



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 675**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **08759374 .5**

(96) Fecha de presentación : **02.04.2008**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2142570**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

(54) Título: **Anticuerpo anti-EpCAM y usos del mismo.**

(30) Prioridad: **04.04.2007 EP 07105628**

(73) Titular/es:
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Viale Shakespeare 47
00144 Roma, IT

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

(72) Inventor/es: **Anastasi, Anna Maria;**
Petronzelli, Fiorella;
De Santis, Rita y
Alberti, Saverio

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 675 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

Anticuerpo anti-EpCAM y usos del mismo

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-EpCAM humana y derivados funcionales de los mismos, a procedimientos y materiales para obtenerlos, al uso de dicho anticuerpos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores que expresan EpCAM y a materiales que comprenden dichos anticuerpos adecuados para su uso en el campo médico.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La elección como diana de tejidos tumorales por anticuerpos que puede reconocer selectivamente antígenos expresados en exceso en el sitio tumoral es el objetivo de todas las inmunoterapias antitumorales. La molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM, nº de Swiss Prot P16422) también conocida como el transductor 1 de la señal de calcio asociado a tumor, TROP-1, GA733-2, etc., es una glicoproteína de la transmembrana de tipo I expresada en la membrana basolateral sobre simples epitelios en los que participa en la adhesión a células hemofílicas independientes de calcio. El dominio extracelular consiste en un factor de crecimiento epidérmico como repetición, seguido de una repetición de tiroglobulina y una región pobre en cisteína, mientras que el dominio intracelular tiene 26 aminoácidos de longitud y hay dos sitios de unión a α -actinina para el enlace al citoesqueleto de actina (Winter MJ y col. 2003). Las células de tumores malignos humanos graves expresan fuertemente en exceso EpCAM como se ha confirmado recientemente por Went y colaboradores (2006) que informaron de los resultados de inmunohistoquímica obtenidos en un gran número de especímenes de tumor de colon, gástrico, próstata y pulmón.

20 25 Las células que expresan en exceso EpCAM tienden a segregarse de células normales, guardando relación con el desarrollo de un fenotipo proliferativo y maligno (Winter y col., 2003). Basándose en estos datos se exploró la posibilidad de elegir EpCAM como diana para inmunoterapia.

30 35 Un anticuerpo IgG2a murino, edrecolomab, con algo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) hacia células positivas para EpCAM, se autorizó en Alemania para uso clínico y se empleó para el tratamiento de pacientes con carcinoma colorrectal o pancreático que se habían sometido a cirugía curativa. Un resultado del seguimiento de siete años de enfermedad residual mínima después del tratamiento con edrecolomab en pacientes con cáncer colorrectal de Dukes C mostró una mortalidad reducida del 32% y una disminución en la tasa de reaparición del 23% (Riethmuller G y col., 1998; Weiner LM y col., 1993). Sin embargo, los resultados globales del estudio clínico conducen a la retirada de este fármaco como monoterapia debido a su eficacia antitumoral limitada (Punt CJ y col., 2002) y a la promoción de nuevos ensayos clínicos en los que el anticuerpo está previsto en ámbitos de adyuvante con otros compuestos quimioterapéuticos activos (Frodin JE y col., 2002).

40 45 Se han usado otros anticuerpos contra esta diana en entornos preclínicos o clínicos. MT-201 (adecatumumab) es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano con afinidad moderada por EpCAM (Naundorf S y col., 2002). Su eficacia se demostró en el modelo de xenoinjerto de ratón sin pelo usando la línea de células de cáncer de colon HT-29 (Naundorf S y col., 2002). Estudios *in vitro* sobre diversas líneas celulares de tumor han mostrado que MT201 media en la lisis de la célula diana por ADCC y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Prang N y col., 2005). Este anticuerpo está actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a hormonas (Oberneder R y col., 2006).

50 55 ING-1 es un anticuerpo monoclonal manipulado por ingeniería de alta afinidad humano que elige células positivas para EpCAM como diana. Se ha usado en un ensayo clínico de fase I en pacientes con adenocarcinomas avanzados, resistentes a terapia convencional, y los datos de este estudio sugirieron que los anticuerpos con alta afinidad por EpCAM, aunque eran más citotóxicos para células tumorales, también podían inducir lesión tóxica pancreática rápida, limitándose así su ventaja terapéutica para administración sistémica (De Bono JS y col., 2004). Hay opiniones divergentes sobre la relevancia de la afinidad por anticuerpos para la eficacia de la inmunoterapia. Velders y col. (1998) presentaron datos *in vitro* sobre el impacto de la afinidad de anticuerpos y la densidad de antígenos sobre ADCC como se ha obtenido por comparación de dos anticuerpos que tienen afinidad diferente por EpCAM. Los datos obtenidos de este estudio revelaron que el anticuerpo de alta afinidad podría mediar en la destrucción celular con bajos niveles de expresión de antígenos o, a niveles de unión comparables, con mayor eficacia. Como la heterogeneidad de una expresión de antígeno diana es una característica común de todos los tumores, el uso de anticuerpos de alta afinidad podría mejorar los resultados clínicos. Los posibles efectos tóxicos sistémicos asociados al uso terapéutico de anticuerpos anti-EpCAM de alta afinidad podrían reducirse mediante estrategias de elección de diana previa que incluyen una etapa de persecución para eliminar, en un momento dado, el anticuerpo en circulación. Alternativamente, el uso de anticuerpos anti-EpCAM de alta afinidad podría limitarse a tratamientos loco-regionales.

60 65 Se ha desarrollado un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario humano, NR-LU-10, específico para el antígeno de EpCAM, manipulado genéticamente como una proteína de fusión de estreptavidina para la radioinmunoterapia de elección de diana previa o cirugía de mama radioinmunoguiada. Los datos preclínicos mostraron que una dosis

única de 800 μ Ci de 90Y-DOTA-biotina administrada después de NR-LU-10 curó ratones con xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas humano subcutáneo establecido (Goshorn S y col., 2001). En un segundo informe de Burak WE Jr y col. (2001), el uso del Fab NR-LU-10 marcado fue útil en sondaje intraoperatorio para revelar la localización de tumores en 7 de 10 pacientes, confirmándose así su capacidad como agente de elección de diana.

- 5 A pesar del éxito clínico de anticuerpos monoclonales en varias patologías, la inmunoterapia de tumores sólidos todavía sigue siendo insatisfactoria. La radioinmunoterapia guiada de anticuerpos elegidos como diana previa "Pretargeted Antibody Guided RadiolimmunoTherapy" (PAGRITTM) es un enfoque de múltiples tratamientos que permite la acumulación restringida y amplificada del radioisótopo en el tumor. La especificidad y la afinidad del anticuerpo monoclonal antitumoral, usado como primera etapa, es fundamental para la eficacia del tratamiento.
- 10 El solicitante informó de acumulación excepcionalmente alta y específica del anticuerpo monoclonal anti-tenascina ST2146 en tumores xenotrasplantados humanos que expresan tanto alto como bajo antígeno (De Santis y col., Clinical Cancer Research, pág. 2191, 1 de abril de 2006).
- 15 Basándose en la enseñanza del documento EP 0 496 074, G. Paganelli y col. desarrollaron este enfoque de elección de diana previa de etapas para el tratamiento sistémico y loco-regional de tumores (Cremonesi M. y col., Eur. J. Nucl. Med. 26 (2): 110-120, 1999; Paganelli G. y col., Eur. J. Nucl. Med. 26 (4): 348-357, 1999; Paganelli G. y col., Cancer Biother. & Radiopharm. 16 (3): 227-235, 2001).
- 20 Otras referencias al procedimiento de elección de diana previa de tres etapas son los documentos WO 94/04702 y US 5.578.287.
- 25 El tratamiento de elección de diana previa de tres etapas se basa en la administración secuencial intravenosa de un anticuerpo monoclonal anti-tenascina biotinilado, estreptavidina y biotina marcada con ⁹⁰Y con dos administraciones de persecución de avidina y albúmina biotinilada antes de la estreptavidina y la biotina marcada con ⁹⁰Y, respectivamente, para reducir el fondo no específico.
- 30 En el campo médico existe la necesidad de anticuerpos anti-EpCAM adicionales y mejorados útiles en el diagnóstico y la terapia del cáncer tales como, por ejemplo, en el enfoque PAGRIT.

Resumen de la invención

- 35 La presente invención se refiere a un anticuerpo y fragmentos de anticuerpos que también pueden contener restos adicionales y agentes de diagnóstico, composiciones que contienen estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y composiciones de diagnóstico y terapéuticas que los contienen, a su uso en terapia y diagnósticos y procedimientos de preparación de estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.
- 40 Es un objeto de la presente invención un anticuerpo anti-EpCAM o un derivado funcional del mismo, en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen la secuencia SEC ID Nº 2; SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 6 y en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen la secuencia de SEC ID Nº 8; SEC ID Nº 10 y SEC ID Nº 12.
- 45 Preferentemente, el anticuerpo anti-EpCAM o derivado funcional del mismo según la invención puede inhibir completamente y permanentemente el crecimiento de tumores que expresan EpCam.
- 50 La invención también contempla la generación de mutantes de las CDR desveladas mutando uno o más aminoácidos en la secuencia de las CDR. Se sabe que una única sustitución de aminoácidos apropiadamente posicionada en una CDR puede ser suficiente para mejorar la afinidad. El investigador ha usado mutagénesis dirigida a sitio para aumentar aproximadamente 10 veces la afinidad de algunos productos de inmunoglobulina. Este procedimiento de aumentar o disminuir (es decir, modular) la afinidad de anticuerpos mutando la CDR es conocimiento común (véase, por ejemplo, Paul, W. E., 1993). Por tanto, la sustitución, delección o adición de aminoácidos a las CDR de la invención para aumentar o disminuir (es decir, modular) la afinidad de unión o especificidad también está dentro de la contemplación de la presente invención.
- 55 Por brevedad, el anticuerpo preferido según la presente invención debe identificarse con el nombre ST3232/10. Mientras que la presente invención se basa en ST3232/10, como una exemplificación de la presente invención, un experto en la materia apreciará que, una vez facilitada la presente divulgación, otros anticuerpos similares, y fragmentos de anticuerpos de ST3232/10, además de fragmentos de anticuerpos de estos anticuerpos similares, pueden producirse y usarse dentro del alcance de la presente invención. Tales anticuerpos similares pueden ser producidos por una cantidad razonable de experimentación por los expertos en la materia.
- 60 Preferentemente, el anticuerpo anti-EpCAM es un anticuerpo monoclonal. Más preferentemente, se produce por la línea celular de hibridoma depositada según el Tratado de Budapest en el Centro de Biotecnología Avanzada, Génova, Italia, con el nº PD06004.

