

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 968**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2002 E 02772604 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1440152**

54 Título: **Ligando 5T4**

30 Prioridad:

02.11.2001 GB 0126378

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

22.11.2013

73 Titular/es:

**OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
MEDAWAR CENTRE, ROBERT ROBINSON
AVENUE, THE OXFORD SCIENCE PARK
OXFORD OX4 4GA, GB**

72 Inventor/es:

**CARROLL, MILES;
LAMIKANRA, ABIGAIL y
KINGSMAN, ALAN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 430 968 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

Ligando 5T4

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para la administración de agentes a células tumorales. En particular se refiere a un procedimiento para la administración específica de agentes al interior de las células tumorales. Los usos del procedimiento se describen también.

Antecedentes de la invención

- 10 Se ha identificado y caracterizado un número de antígenos oncofetales o asociados a tumores (TAA) en seres humanos y animales. En general, los TAA son antígenos expresados durante el desarrollo fetal que están regulados a la baja en células adultas y así están normalmente ausentes o presentes solamente a niveles muy bajos en adultos. Se ha observado que las células tumorales retoman la expresión de TAA y se ha sugerido por lo tanto la aplicación de TAA para diagnóstico, marcado como objetivo e inmunoterapia de tumores.

Algunos TAA se encuentra que están regularmente asociados con tumores en un gran número de individuos.

- 20 El TAA 5T4 (véase documento WO 89/07947) se ha caracterizado exhaustivamente. Es una glucoproteína de 72 kDa expresada ampliamente en carcinomas, pero que tiene un patrón de expresión altamente restringido en tejidos adultos normales (véase tabla 1). Esto parece estar fuertemente relacionado con metástasis en cáncer colorrectal y cáncer gástrico. Se conoce la secuencia de ácidos nucleicos de 5T4 humana (Myers y cols., 1994 J Biol Chem 169: 9319-24).

Tabla 1. Distribución de 5T4 humano

Tipo de tumor	Frecuencia de 5T4 (en %)
De mama	84
De ovario	71
Gástrico	74
Colorrectal	85

- 25 (Starzynska y cols., Eur J Gastroenterol Hepatol junio de 1998; 10 (6): 479-84; Starzynska y cols., Br J Cancer mayo de 1994; 69 (5): 899-902; Starzynska y cols., Br J Cancer noviembre 1992; 66 (5): 867-9).

- 30 El antígeno 5T4 se expresa en la superficie de las células. Asimismo cualquier ligando que se una al antígeno 5T4 está también restringido a la superficie de las células y por lo tanto aunque potencialmente útil como un marcador, o en diagnóstico, o en formación de imágenes de células tumorales, hasta la presente invención se piensa que tiene un uso pequeño en la administración de agentes al interior de células.

Sumario de la invención

- 35 Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que el antígeno 5T4 es capaz de internalización cuando está unido un anticuerpo de 5T4. Así, tras la unión de un anticuerpo de 5T4 al antígeno 5T4 tumoral de superficie, el complejo se internaliza. Esto proporciona un medio efectivo para la administración de agentes al interior de las células, en particular el citoplasma celular.

- 40 Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 unido a un agente citotóxico, que, una vez se internaliza al interior de una célula tumoral, ejerce uno o más efectos biológicos intracelulares, en el que el agente citotóxico comprende una molécula que afecta la estructura celular interaccionando con uno o más elementos citoesqueléticos.

- 45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un complejo de superficie celular de antígeno 5T4 y un anticuerpo tal de 5T4 unido a un agente.

- 50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un complejo internalizado de un anticuerpo tal de 5T4 unido a un agente.

- 55 En el contexto de la presente invención el término "efectos biológicos intracelulares" quieren decir que el agente afecta la estructura intracelular y/o la función intracelular. Alguien experto en la técnica apreciará que es el agente que ejerce efectos biológicos intracelulares, bien en aislamiento o cuando se combina con el anticuerpo de 5T4 de acuerdo con la presente invención.

El término "internalización" quiere decir internalización o movimiento dentro del interior de la célula, preferentemente del citoplasma. Asimismo un "complejo internalizado" es uno que se ha movido desde la superficie celular exterior al

interior de la célula.

5 El término "unión específica" en el contexto de la presente invención quiere decir que tal unión no está inhibida por la presencia de moléculas no relacionadas. Asimismo, el término un anticuerpo de 5T4 "específico" describe un anticuerpo que se une a 5T4 específicamente.

