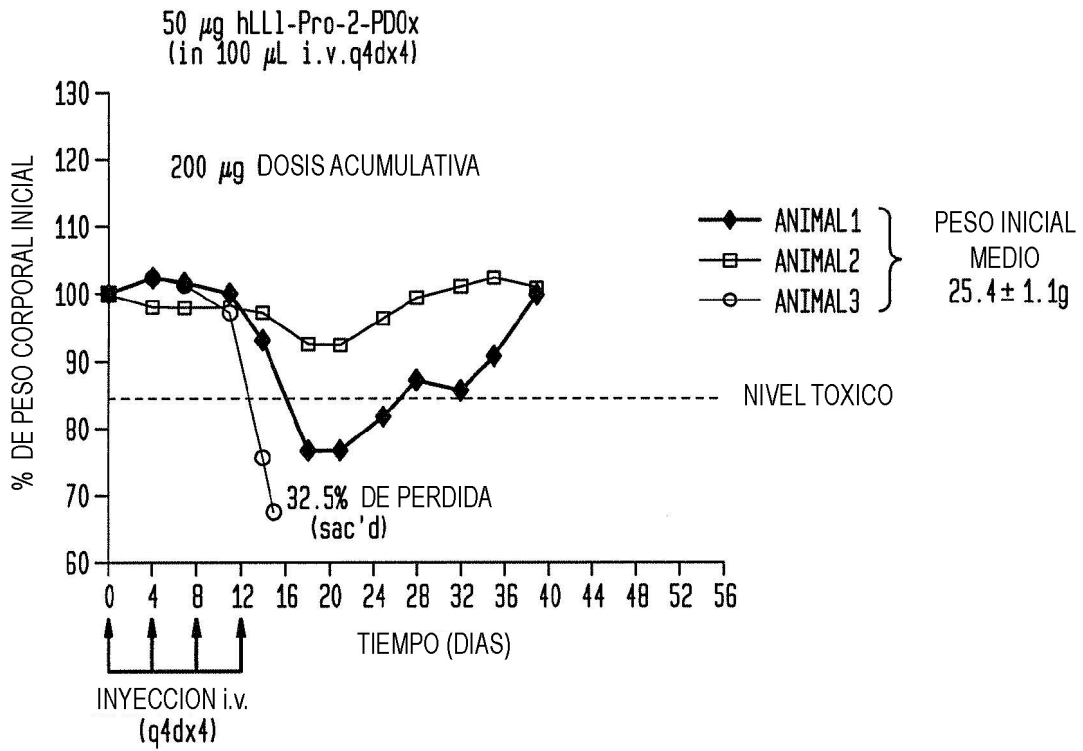


FIG. 13C

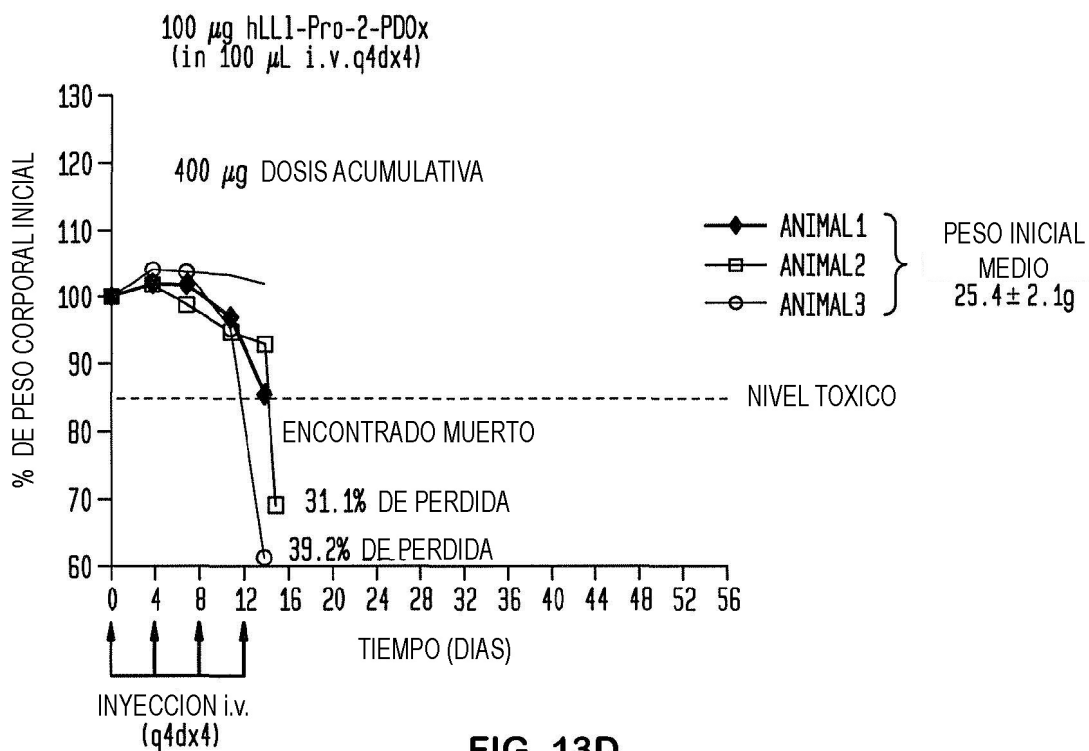


FIG. 13D

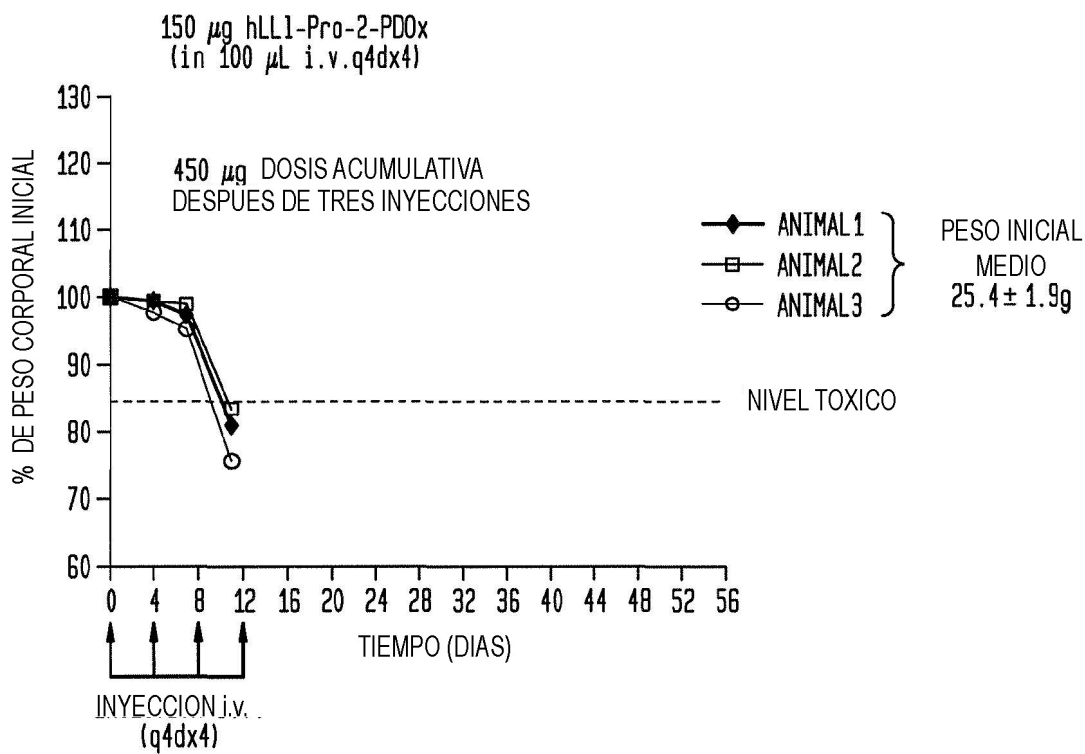


FIG. 14A

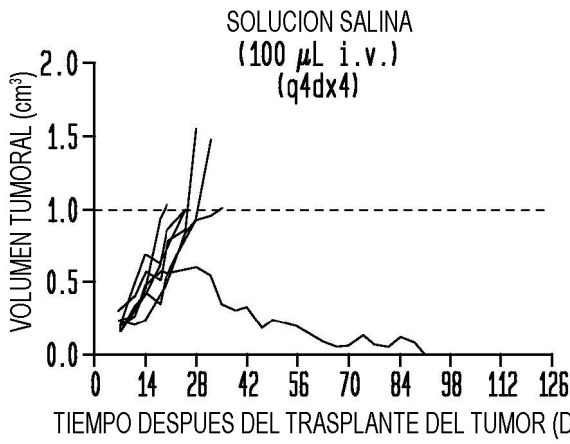