Todavía preferentemente, el anticuerpo es un fragmento scFv, Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, un anticuerpo multimérico, un péptido o un fragmento proteolítico que contiene la región de unión a epítope.

- 5 Todavía preferentemente, el anticuerpo es químérico, está fusionado con otra proteína o ligado a un agente o un marcador. Más preferentemente, la proteína químérica es una quimera de ratón-ser humano. Preferentemente, la proteína de fusión comprende una citocina, una proteína de la familia de la avidina, biotina, biotina marcada u otras proteínas efectoras.
- 10 El anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o productos de inmunoglobulina de la invención pueden ligarse a un agente. La ligación puede ser por enlaces covalentes o por enlace anticuerpo-epítope. Por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o productos de inmunoglobulina pueden reticularse a un segundo anticuerpo en el que el segundo anticuerpo puede tener una afinidad por el agente. El agente puede ser un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I, Y, Pr), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos. El agente puede ser un agente quimioterapéutico. Un agente quimioterapéutico es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina-arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalano, 20 vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de EE.UU. nº 4.675.187), melfalano y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. El agente puede ser una citocina. El término citocina es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas están la hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral; 30 sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento transformantes (TGF); factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); 35 interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1-alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral; y otros factores de polipéptidos que incluyen LSI y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias nativas.
- 40 Para diagnóstico, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o productos de inmunoglobulina de la invención pueden unirse a una marca, tal como a un compuesto detectable o composición que está conjugada directamente o indirectamente con el anticuerpo. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable.
- 45 45 Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.
- 50 Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos (tal como, por ejemplo, una quimera de ratón-ser humano o una proteína de fusión con moléculas similares a citocinas, proteína de la familia de la avidina u otras proteínas efectoras) o molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a EpCAM. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina de la presente invención puede ser un anticuerpo, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multimérico. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina de la presente invención pueden ser o derivarse de 55 isótipos IgM, IgD, IgG, IgA o IgE.
- 60 Otro objeto de la presente invención son los derivados recombinantes de dicho anticuerpo. En particular, derivados recombinantes preferidos son aquellos en los que la región constante murina está sustituida por el homólogo humano (Ferrer C. y col., 1996) o aquellos en los que la región constante murina está sustituida por un resto biológicamente activo tal como, por ejemplo, un miembro de la familia de la avidina (Penichet ML y col., 1999), un factor de crecimiento útil para estimular los efectores inmunitarios dirigidos al tumor (tales como, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF), o aquellos en los que la región constante murina está sustituida por un resto farmacológicamente activo tal como, por ejemplo, una toxina, un superantígeno, una citocina o cualquier otra proteína útil en la potenciación de la eficacia terapéutica antitumoral (Di Massimo A. M. y col., 1997; Parente D. y col., 1997).
- 65 65 Los procedimientos para obtener dichos derivados recombinantes son muy conocidos en la técnica.

Otro objeto de la presente invención son los derivados de conjugado de dicho anticuerpo.

- En particular, derivados de conjugado preferidos son aquellos en los que el resto biológicamente activo está ligado al anticuerpo a modo de procedimientos convencionales. Ejemplos de restos biológicamente activos son miembro de la familia de la avidina, un factor de crecimiento útil para estimular efectores inmunológicos dirigidos a tumor (tales como, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF), un resto farmacológicamente activo tal como, por ejemplo, una toxina, un superantígeno, una citocina o cualquier otra proteína útil en el potenciamiento de la eficacia terapéutica antitumoral, fármacos antitumorales, radioisótopos.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Según la presente invención, derivados o conjugados recombinantes del anticuerpo monoclonal anti-EpCAM humana o fragmentos del mismo también se indican como "derivados". En una realización muy particularmente preferida de la invención, aparte del anticuerpo y los fragmentos, también se biotinan los derivados de los mismos.
- Es otro objeto de la presente invención un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o derivados funcionales del mismo de la invención, o que consiste en una secuencia degenerada del mismo.
- Preferentemente, el ácido nucleico comprende al menos una de las siguientes secuencias: SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 11.
- Otra realización se refiere a una molécula de ácido nucleico purificada que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos o molécula de productos de inmunoglobulina de la invención. Una molécula de ácido nucleico que codifica un producto de inmunoglobulina de la invención puede prepararse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, oligonucleótidos pueden sintetizarse usando sintetizadores de oligonucleótidos y ligándolos juntos para formar un marco de lectura abierto funcional que codifica un producto de inmunoglobulina de la invención. Una vez sintetizada, la molécula de ácido nucleico puede clonarse en un vector de ácido nucleico. En la técnica se conocen un vector de ácido nucleico tal como un plásmido, cósmido, fagérido, plásmido de levadura, vectores de fago, plásmido TI y similares. El vector puede ser un vector de expresión. Los vectores de expresión y los sistemas de expresión están comercialmente disponibles de proveedores tales como Stratagene (La Jolla, CA).
- Es otro objeto de la invención un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención.
- Es otro objeto de la invención una célula huésped aislada transformada con el vector de expresión de la invención.
- La célula puede prepararse por procedimientos de transfección y pueden comprarse kits para la transfección de células procariotas y eucariotas de fuentes comerciales (por ejemplo, Stratagene, La Jolla, CA).
- Es otro objeto de la invención una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo anti-EpCAM de la invención. Preferentemente, la línea celular de hibridoma es el hibridoma cST3232/10 depositado según el Tratado de Budapest en el Centro de Biotecnología Avanzada, Génova, Italia, con el nº PD06004.
- El procedimiento para la preparación del anticuerpo monoclonal está dentro de las habilidades del experto en la materia y comprende cultivar la línea celular de hibridoma anterior y aislar el anticuerpo según procedimientos convencionales.
- Es un objeto posterior de la invención el anticuerpo anti-EpCAM de la invención para su uso como un medicamento. Preferentemente, para su uso como un medicamento antitumoral. Más preferentemente, el tumor se selecciona del grupo de: carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga urinaria o carcinoma de pulmón. Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para tratar un paciente con un trastorno neoplásico que comprende administrar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina de la invención o un ácido nucleico de la invención a dicho paciente. Se conocen procedimientos para inmunoterapia para cáncer. Véase, por ejemplo, en Old, L. J. Immunotherapy for Cancer, Scientific American, septiembre de 1996 El anticuerpo podría conjugarse con biotina y eliminarse de la circulación usando un agente de persecución tal como avidina con el fin de prevenir el posible efecto tóxico de la administración sistémica.
- En este documento también se desvela un procedimiento para tratar un tumor sólido que comprende, primero, extirpar un tumor sólido (por ejemplo, uno que expresa EpCAM) de un órgano de tejido sólido (por ejemplo, el colon) de un sujeto humano aquejado y luego administrar al sujeto un agente antineoplásico tal como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo que se une a EpCAM) que es selectivamente tóxico para las células del tumor sólido en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización de la invención, la etapa de administración se lleva a cabo depositando el agente antineoplásico en la cavidad de resección.
- Es otro objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o derivados del mismo según la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención es para radioinmunoterapia. Las composiciones farmacéuticas son

convencionales en este campo y pueden ser preparadas por el experto en la materia basándose justamente en el conocimiento general común. Ejemplos de composiciones farmacéuticas se facilitan en las referencias mencionadas en la presente invención. Lo mismo aplica a kits de diagnóstico. Se prefiere particularmente el kit para radioinmunoterapia de tumores como se desvela en los documentos anteriormente mencionados por Paganelli y col. y el documento EP 0 496 074.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y/o un fragmento y/o un derivado recombinante y/o un conjugado del mismo en mezcla con al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable están incluidas en el alcance de la presente invención.

Todavía otro aspecto de la presente invención es un medicamento para la radioinmunoterapia de tumores que se administra a un sujeto que padece un tumor que expresa EpCAM, y comprende dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos proteolíticos, o derivados del mismo. En una realización preferida, dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos proteolíticos o derivados del mismo se biotinilan, en una realización más particularmente preferida, el medicamento es adecuado para radioinmunoterapia, en particular para llevar a cabo el procedimiento de elección de diana previa de tres etapas, como se describe en la materia, por ejemplo en el documento EP 0 496 074, Paganelli y col., 1999, y la patente de EE.UU. nº 5.968.405. En este último aspecto, el medicamento según la presente invención puede estar en forma de un kit, estando dicho kit compuesto por 4 viales, cuyo primer vial contiene el anticuerpo o fragmento biotinilado o derivado del mismo, el segundo vial contiene una avidina, el tercer vial contiene albúmina biotinilada, el cuarto vial contiene biotina radiomarcada o derivado de biotina. Un tipo de kit tal se proporciona en Paganelli y col., 1999. Una avidina comprende avidina, estreptavidina, PEG-avidina o PEG-estreptavidina, di- o poliavidina o di- o poliestreptavidina natural o desglicosilada. Una biotina radiomarcada contiene un radionúclido, tal como se ha desvelado en el documento EP 0 496 074, preferentemente se desvelan derivados de ⁹⁰Y-biotina, por ejemplo, en el documento WO 02/066075. Un kit de este tipo se desvela en Paganelli y col., 1999. Preferentemente, los viales son adecuados para inyección humana.

Preferentemente, la composición comprende, en la misma dosis unitaria o por separado, al menos otro anticuerpo específico tumoral. Preferentemente, el anticuerpo específico tumoral es un anticuerpo contra EpCAM diferente del anticuerpo de la invención. Otra realización se refiere a una composición terapéutica que comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina de la invención. Los productos de inmunoglobulina de la invención pueden proporcionarse en forma de una composición que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica puede usarse para el tratamiento de trastornos en un mamífero tales como un ser humano. La invención también proporciona un procedimiento para tratar un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina de la invención al mamífero, en el que el mamífero tiene un trastorno tal como cáncer, requiriendo tratamiento con el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina.

Es otro objeto de la invención el anticuerpo anti-EpCAM de la invención para su uso en diagnósticos *in vivo* o *in vitro*. Preferentemente, como diagnóstico antitumoral. Más preferentemente, como diagnóstico antitumoral *in vivo*. La detección o diagnóstico de un trastorno puede comprender las etapas de elegir como diana una muestra de tejido de un sujeto con el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina de la invención bajo una condición que permita la formación de un complejo entre dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo, quimera de anticuerpos o producto de inmunoglobulina y el antígeno de EpCAM, y determinar la formación de dicho complejo. El anticuerpo según la invención puede aplicarse a diversos tipos de técnicas de diagnóstico inmunológico o bioquímico. Por ejemplo, las técnicas de diagnóstico incluyen (1) uso de un anticuerpo fluorescente o un procedimiento de tinción química en que el anticuerpo monoclonal se marca con colorante, tal como un colorante fluorescente, para permitir la presencia del enlace entre el anticuerpo monoclonal y el antígeno que va a observarse visiblemente, (2) un procedimiento de enzima-anticuerpo usando una enzima en lugar del colorante fluorescente para marcar el anticuerpo monoclonal, (3) un procedimiento de ELISA usando un anticuerpo secundario marcado con proteína para medir una cantidad de antígeno o similares, (4) un procedimiento de radioinmunoensayo en que el anticuerpo monoclonal se marca con isótopo, y (5) un procedimiento de inmunoprecipitación que utiliza una reacción de aglutinación producida por la reacción antígeno-anticuerpo.