10 El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un péptido de anticuerpo o un anticuerpo biespecífico. Así, a modo de ejemplo, un anticuerpo puede incluir Fv, ScFv, Fab' y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos manipulados incluyendo anticuerpos quiméricos, CDR-injertado y anticuerpos humanizados, anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando presentación de fagos o técnicas o péptidos que se unen al antígeno tumoral de la superficie celular 5T4. Si el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico después puede ser capaz de unir al antígeno 5T4 y a un agente de acuerdo con la presente invención.

15 Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización alternativa de los aspectos anteriores de la invención, es un scFv. Preferentemente el scFv se deriva de un anticuerpo monoclonal. Ventajosamente, el anticuerpo es específico para 5T4 humano. En realizaciones especialmente preferidas de la invención, el anticuerpo es 5T4scFvmycHis (scFv derivado de monoclonal H8) y/o anticuerpo monoclonal H8.

20 El complejo puede formarse en la superficie de una célula bien *in vitro* o bien *in vivo*. En una realización especialmente preferida de este aspecto de la invención, el complejo se forma sobre la superficie de una célula *in vivo*.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 tal unido a un agente para usar en un procedimiento para la internalización de un anticuerpo de 5T4 unido a un agente en células tumorales tratando esas una o más células con un ligando 5T4 específico.

En una realización preferente de este aspecto de la invención, la internalización tiene lugar en el citoplasma de las células.

30 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se refiere al procedimiento de puesta en contacto de una o más células con un anticuerpo de 5T4 específico. Los procedimientos adecuados para "tratar" células dependerán de si el procedimiento se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro* y se describen en el presente documento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el procedimiento tiene lugar *in vivo*.

35 Preferentemente, las células tumorales son una o más seleccionadas del grupo constituido por: células tumorales de mama, células tumorales de ovario, células tumorales gástricas y células tumorales colorrectales.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 tal unido a un agente para usar en un procedimiento para la administración específica de uno o más agentes al interior de las células tumorales.

40 Ventajosamente, la administración específica es al citoplasma. En un aspecto preferido de la invención, el procedimiento se lleva a cabo *in vivo*. Es decir, es para la administración de agentes al interior de las células tumorales en un mamífero. Ventajosamente, el mamífero es un ser humano. Los anticuerpos adecuados son cualesquiera de aquellos descritos en el presente documento. Ventajosamente, el anticuerpo de 5T4 es 5T4scFvmycHis y/o H8 como se describe en el presente documento.

45 En el contexto de la presente invención, el término administración "específica" quiere decir que en una población dada de células un agente solamente se administrará al interior de una proporción de esas células. En este caso, esas células presentan un antígeno 5T4 (es decir solamente células tumorales).

50 "Agentes" citotóxicos adecuados para administrar a las células pueden ser sintéticos o darse en la naturaleza. Pueden comprender proteínas, péptidos y/o ácidos nucleicos. Comprender moléculas que afectan la estructura celular interaccionando con uno o más elementos citoesqueléticos. Pueden tener un efecto en la estructura o función de la célula. Por ejemplo pueden tener efectos de proliferación celular.

55 Además, el agente puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto, que puede ser de uso terapéuticamente.

60 Además, los agentes pueden comprender componentes, que permiten la detección subsiguiente, y/o la formación de imágenes de células tumorales bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los componentes adecuados incluyen radiomarcadores como se describen en el presente documento, adecuados para detección por autorradiografía. Ellos incluyen también MRI (marcas de formación de imágenes de resonancia magnética). Las marcas adecuadas para detección por tomografía por emisión de positrones se incluyen también dentro del alcance de la presente invención. Aquellos expertos en la técnica serán conscientes de otros agentes adecuados.

65 Los agentes pueden estar unidos a un anticuerpo de 5T4 físicamente mediante por ejemplo reticulación usando agentes tales como yodoacetamida. De forma alternativa pueden expresarse conjugados a un anticuerpo de 5T4. Por

ejemplo se pueden expresar como proteínas de fusión. Puede unirse al anticuerpo de 5T4 por medio de una "secuencia de engarce" por ejemplo una secuencia de engarce peptídica. En este caso el agente puede no estar en asociación física con el anticuerpo de 5T4. De forma alternativa, el agente puede estar unido al anticuerpo de 5T4 por medio del sitio de unión a antígeno. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que esta lista no se desea que sea exhaustiva y serán conscientes de otros procedimientos adecuados de unir el agente a un anticuerpo de 5T4 de la presente invención.

Ventajosamente, las células tumorales están seleccionadas del grupo constituido por: células tumorales de mama, células tumorales de ovario, células tumorales gástricas y células tumorales colorrectales.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 tal unido a un agente para usar en un procedimiento para disminuir la velocidad de proliferación de las células tumorales.