FIG. 14B

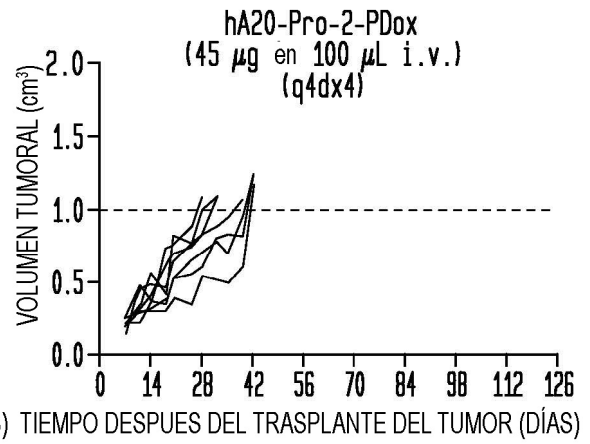


FIG. 14C

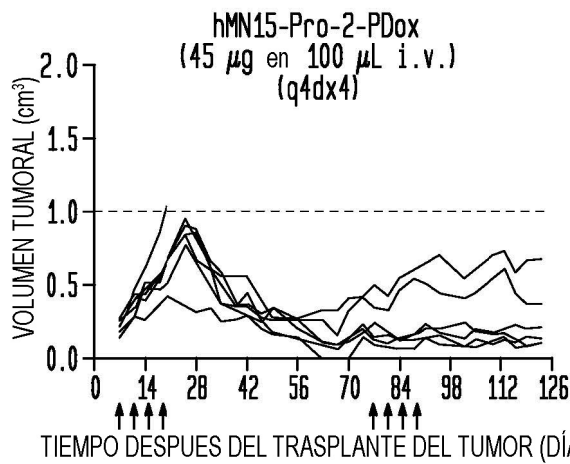


FIG. 14D

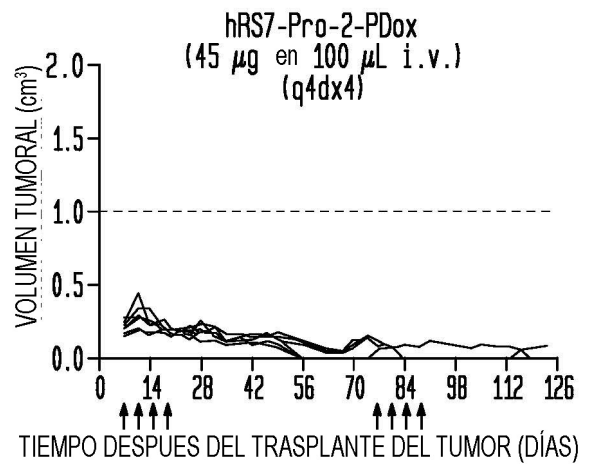


FIG. 14E

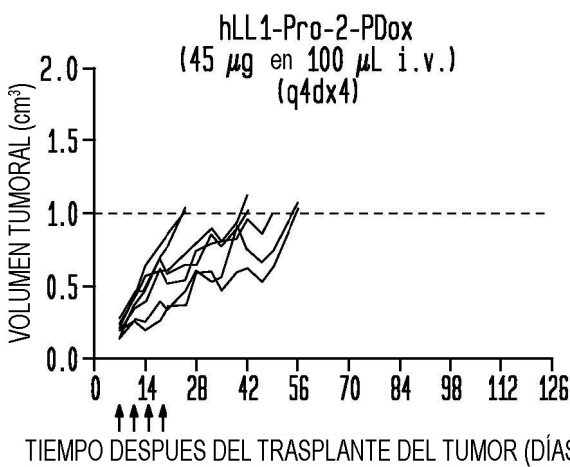


FIG. 14F

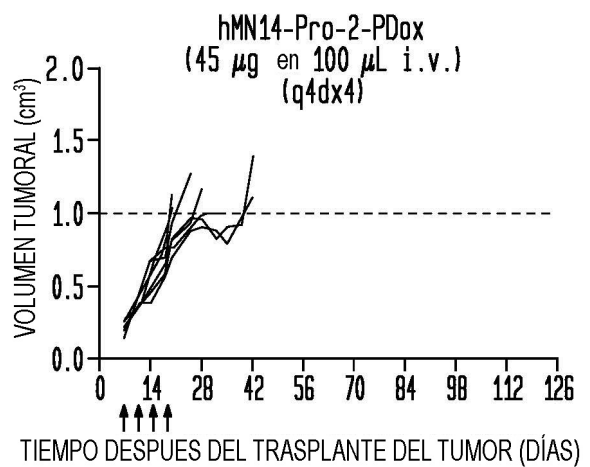


FIG. 15

Eficacia terapéutica de hRS7-Pro-2-PDox en ratones que portan xenoinjertos de carcinoma gástrico humano (NCI-N87)