Las técnicas de diagnóstico incluyen adicionalmente un procedimiento de transferencia Western en el que las proteínas se fraccionan mediante electroforesis y se detectan por anticuerpo monoclonal. El procedimiento de transferencia Western es ventajoso en la clonación directa de un polinucleótido que codifica la proteína de antígeno con respecto al anticuerpo monoclonal. El procedimiento de transferencia Western incluye diversas modificaciones tales como un procedimiento Western, un procedimiento South-Western, un procedimiento North-Western y un procedimiento West-Western.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo y los fragmentos del mismo pueden contener adicionalmente marcadores y/o agentes de diagnóstico adicionales. Dichos marcadores y/o agentes de diagnóstico son muy conocidos para el experto en la materia a la que se refiere la presente invención. Según una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo o fragmentos proteolíticos del mismo se biotinilan.

Es otro objeto de la invención una composición soluble inyectable para diagnósticos tumorales *in vivo* que comprende el anticuerpo anti-EpCAM de la invención.

5 Es otro objeto de la invención un procedimiento para inmunodetectar en una muestra un antígeno que puede unirse al anticuerpo o derivado del mismo según la invención que comprende la etapa de incubar en condición apropiada la muestra con el anticuerpo o derivado del mismo según las reivindicaciones 1 a 14 para obtener un inmunocomplejo, y detectar el inmunocomplejo.

10 Es otro objeto de la invención un kit de diagnóstico para el procedimiento según la reivindicación 30 que comprende un anticuerpo o derivado del mismo según la reivindicación 1 a 14 y medios de detección de inmunocomplejos.

15 En otra realización de la presente invención, en el kit terapéutico, el anticuerpo biotinilado se combina con otros anticuerpos específicos para EpCAM. Alternativamente, el anticuerpo biotinilado se combina con otros anticuerpos específicos para tumor. Una enseñanza general de dicho tipo de kit se proporciona en el documento EP 0 496 074, Paganelli y col., 1999, y la patente de EE.UU. nº 5.968.405.

20 En particular, la presente invención también engloba un recipiente que opcionalmente contiene múltiples compartimentos que comprenden el anticuerpo biotinilado o fragmentos o derivados del mismo, tampones y reactivos adecuados para su uso en un kit terapéutico para un procedimiento de elección de diana previa de tres etapas.

25 Otro objeto de la presente invención es el uso de dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos, o derivados recombinantes o conjugados del mismo o el derivado biotinilado del mismo, para la preparación de medios de diagnóstico, para la detección de enfermedades que expresan EpCAM, en particular para la obtención de imágenes de tumores *in vivo*.

30 ST3232/10 se obtiene del clon de células de hibridoma correspondiente cST3232/10 como se facilita en detalle en el siguiente ejemplo.

35 La presente invención también debe desvelarse en detalle en la siguiente descripción por medio de ejemplos no limitantes con referencia a las siguientes figuras.

40 **Figura 1:** 4-12% de BisTris SDS-PAGE (Precast, Invitrogen, EE.UU.) de cosecha de cST3232/10 purificada sobre una columna de proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare). Bandas 1-3: Mab ST3232/10 purificado bajo condiciones no reductoras; bandas 4-6: Mab ST3232/10 purificado bajo condiciones reductoras. Tampón de electroforesis 1x MES. Tinción del gel por Coomassie (Simplie Blu, Invitrogen, EE.UU.)

45 **Figura 2:** Filtración en gel sobre la columna TSGK3000 de ST3232/10 purificado, realizado en PBS a pH 7. Se informa el tiempo (min) en abscisas y las unidades de miliabsorbancia (UmA) en ordenadas.

50 **Figura 3:** Prueba de especificidad por FACS de anticuerpos anti-EpCAM. ST3232/10 u otros anticuerpos de control (M104, HT29/26 y T16) se incubaron (1 µg/10⁶ células, 1 h 4°C) con linfocitos L de fibrosarcoma murino que expresan no naturalmente EpCAM, se transfecaron con molécula TROP-1 humana (paneles A-C), molécula TROP2 humana (paneles D-F) o con el vector vacío en el que no se introdujeron proteínas exógenas (paneles G-I). Se usó un anticuerpo secundario conjugado con PE (BD, EE.UU.) según instrucciones del fabricante y la mortalidad de las células se evaluó tiñendo con 7-AAD (FACSCalibur, BD Biosciences, EE.UU.). ST3232/10 fue positivo con las células positivas para TROP-1 (panel A) y negativo con los linfocitos L naturales o con aquellos transfecados con la molécula TROP2 (paneles G y D, respectivamente). Se observó un resultado similar con otros anticuerpos específicos para EpCAM (paneles B, E, H: M104; C, I: HT29/26). El anticuerpo T16 se usó como control positivo en células TROP2-L (panel F).

55 **Figura 4:** Microscopía confocal de ST3232/10 conjugado con Alexa488 en la línea celular de tumor de mama MCF7. Las células MCF7 se sembraron en cubreobjetos de 15 x15 mm y se fijaron después de 48 h por incubación en PBS / 4% de paraformaldehído durante 30 min a TA. Entonces, las células se permeabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo, y se analizaron varios campos por microscopía confocal. El conjugado Alexa488-ST3232 muestra el patrón de tinción esperado, con la mayor intensidad en los bordes célula-célula, y la tinción de parches aislados. Se informa de dos ejemplos de parches aislados en los paneles A y B.

60 **Figura 5:** Inmunorreactividad de ST3232/10 y el anticuerpo monoclonal HT29/26 anti-EpCAM hacia el antígeno expresado en la línea celular de carcinoma de colon HT29. Los datos se representan como la variación de densidad óptica (DO, medida a 405 nm) (escala lineal, eje Y) a concentraciones crecientes de los dos anticuerpos (µg/ml, escala logarítmica, eje X) incubados con carcinoma de colon HT29.

5 **Figura 6:** Análisis cinético y parámetros de la unión de ST3232/10 al dominio extracelular de la molécula EpCAM inmovilizada sobre un chip sensor de CM5. Panel A: sensogramas de las concentraciones inyectadas de Mab (500, 250, 62,5, 15,6 y 7,8 nM) en función del tiempo (min, eje X) y unidades de resonancia (UR, eje Y). Panel B: se usó un modelo bivalente en el software BIAevaluation para el ajuste de datos; los residuos, que representan la diferencia en UR entre curvas observadas y esperadas, se informan en la gráfica (eje Y) para cada momento de tiempo (eje X). Las constantes cinéticas son las siguientes: $k_a = 7,75E+04 \pm 297$, $k_d = 7,20E-05 \pm 8,48E-06$, $K_D = 9,3E-10$, $\chi^2 = 1,97$.

10 **Figura 7:** Reactividad de ST3232/10 en tejidos tumorales y normales humanos. Como ejemplo, los resultados de inmunohistoquímica en carcinoma de colon y pulmón (paneles A y C, respectivamente) se muestran en comparación con sus homólogos normales (paneles B y D, respectivamente). Los tejidos tumorales humanos se tiñen fuertemente de marrón.

15 **Figura 8:** Trasplante alogénico en ratones sin pelo y tratamiento con ST3232/10 en comparación con edrecolomab (Panorex®). La línea celular de fibrosarcoma L murino, transfectado (L/Trop-1) o sin transfectar (L/vector) con Trop-1 humana, se inyectó subcutáneamente en ratones sin pelo. El día del inóculo, los animales se trataron con 200 µg de ST3232/10 (L/vector+ST3232 y L/Trop-1+ST3232), edrecolomab (L/Trop-1+Panorex) o IgG murina sin relacionar (L/vector y L/Trop-1). Se realizaron otras tres administraciones en el día 7, 15 y 22 como se indica por las flechas. La progresión del tumor se monitorizó hasta el día 50.

20 **Figura 9:** Trasplante xenogénico en ratones sin pelo y tratamiento con ST3232/10 en comparación con anticuerpo M104. La línea celular de carcinoma de colon humano KM12-SM, que expresa nativamente Trop-1, se trasplantó subcutáneamente en ratones sin pelo. A partir del día del inóculo se realizaron cuatro tratamientos, una vez a la semana, con 200 µg de ST3232/10 (grupo de ST3232), M104 (grupo de M 104) o el vehículo (grupo de control). La progresión del tumor se monitorizó hasta el día 30.

Procedimientos

Células de hibridoma

30 Con el fin de generar un nuevo clon de células de hibridoma contra EpCAM, ratones Balb/c se inmunizaron con la línea celular de fibrosarcoma L murino (Alberti S y col., 1988) establemente transfectada con la molécula EpCAM humana (NCBI RefSeq NM_002354). Los esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron a células de mieloma Sp2/0Ag14 por procedimiento convencional (Cianfriglia M. y col., 1986) y la población de hibridomas se cribó por citofluorometría en líneas celulares tumorales que expresan EpCAM tales como HT29. Se clonaron hibridomas específicos para EpCAM por dilución limitante dos veces en medio que contenía SBF y cuatro veces en medio sin proteínas (Animal Derived Component Free Medium HyClone, HyQRPerbio). Uno de los clones positivos derivados de la cuarta dilución limitante se llamó cST3232 y fermentó en minibioreactor. La estabilidad de la línea celular cST3232 fue el 98,65%. Por tanto, un clon positivo, cST3232/10, se seleccionó y se amplificó para el posterior desarrollo.

Anticuerpo

45 ST3232/10 es una inmunoglobulina de ratón de isotipo IgG1/k como se ha determinado por un kit comercial (Roche, Alemania). La región variable de cadena ligera kappa se amplificó a partir de ADNc circularizado usando un par de cebadores (5'-TGTCAAGAGCTTCAACAGGA-3' (SEC ID N°: 13), 5'-AAGATGGATACAGTTGGTGC-3' (SEC ID N°: 14) que se hibridan con la región constante del anticuerpo como se describe en M. Sassano y col. (1994).

50 La región variable de cadena pesada gamma se amplificó a partir de ADNc circularizado usando los cebadores oligonucleótido γ lCH1 de ratón 5'-ATGGAGTTAGTTGGGCAGCAG-3' (SEC ID N°: 15) y el oligonucleótido γ lCH3 de ratón 5'-GCACAACCACCATCTGAGAAG-3' (SEC ID N°: 16) que se hibridan con la región constante del anticuerpo como se describe en M. Sassano y col. (1994).