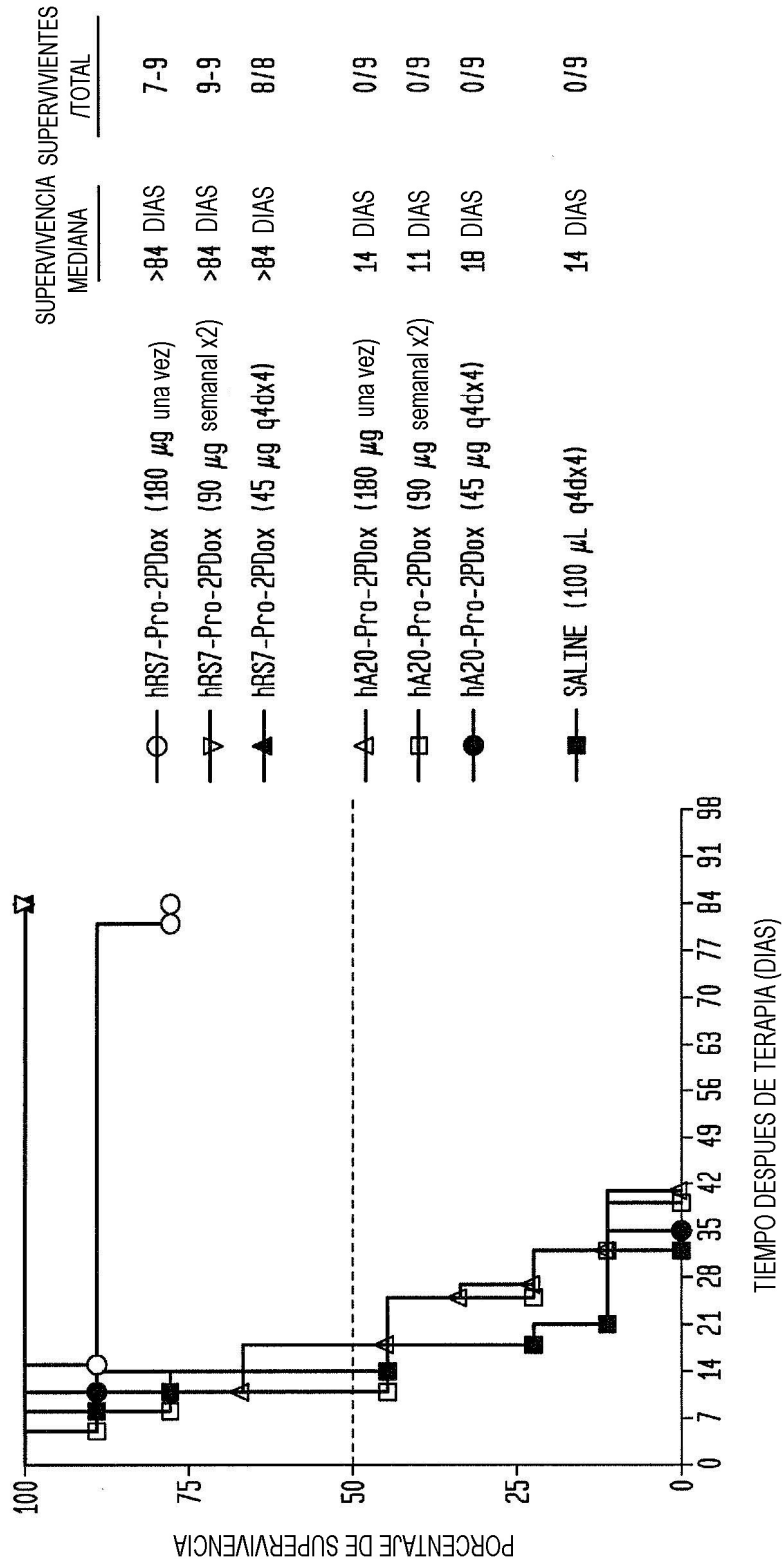


FIG. 16

Dosis eficaz mínima de una única inyección de un Inmunoconjugado de Pro-2-PDox Anti-Trop-2 (hRS7-Pro-2-PDox) en ratones que portan xenoinjertos de carcinoma gástrico humano (NCI-N87)

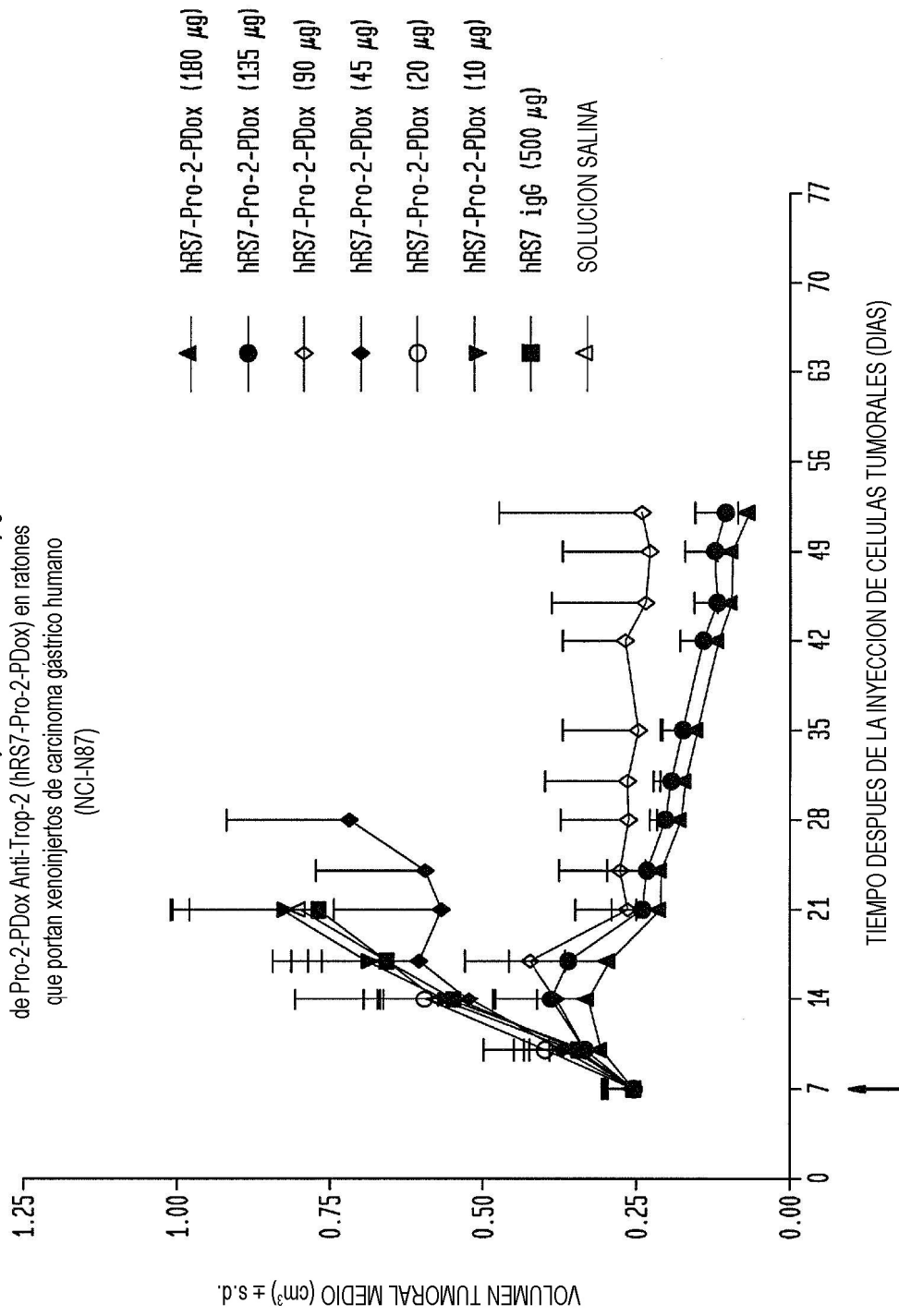


FIG. 17

Dosis eficaz mínima de una única inyección de un inmunocombinado de Pro-2-PDox Anti-Trop-2 (hRS7-Pro-2-PDox) en ratones que portan xenoinjertos de carcinoma gástrico humano (NCI-NB7)