55 La PCR se realizó usando las siguientes condiciones: 40 s a 94°C, 40 s a 62°C, 1 min a 72°C durante 30 ciclos.

60 Los fragmentos amplificados se clonaron directamente en el vector de clonación PCRII usando el promotor PCRII dual del kit de clonación TA (Invitrogen, nº K2050-01). Se secuenciaron nueve clones que contenían la cadena ligera kappa y 7 clones que contenían regiones variables de cadena pesada gamma. La secuenciación se llevó a cabo en MWG Biotech, Alemania. Ambas cadenas se secuenciaron. No se encontraron ambigüedades.

Ánalisis por SDS-PAGE

El anticuerpo se ejecutó sobre un gradiente del 4-12% de Bis Tris NuPAGE con 1x MES como tampón de electroforesis y se tiñó con disolución de Coomassie (todos los reactivos de Invitrogen, EE.UU.) bajo condiciones no reductoras y condiciones reductoras.

Perfil cromatográfico

Se ejecutó ST3232/10 en una columna TSGK3000 (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania) a la velocidad de flujo de 1 ml/min con PBS + 0,05% de NaN₃ como tampón de electroforesis.

5 Transfección de células

La transfección con Trop-1 o Trop 2 se realizó según Alberti S y col., 1988.

10 Análisis por FACS

La unión del anticuerpo ST3232/10 a moléculas Trop-1 nativas sobre la superficie de células se analizó por citometría de flujo en un panel de líneas celulares humanas. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con fondo en V, en dos etapas usando aproximadamente 3·10⁵ células por pocillo. Las suspensiones de células se incubaron primero con 1 µg/pocillo de anticuerpo ST3232/10; luego con 2 µl de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE (550589, BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica). Las células se incubaron durante 30 min a 4°C para cada etapa, y se lavaron con PBS que contenía 1% de SBF. Después del lavado final, las células se resuspendieron en PBS para la adquisición y el análisis usando un instrumento FACSArray con software dedicado (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Como controles se usaron otros anticuerpos Trop1, Trop2 o irrelevantes y a las muestras se añadió 7-AAD (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) (5 µl/10⁶ células) para la tinción de vitalidad.

20 Microscopía confocal

25 La línea celular de tumor de mama MCF7 se tiñó con ST3232/10 marcado con Alexafluor-488 y se analizó por microscopía confocal. Las células MCF7 se sembraron en cubreobjetos de 15 x 15 mm y se fijaron después de 48 h por incubación en PBS / 4% de paraformaldehído durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la permeabilización durante 30 min a temperatura ambiente en SM (10% suero en PBS) con 0,05% de saponina, el anticuerpo primario (1 µg de ST3232-Alexa488 por portaobjetos) se incubó 30 min a temperatura ambiente en SM+saponina. Después de 3 lavados en SM, los portaobjetos se montaron para la observación por microscopía confocal.

30 ELISA celular

35 Una placa de 96 pocillos se bloqueó inicialmente con 200 µl/pocillo de 1x PBS, 10% de SBF durante 30 minutos a 37°C y luego se sembró con 250.000 células/pocillo más el anticuerpo primario en un volumen total de 100 µl. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se lavó tres veces con 1x PBS, 1% de SBF por centrifugación a 2000 rpm durante unos pocos segundos. Un anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A2429, dilución 1/1000), se añadió al complejo anticuerpo primario-célula y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego, después de cinco lavados, se añadieron 200 µl de sustrato pNpp (Sigma A3496) a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a 37°. La placa se centrifugó finalmente y 170 µl de sobrenadante se transfirieron a una nueva y se leyeron a 405 nm con un espectrofotómetro de ELISA (SEAC Sirio S).

Resonancia de plasmones de superficie

45 La afinidad de ST3232/10 por EpCAM se evaluó por resonancia de plasmones de superficie (SPR, Biacore X, Biacore, Uppsala, Suecia) inmovilizándose sobre un chip CM5 el dominio extracelular de la proteína de fusión químérica comercialmente disponible Fc-EpCAM (R&D, EE.UU.). Las curvas obtenidas inyectando ST3232/10 en un intervalo de concentración de 500-7,8 nM se evaluaron por medio del modelo bivalente (software BIAevaluation, v. 3.1, Biacore, Uppsala, Suecia).

50 Inmunohistoquímica

55 Secciones congeladas de los laboratorios TRISTAR Technology (EE.UU.) con 35 secciones de cáncer de pulmón y 10 de pulmón normal (nº de cod. 49561006), 35 de cáncer colorrectal y 10 de colon normal (nº de cod. 49561004), 35 de cáncer de ovario y 10 normales (nº 49561006) y portaobjetos con tejido normal (nº de cod. 49561001) se utilizaron para el estudio de selectividad. ST3232/10 se diluyó a 5 µg/ml en disolución de bloqueo (PBS + 2,5% de suero de caballo normal). El control negativo del mismo isótipo se usó en portaobjetos réplica a la misma concentración de los artículos de prueba.

60 Los portaobjetos se procesaron según la instrucción del fabricante y la unión a anticuerpo se reveló por el uso del kit Vectastain ABC Elite, kit de cod. PK6102 (Vector Laboratories). Después de la hidratación de tejido, la extinción de la peroxidasa endógena se realizó por inmersión del portaobjetos en 0,3% de disolución de hidrógeno-peroxidasa durante 5 minutos. Después de lavar en PBS durante 5 minutos x 3 veces y bloquear la sección con PBS + 2,5% de suero normal de caballo, el anticuerpo primario diluido en disolución de bloqueo a 5 µg/ml se añadió durante 2 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo secundario de cabra conjugado con anti-biotina de ratón durante 30 minutos y luego con el complejo de avidina-biotina-peroxidasa

durante 30 minutos. Después del lavado adicional, los portaobjetos se incubaron en disolución de DAB fresca en el kit de sustrato Vector® DAB/Ni (Cat. SK-4100) durante 2 minutos y la reacción se detuvo en agua de grifo. La contratinación se hizo por inmersión en hematoxilina de Meyer durante 10 segundos. Finalmente, los portaobjetos se deshidrataron en 75%, 80%, 95% y 100% de etanol durante 1 min cada uno, se limpiaron en xileno y se montaron permanentemente con montante sintético y se observaron con microscopio.

5 Modelo *in vivo*: alotransplante en ratones atípicos sin pelo

10 La línea celular de fibrosarcoma L murina, transfectada con Trop-1 (L/Trop-1) o sin transfectar (L/vector) con Trop-1 humano, se inyectó subcutáneamente en tres grupos de ratones atípicos sin pelo (10 animales/grupo). El día del inóculo, los animales se trataron con 200 µg de ST3232/10 (L/vector+ST3232 y L/Trop-1+ST3232), edrecolomab (L/Trop-1+Panorex) o IgG murina sin relacionar (L/vector y L/Trop-1). Otras tres administraciones se realizaron en el día 7, 15 y 22 como se indica por las flechas. En todos los grupos, el crecimiento tumoral se evaluó por mediciones con compás calibrador hasta el día 50.

15 Modelo *in vivo*: xenotrasplante de una línea celular colorrectal humana

20 La línea celular de carcinoma de colon humano KM12-SM, que expresa nativamente Trop-1, se trasplantó subcutáneamente en ratones sin pelo. Se realizaron cuatro tratamientos, una vez a la semana, con 200 µg de ST3232/10 (grupo de ST3232), M104 (grupo de M104) o el vehículo (grupo de control) empezando en el día del inóculo. La progresión tumoral se monitorizó hasta el día 30.

Resultados

25 La secuencia de regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada variable (VH) de ST3232/10 y de regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera variable (VL) se muestra en la Tabla I.

Tabla I: Secuencias de regiones determinantes de la complementariedad de VH y VL del anticuerpo ST3232/10.

	Secuencias de nucleótidos	Secuencias de aminoácidos
Cadena pesada	AGCGGTTATTACTGGAAC (SEC ID 1)	
CDR1		S G Y Y W N (SEC ID 2)
CDR2	TATATAAGTTACGACGGTAGGAAT AAGTACAACCCATATCTCAAAAAT (SEC ID 3)	Y I S Y D G R N K Y N P Y L K N (SEC ID 4)
CDR3	GCCCTCGGGGGGGATTACGATGCT TTGGACTGC (SEC ID 5)	A L G G D Y D A L D C (SEC ID 6)
Cadena ligera variable		
CDR1	AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCC AGTCAGAGTCTGTTAACAGTAGA AGTCAAAAGAACTACTTGACC (SEC ID 7)	K V T M S C K S S Q S L L N S R S Q K N Y L T (SEC ID 8)
CDR2	TGGGCATCCACTAGGGAATCT (SEC ID 9)	W A S T R E S (SEC ID 10)
CDR3	CAGAATGATTATATTATCCGCTC ACG (SEC ID 11)	Q N D Y I Y P L T (SEC ID 12)

30 ST3232/10 demostró ser homogéneo para la composición de cadenas ligeras y pesadas como se muestra por análisis de SDS-PAGE y el perfil cromatográfico (Fig. 1 y 2). De hecho, el anticuerpo se ejecutó por triplicado en un

gradiente del 4-12% de Bis Tris NuPAGE con 1x MES como tampón de electroforesis y se tiñó con disolución de Comassie (todos los reactivos de Invitrogen, EE.UU.). Bajo condiciones no reductoras (bandas 1-3) mostró una banda del peso molecular esperado (150 KDa). Bajo condiciones reductoras (bandas 4-6) sólo las dos bandas correspondientes a las cadenas pesada (50 KDa) y ligera (25 KDa) fueron visibles, mostrando así ausencia de otros productos contaminantes. Estos hallazgos se confirmaron por el perfil cromatográfico en el que se observa un único pico homogéneo eluido de ST3232/10 ejecutado en una columna TSGK3000 (Fig. 2).

La especificidad de ST3232/10 para los miembros de la familia EpCAM se evaluó por análisis de FACS en una línea celular murina que no expresa el antígeno, transfectado con EpCAM (TROP-1) o la molécula TROP2 de alto homólogo. Como se muestra en la Fig. 3, ST3232/10 es específico hacia EpCAM ya que sólo reaccionó con células positivas para Trop-1 (panel A) y no células negativas para Trop-1 como linfocitos L (panel G) o células L-Trop2 (panel D). Se observó un resultado similar con otros anticuerpos específicos para EpCAM (paneles B, E, H: M104; C, I: HT29/26). Se usó anticuerpo T16 como control positivo en células TROP2-L (panel F).

Además, ST3232/10 tiene actividad de unión comparable a otros anticuerpos contra EpCAM tales como M104 (Klein C.E. y col., 1990). Su reconocimiento eficiente del antígeno nativo se ha demostrado por un estudio citofluorimétrico en un panel de líneas de células cancerosas en el que se observaron diferentes niveles de la molécula EpCAM (Tabla II). Se usó anticuerpo T16 como control positivo en células TROP2-L (panel F).

Tabla II: Resultados de FACS obtenidos en un panel de líneas celulares tumorales de diverso origen usando ST3232/10 o el anticuerpo anti-TROP-1 M104.

Línea celular (ATCC No.)	Tipo de tumor	ST3232/10	M104
HT 29 (HTB-38)	carcinoma de colon	++++	++++
Lo Vo (CCL-229)	"	++++	++++
COLO320DMF	"	nd	-
SW 620 (CCL-227)	"	++++	++++
CACO-2 (HTB-37)	"	++++	++++
LS 174T (CL-188)	"	++++	++++
KB 3-1 (amablemente proporcionado por Dr. Cianfriglia, ISS, Italia)	car. nasofaríngeo	++++	++++
SKBR-3 (HTB-30)	cáncer de mama	++++	nd
MDA-MB-231 (HTB-26)	"	++	nd
MDA-MB-468 (HTB-132)	"	+	nd
MCF10-2A (CRL-10781)	"	++++	nd
MCF7 (HTB-22)	"	++	++
SKOV-3 (HTB-77)	carc. de ovario	+	nd
NIH:OVCAR3 (HTB-161)	"	++++	++++
IGROV-1 (Tumor National Inst., Italia)	"	-	-
SKMEL28 (HTB-72)	melanoma	-	nd
U-118 MG (HTB-15)	glioblastoma	-	nd

++++ 100% positivos, ++ > 90% positivos, + > 50% positivos, + > 20% positivos, +/- < 15% positivos, - negativo, nd = no determinado

La línea celular de tumor de mama MCF7 se tiñó con ST3232/10 marcado con Alexafluor-488 y se analizó por microscopía confocal (Fig. 4). El conjugado de Alexa488-ST3232/10 muestra el patrón de tinción esperado, con la mayor intensidad en los bordes célula-célula, y la tinción de parches aislados (en la Fig. 4A y B se muestran dos ejemplos).

La inmunorreactividad de ST3232/10 se evaluó por ELISA celular en comparación con otros anticuerpos anti-EpCAM disponibles en líneas celulares tumorales que expresan naturalmente EpCAM o transfectadas con el transcripto humano. Como un ejemplo, el ELISA celular en la línea celular de carcinoma de colon humano HT29 de anticuerpos anti-EpCAM ST3232/10 y HT29/26 (Klein CE y col., 1990) se muestra en la Fig. 5. ST3232/10 puede unirse a EpCAM naturalmente expresado en células HT29 en una forma dependiente de dosis. En este ensayo, HT29/26 parece que se une a EpCAM con mayor afinidad que ST3232/10 como lo hacen otros anticuerpos (datos no mostrados).

La afinidad de ST3232/10 por EpCAM se evaluó por resonancia de plasmones de superficie (SPR). Las curvas obtenidas inyectando ST3232/10 en un intervalo de concentración de 500-7,8 nM se evaluaron por medio de un modelo bivalente (Fig. 6A) y muestran un ajuste de buena calidad como se confirmó por χ^2 (1,97) y varianzas residuales <10% del mayor valor de UR (140) registradas en el experimento (Fig. 6B). K_D de ST3232/10 produjo 9,3E-10 ($k_{as} = 7,75E+04 \pm 297$; $k_{dis} = 7,2E-05 \pm 8,48E-06$). La afinidad de ST3232/10 para EpCAM es 274 veces superior a la afinidad evaluada por SPR mostrada por edrecolomab (K_D 2,55E-07, Naundorf y col., 2002), mientras que no está disponible información de la afinidad para otros anticuerpos anti-Trop-1 conocidos en la bibliografía.

Con respecto a la internalización de ST3232/10, se realizó una prueba de FACS incubando el anticuerpo con una

línea celular que expresa EpCAM a 4°C y luego poniendo el complejo a 37°C en un intervalo de tiempo de 30-120 minutos. No se observaron diferencias en el porcentaje de células positivas o en la intensidad de fluorescencia media de las muestras incubadas a 37°C con respecto a la muestra de control a 4°C (Tabla III), indicando así la falta de internalización del complejo EpCAM/anticuerpo.

5

Tabla III: Evaluación de la internalización de ST3232/10 en línea celular LoVo.

	% de parental positivo	MFI
4°C (control)	98,5	3959
30' a 37°C	99,2	4182
60' a 37°C	98,1	4092
120' a 37°C	98,2	4149

La selectividad de ST3232/10 se investigó por inmunohistoquímica en secciones de micromatriz de tejido representativas de varios tumores sólidos y tejidos normales. Los resultados se resumen en las Tablas IV y V y los ejemplos se muestran en la Fig. 7.

10

Tabla IV: Reactividad de ST3232/10 en tumores

	Nº de casos	Positivos (%)
Pulmón	32	19 (59,3%)
Colon	34	32 (94,1%)
Ovario	35	31 (88,6%)
Total de tejidos examinados	101	82 (81,2%)

Tabla V: Reactividad de ST3232/10 en tejidos normales

	Nº de casos	Positivos (%)
Pulmón	8	1 (12,5%)
Colon	8	5 (62,5%)
Ovario	8	0 (0%)
Total de tejidos examinados	24	6 (25,0%)

15

Los portaobjetos de tumor criostático de tipos de cáncer sólido de alta incidencia (Tabla IV) se evaluaron en comparación con portaobjetos derivados de órganos normales del mismo histotipo (Tabla V). ST3232/10 puede unirse a casi todas las muestras probadas de carcinoma de colon (94,1%) y ovario (88,6%) y a la mayoría de los portaobjetos de carcinoma de pulmón (59,3%). La selectividad de ST3232/10 hacia células cancerosas fue muy alta para especímenes de ovario en los que ninguno de los tejidos normales reaccionó con el anticuerpo, mientras que el 88,6% de las muestras tumorales fueron positivas para ST3232. Además, ST3232/10 reaccionó con mayor incidencia y tinción más fuerte para cáncer frente a células normales en los otros tipos de tumor. La selectividad para tumores de colon y pulmón frente a tejidos normales se muestra en la Fig. 7, con reacción claramente positiva en tejidos tumorales que expresan EpCAM en exceso y tinción negativa de tejidos normales.

20

para especímenes de ovario en los que ninguno de los tejidos normales reaccionó con el anticuerpo, mientras que el 88,6% de las muestras tumorales fueron positivas para ST3232. Además, ST3232/10 reaccionó con mayor incidencia y tinción más fuerte para cáncer frente a células normales en los otros tipos de tumor. La selectividad para tumores de colon y pulmón frente a tejidos normales se muestra en la Fig. 7, con reacción claramente positiva en tejidos tumorales que expresan EpCAM en exceso y tinción negativa de tejidos normales.

25

Se usaron dos modelos animales diferentes para explorar la actividad de anticuerpos *in vivo* en el crecimiento celular tumoral. En el primer experimento, tres grupos de ratones atípicos sin pelo (10 animales/grupo) se trasplantaron subcutáneamente (s.c.) con la línea celular de hTrop-1 de fibrosarcoma L murino y se trataron con ST3232/10, edrecolomab o IgG murina sin relacionar una vez a la semana (200 µg/ratón) durante 4 semanas, a partir del día del inóculo. Los linfocitos L no transfectados con EpCAM se trasplantaron en dos grupos adicionales y los animales se trataron con ST3232/10 o anticuerpo de control. Como se muestra en la Fig. 8, el tumor que expresa EpCAM (L/Trop) tuvo un desarrollo más rápido cuando se comparó con los tumores sin transfectar (L/Vector o L/Vector + ST3232). Además, ST3232/10 inhibió completamente y permanentemente el crecimiento del tumor que expresa EpCAM y no interfirió con el crecimiento del tumor negativo para EpCAM. Por otra parte, edrecolomab (Panorex) también alteró el crecimiento del tumor que expresa EpCAM. Sin embargo, el tumor creció rápidamente tras la suspensión del tratamiento con edrecolomab.

30

Un segundo modelo animal de ratones sin pelo xenotrasplantados con una línea celular colorrectal humana, KM12SM, se usó para extender y confirmar los resultados previos. Los ratones se trataron con ST3232/10, IgG murina y otro anticuerpo anti-EpCAM, M104, con dosis y programa idéntico al del experimento previo (Tabla VI, Fig. 9). Como indica la Tabla VI, la tasa de tumor en el grupo tratado con ST3232/10 fue inferior (56%) a la de los otros dos grupos (90-100%).

35

Un segundo modelo animal de ratones sin pelo xenotrasplantados con una línea celular colorrectal humana, KM12SM, se usó para extender y confirmar los resultados previos. Los ratones se trataron con ST3232/10, IgG murina y otro anticuerpo anti-EpCAM, M104, con dosis y programa idéntico al del experimento previo (Tabla VI, Fig. 9). Como indica la Tabla VI, la tasa de tumor en el grupo tratado con ST3232/10 fue inferior (56%) a la de los otros dos grupos (90-100%).

40

Tabla VI: Tasa de diseminación tumoral

	Tasa de diseminación tumoral (%)
Controles	100
M104	90
ST3232/10	56

Además, como muestra la Fig. 9, ST3232/10 redujo el crecimiento tumoral y aumentó la latencia para desarrollar tumor en comparación con los otros grupos. Estos resultados soportan la hipótesis de un efecto terapéutico directo de ST3232/10 distinto de una simple unión a la molécula diana.