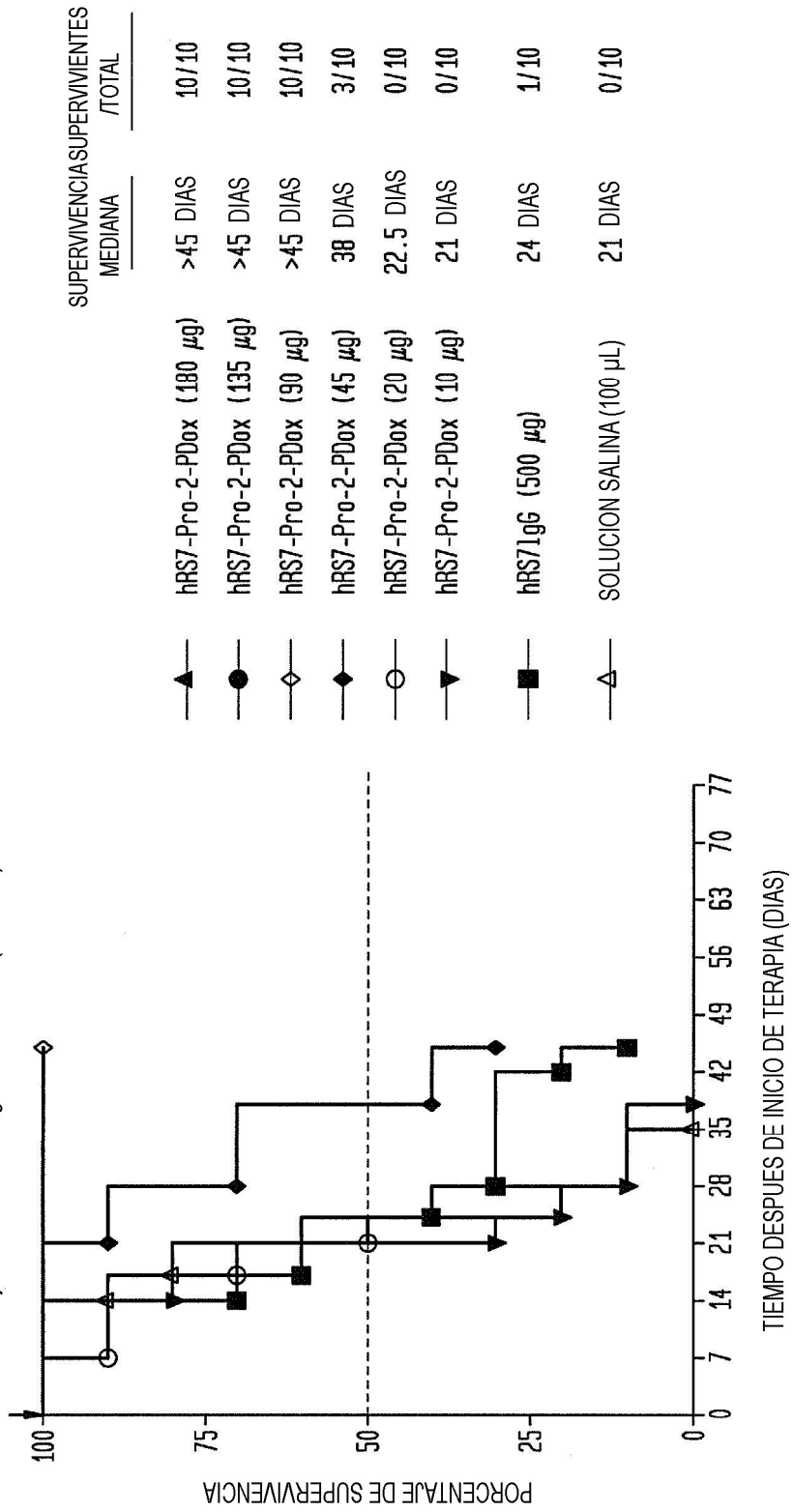


FIG. 18

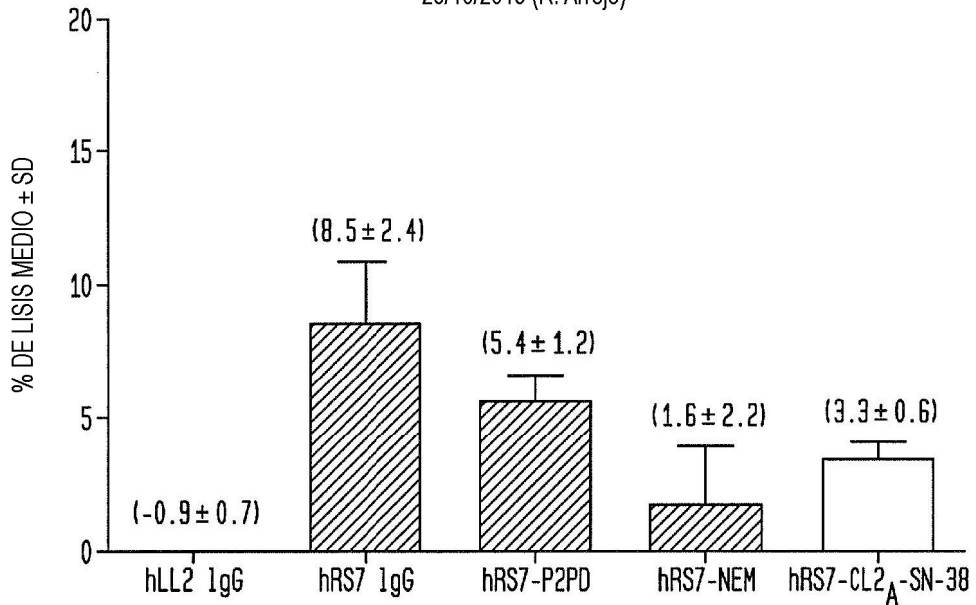
ADCC contra adenocarcinoma de páncreas (BxPC-3)

Centro sanguíneo de Donante Nj W066213029506

4 h de tiempo de incubación

Proporción PBMC a Células objetivo 100: 1 Tiempo de ensayo LDH diez minutos

25/10/2013 (R. Arrojo)



ABS [33.33nM]