5 Referencias

- Alberti S y col, 1988, PNAS 85: 8391-8394
 Burak WE Jr y col., 2001, Tumori 87: 142-146
 Cianfriglia M. y col., 1986, Methods Enzymol. 121: 193210
 10 De Bono JS y col., 2004, Clin Cancer Res 10: 7555-7565
 Di Massimo A.M. y col., 1997, Br J Cancer 75: 822-828
 Ferrer C. y col., 1996, J. Biotechnol. 52: 51-60
 Frodin JE y col., 2002, Hybrid Hybridomics 21: 99-101
 15 Goshorn S y col., 2001, Cancer Biot Radiopharm 16: 109-123
 Klein CE y col., 1990, J Invest Dermatol 95: 74-82.
 Naundorf S y col., 2002, Int J Cancer 100: 101-110
 Oberneder R y col., 2006, Eur J Cancer 42: 2530-8
 Old, LJ, 1996, Sci Am 275: 136-143
 20 Paganelli y col., 1999, Eur J Nucl Med 26: 348-357
 Parente D. y col., 1997, Anticancer Research 17: 4073-4074
 Paul, W. E., Fundamental Immunology, Raven Press, NY, N.Y. 1993, capítulo 23
 Penichet ML. y col., 1999, J. Immunol, 163: 4421-4426
 Prang N y col., 2005, Br J Cancer 92: 342-9
 25 Punt CJ y col., 2002, Lancet 360: 671-7
 Riethmuller G y col., 1998, J Clin Oncol 16: 1788-1794
 Sassano y col., 1994, Nucleic Acids Res 22: 1768-1769
 Spizzo G y col., 2004, Breast Cancer Res Treat 86: 207-213
 Velders y col., 1998, Br J Cancer 78: 478-483
 30 Weiner LM y col., 1993, J Immunother 13: 110-116
 Went y col., 2006, Br J Cancer, 94: 128-35
 Winter MJ y col., 2003, AJP 163: 2139-2148

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A ANASTASI, Anna Maria PETRONZELLI, Fiorella DE SANTIS, Rita

<120> Anticuerpo anti-EpCAM y usos del mismo

<130> PCT 102485

5 <150> EP07105628.7
<151> 2007-04-04

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 VH sintético

15 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 1
 agc ggt tat tac tgg aac
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5
 18

20 <210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 2
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5
 18

25 <210> 3
<211> 48
 30 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> CDR2 VH sintético

<220>
 35 <221> CDS
<222> (1)..(48)

<400> 3
 tat ata agt tac gac ggt agg aat aag tac aac cca tat ctc aaa aat
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 48

40 <210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 4

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn	1 5 10 15
---	-----------

5 <210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR3 VH sintético

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 5

gcc ctc ggg ggg gat tac gat gct ttg gac tgc	33
Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys	1 5 10

15 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 6

Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys	1 5 10
---	--------

25 <210> 7
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 VL sintético

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(69)

<400> 7

aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta aac agt aga	48
Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg	1 5 10 15

agt caa aag aac tac ttg acc

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr	69
20	

35 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 8

Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr
 20

<210> 9

<211> 21

5 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> CDR2 VL sintético

<220>

10 <221> CDS
 <222> (1)..(21)

<400> 9

tgg gca tcc act agg gaa tct
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

21

<210> 10

<211> 7

15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 11

<211> 27

25 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 VL sintético

<220>

30 <221> CDS
 <222> (1)..(27)

<400> 11

cag aat gat tat att tat ccg ctc acg
 Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr

27

1

5

<210> 12

<211> 9

35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 13
<211> 20
5 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 13
10 tgtcaagagc ttcaacagga 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 14
aagatggata cagttggtgc 20

<210> 15
20 <211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

25 <400> 15
atggagttag ttggggcagc ag 22

<210> 16
<211> 22
30 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 16
gcacaaccac catactgaga ag 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-EpCAM o un derivado funcional del mismo en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen la secuencia de SEC ID Nº 2; SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 6 y en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen la secuencia SEC ID Nº 8; SEC ID Nº 10 y SEC ID Nº 12.
- 10 2. El anticuerpo anti-EpCAM o derivado funcional del mismo según la reivindicación 1 que puede inhibir completamente y permanentemente el crecimiento de tumores que expresan EpCam.
- 15 3. El anticuerpo anti-EpCAM según la reivindicación 2 que es un anticuerpo monoclonal, un fragmento scFv, Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, un anticuerpo multimérico, un péptido o un fragmento proteolítico que contiene la región de unión a epítope, o anticuerpo quimérico, fusionado con otra proteína o ligado a un agente o un marcador; o un anticuerpo humano o humanizado.
- 20 4. El anticuerpo anti-EpCAM según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal se produce por la línea celular de hibridoma depositada según el Tratado de Budapest en el Centro de Biotecnología Avanzada, Génova, Italia, con el nº PD06004, o en el que la proteína quimérica es un químera de ratón-ser humano o en el que la proteína de fusión comprende una citocina, una proteína de la familia de la avidina, biotina, biotina marcada u otras proteínas efectoras.
- 25 5. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o derivados funcionales del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes o que consiste en una secuencia degenerada del mismo.
- 30 6. El ácido nucleico según la reivindicación 5 que comprende al menos una de las siguientes secuencias: SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 11.
- 35 7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.
- 40 8. Una célula huésped aislada transformada con el vector de expresión según la reivindicación 7.
- 45 9. Una línea celular de hibridoma productora del anticuerpo anti-EpCAM según la reivindicación 1 a 4.
- 50 10. La línea celular de hibridoma según la reivindicación 9 que es el hibridoma depositado según el Tratado de Budapest en el Centro de Biotecnología Avanzada, Génova, Italia, con el nº PD06004.
- 55 11. El anticuerpo anti-EpCAM de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.
- 60 12. El anticuerpo anti-EpCAM de la reivindicación 11 para su uso como un medicamento antitumoral, en particular el tumor se selecciona del grupo de: carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga urinaria o carcinoma de pulmón.
- 65 13. Uso del anticuerpo anti-EpCAM de las reivindicaciones 1 a 4 en diagnósticos *in vitro*.
- 70 14. El anticuerpo anti-EpCAM de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en diagnósticos *in vivo*.
- 75 15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o derivados del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 80 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para radioinmunoterapia.
- 85 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 ó 16 que comprende, en la misma dosis unitaria o por separado, al menos otro anticuerpo específico para tumor, en particular el anticuerpo específico para tumor es un anticuerpo contra EpCAM diferente del anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 4.
- 90 18. Una composición soluble inyectable para diagnósticos tumorales *in vivo* que comprende el anticuerpo anti-EpCAM según la reivindicación 14.
- 95 19. Un procedimiento para inmunodetectar en una muestra un antígeno que puede unirse al anticuerpo o derivado del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la etapa de incubar en condición apropiada la muestra con el anticuerpo o derivado del mismo según las reivindicaciones 1 a 4 para obtener un inmunocomplejo, y detectar el inmunocomplejo.
- 100 20. Un kit de diagnóstico para el procedimiento según la reivindicación 19 que comprende un anticuerpo o derivado del mismo según la reivindicación 1 a 4 y medios de detección de inmunocomplejos.

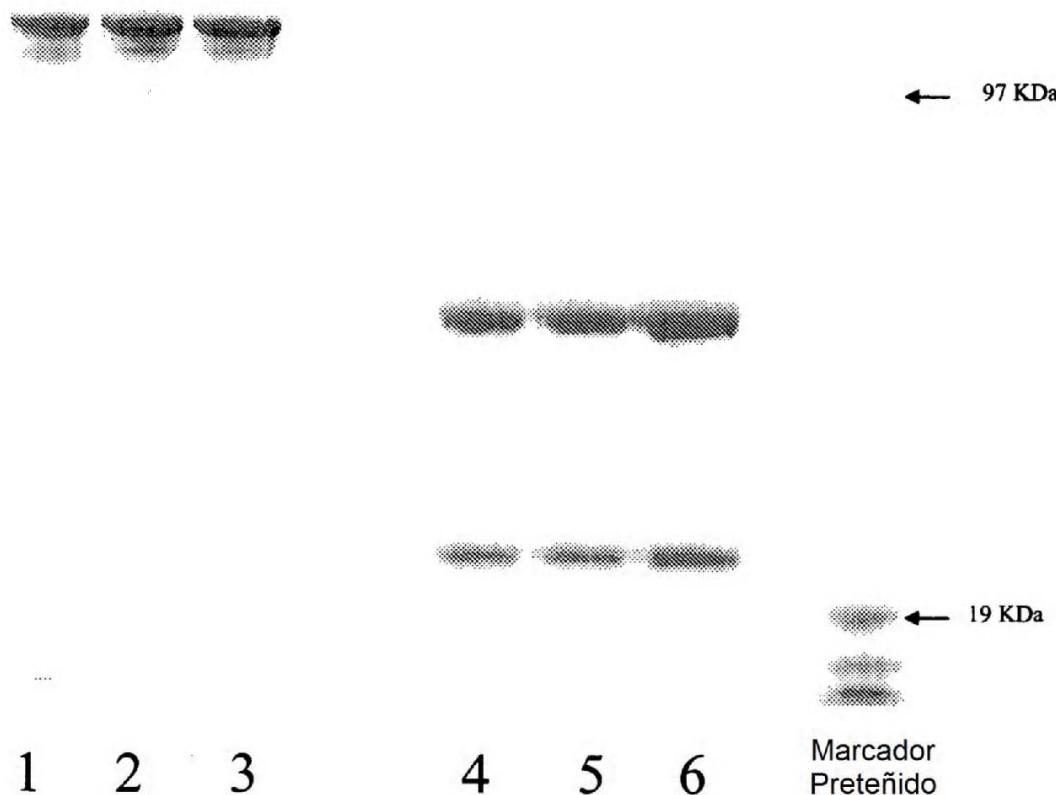


Fig. 1

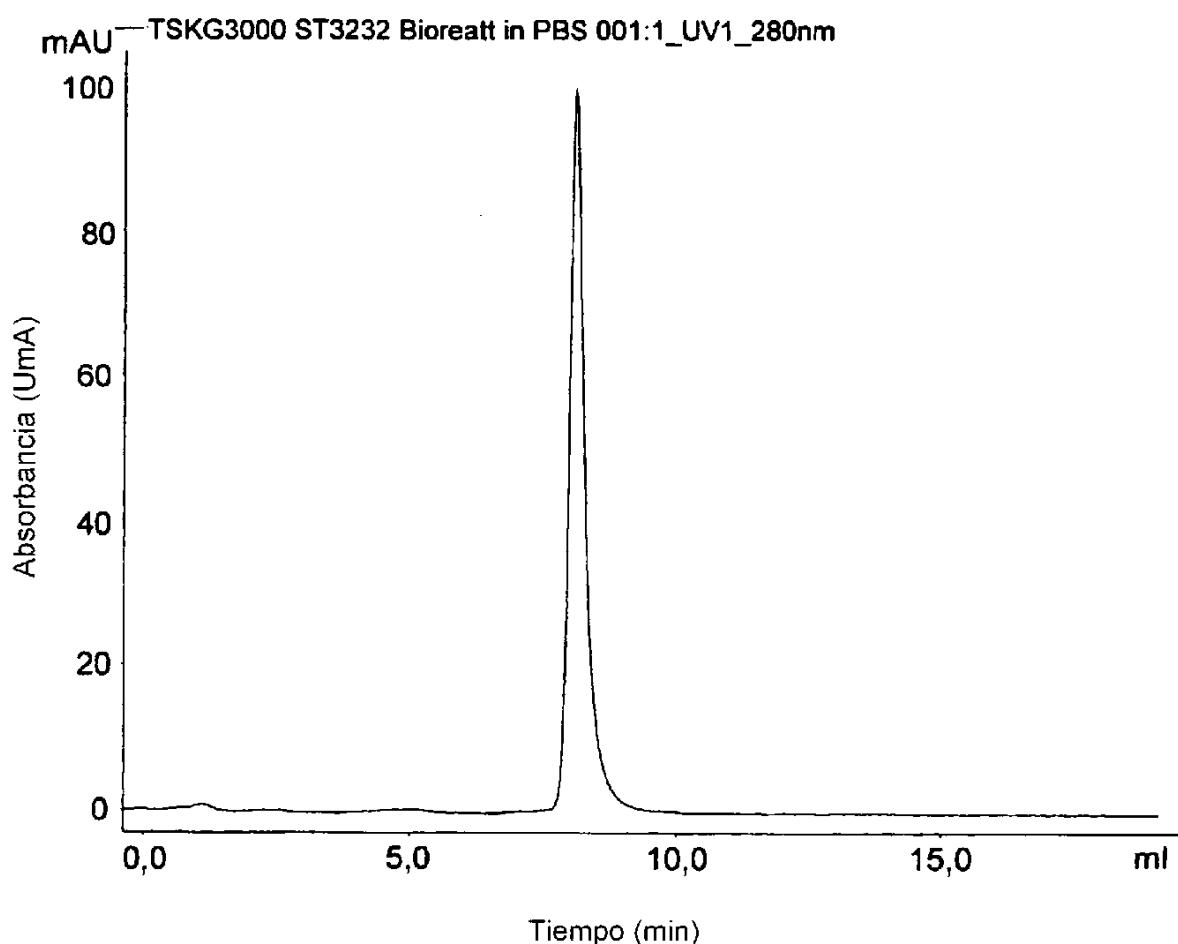


Fig. 2

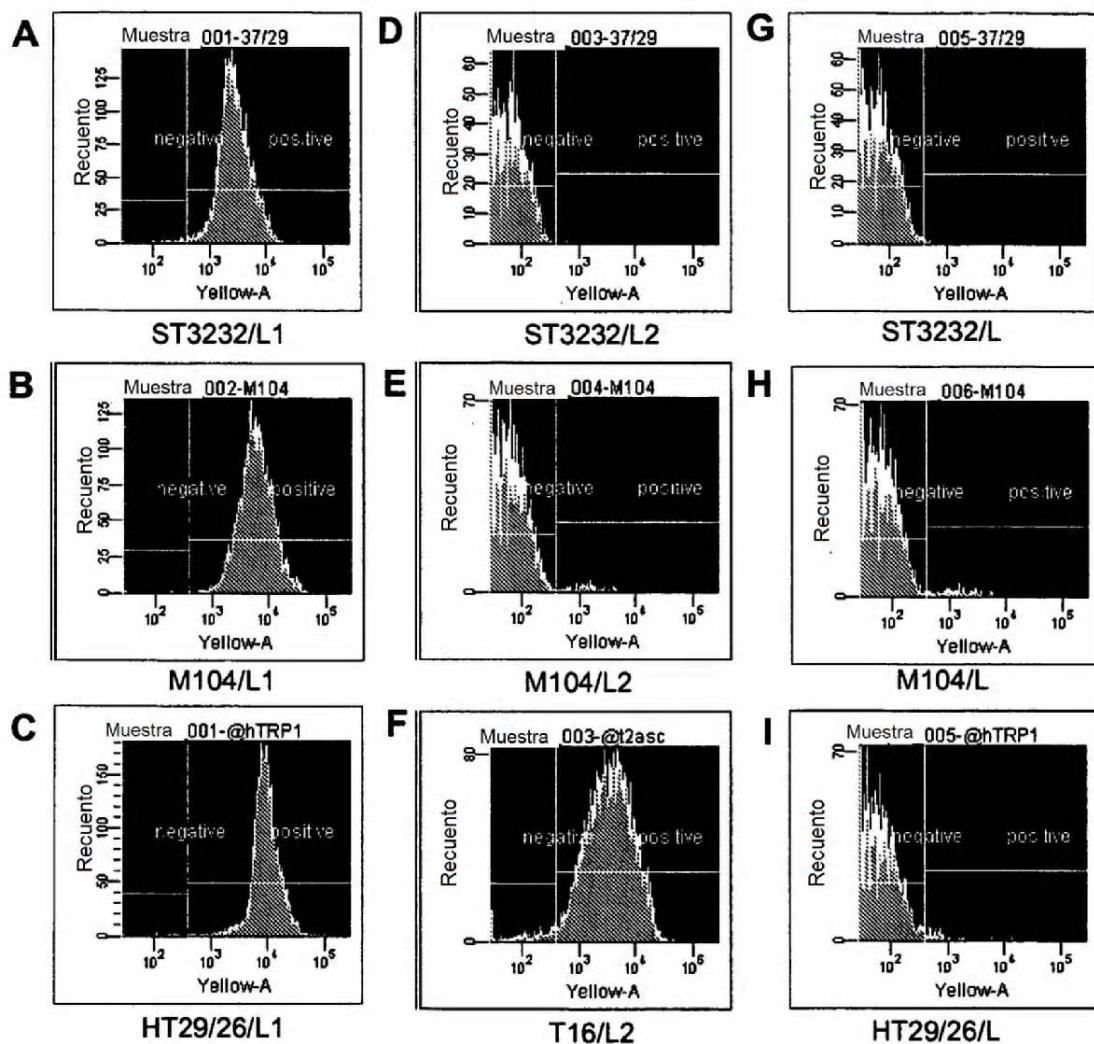


Fig. 3

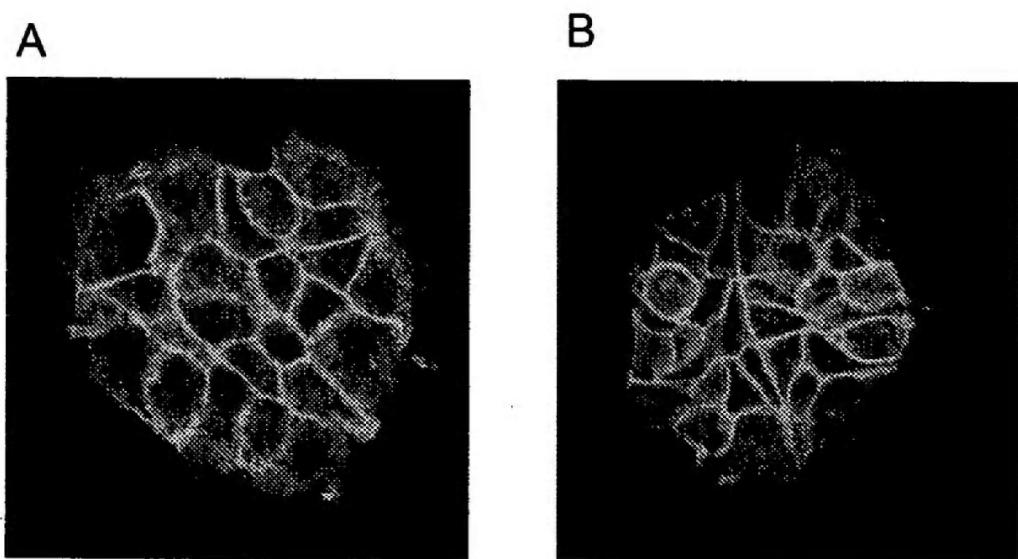


Fig. 4

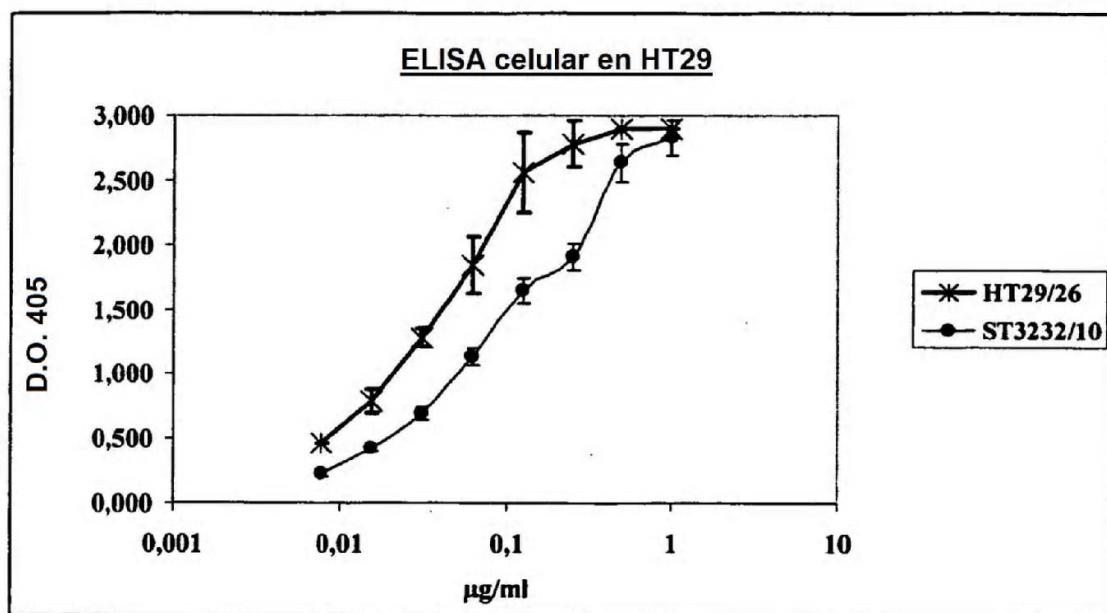


Fig. 5

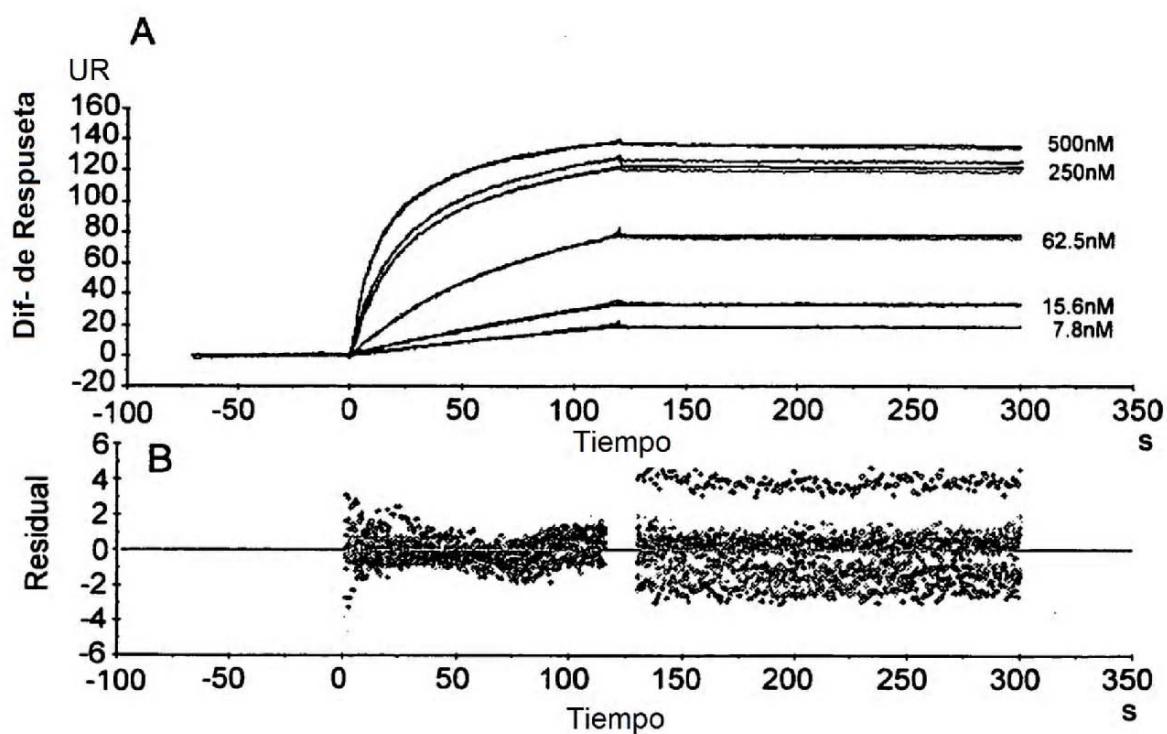


Fig. 6

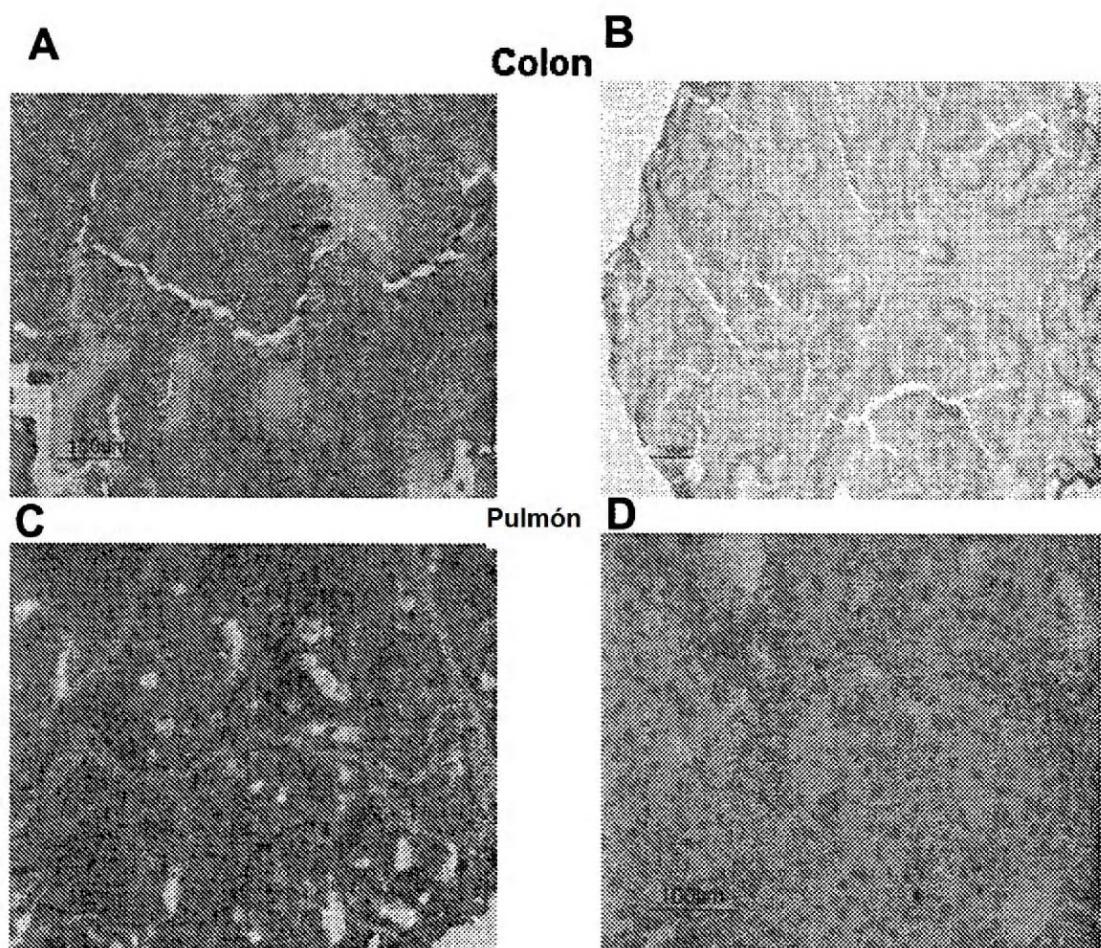
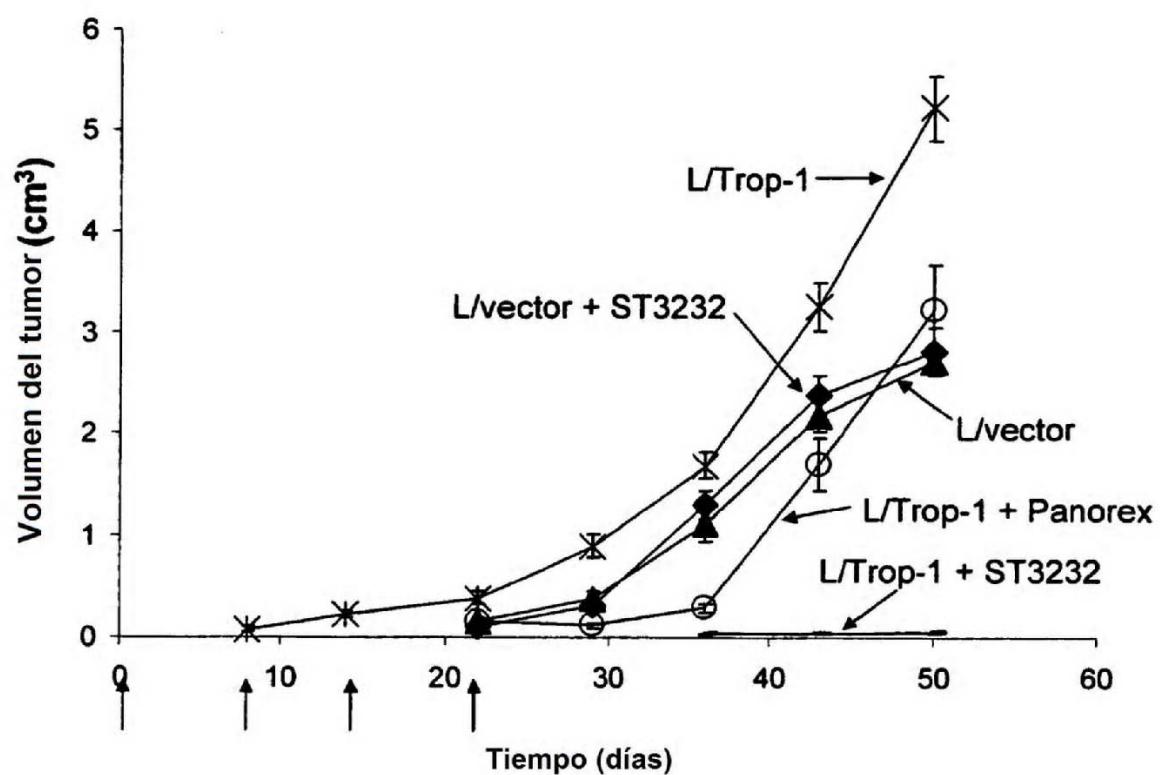


Fig. 7



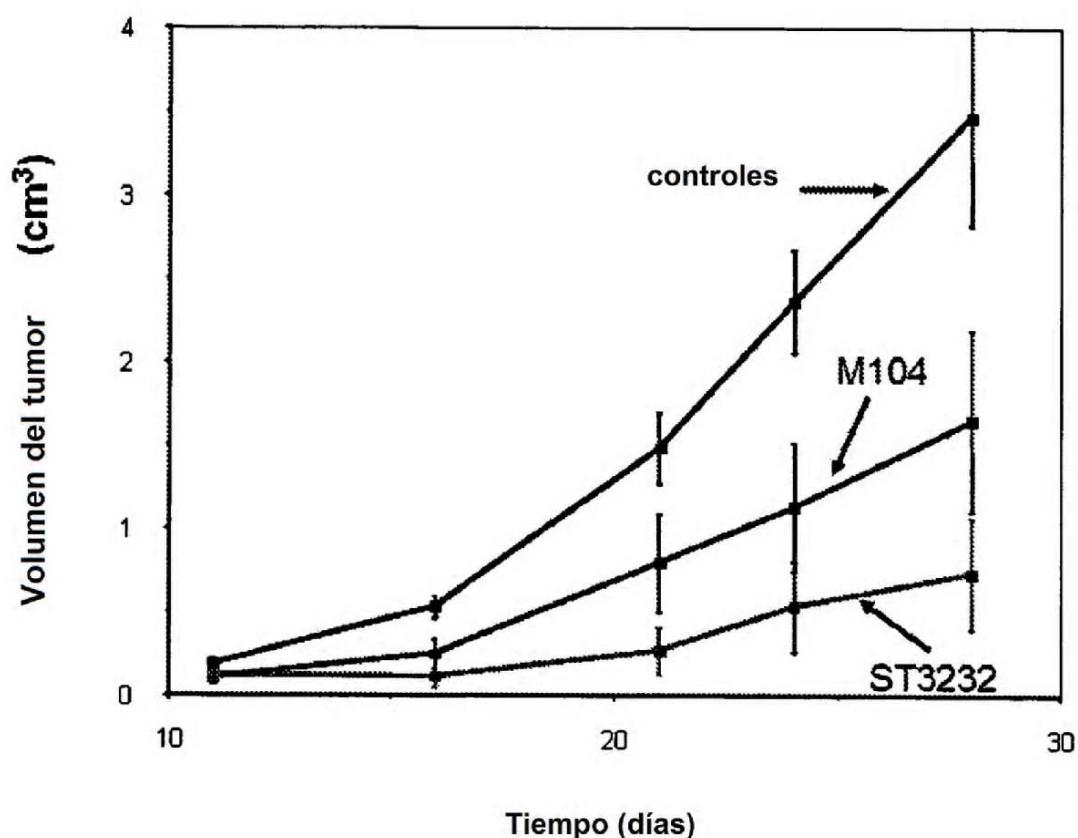


Fig. 9