Preferentemente, el anticuerpo de 5T4 es un anticuerpo monoclonal o scFv. Ventajosamente, el anticuerpo de 5T4 es 5T4scFvmycHis y/o H8.

Preferentemente, el 5T4 es 5T4 humano.

Un "agente citotóxico" en el contexto de la presente invención se refiere a un agente que induce la aparición o progresión de senescencia celular en al menos una proporción de aquellas células cuando se administran a una población de células.

En el contexto de la presente invención, el término "disminuir la velocidad de proliferación de células tumorales" quiere decir que la velocidad de proliferación de una muestra de células tumorales tratadas con un anticuerpo de 5T4, como se describe en el presente documento, unido a un agente citotóxico está disminuida cuando se compara con una muestra similar de células que no se han tratado así.

El procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o un procedimiento *in vivo*. Preferentemente, el procedimiento es un procedimiento *in vivo*. Ventajosamente, el procedimiento está disminuyendo la velocidad de proliferación de células tumorales humanas. Preferentemente las células tumorales son aquellas seleccionadas de las siguientes: células tumorales mamarias, células tumorales ováricas, células tumorales gástricas y células tumorales colorrectales.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 unido a un agente para usar en un procedimiento para la profilaxis de tratamiento de cáncer en un mamífero.

Preferentemente, el cáncer es de cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer gástrico y cáncer colorrectal.

Las características comunes de "cáncer" según se definen en el presente documento incluyen la capacidad de una célula para sufrir replicación sin fin, pérdida de inhibición por contacto, invasividad y la capacidad de metastatizar. Es decir, cuando las células se dividen de una manera incontrolable y no pueden reconocer sus propios límites naturales, las células cancerosas obtienen la capacidad de dispersarse hacia otras áreas del cuerpo. Están implicadas en la aparición de cáncer mutaciones dentro del ácido nucleico de una o más células. A menudo, se requiere más de una mutación de ácidos nucleicos o más de un evento celular aberrante para el desarrollo de tumores (haces de células que se dividen de forma aberrante), es decir la formación de tumores es un evento multi-senal. En el contexto de la presente invención las células cancerígenas incluyen cualesquiera células que presenten una o más de las siguientes características división celular aberrante, inhibición por contacto aberrante, diferenciación de células aberrantes según se comparan con células que se comportan normalmente dentro de su ambiente nativo, la capacidad de la célula para invadir tejidos y la capacidad para metastatizar. La definición de "células cancerosas" en el contexto de la presente invención, incluye por lo tanto dentro de su alcance células tumorales y también células antes de la formación de tumores en la medida en que posean una o más de las características requeridas enumeradas anteriormente. Además el término células cancerosas de acuerdo con la presente invención incluye células metastáticas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Internalización de hu5T4 en la superficie celular de la línea celular murina CT26hu5T4.

Figura 2: Internalización de hu5T4 en la superficie celular de las líneas celulares humanas HT29 y PA1.

Figura 3: Internalización de hu5T4 en la superficie de MDAMB-4355T4. Se detecta un decrecimiento de 5T4 en la superficie de MDAMB-4355T4 tras incubación con un anticuerpo específico para 5T4.

Figura 4: Internalización de hu5T4 en la superficie de CHO-5T4EKmycHIS. Se detecta un decrecimiento de 5T4 en la superficie de CHO-5T4EKmycHIS tras incubación con un anticuerpo específico para 5T4.

Descripción detallada de la invención

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales que están dentro de las capacidades de una persona de habilidad ordinaria en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. y cols. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Cada uno de estos textos celulares se incorpora en el presente documento por referencia.

15 5T4

Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto ahora que 5T4 es capaz de internalización cuando está unido un ligando 5T4.

20 El antígeno 5T4 es el polipéptido conocido como 5T4 y caracterizado, por ejemplo, en el documento W089/07947. En un aspecto preferido, 5T4 es 5T4 humano como se caracteriza por Myers y cols. *ibid.*, la secuencia del cual aparece en GenBank en el número de acceso Z29083. La definición de 5T4 de acuerdo con la presente invención incluye especies y variaciones alélicas de 5T4, incluyendo 5T4, así como fragmentos, preferentemente epítomos diferentes y variantes de los mismos que comprenden preferentemente distintos epítomos y variantes de los mismos que comprenden inserciones, deleciones o sustituciones que retienen la antigenicidad de 5T4. Tales fragmentos y variantes se describen en mayor detalle más adelante.

En el contexto de la presente invención el término "antígeno 5T4" también incluye dentro de esta panorámica un antígeno modificado. Un antígeno "modificado", como se usa en el presente documento, es un polipéptido 5T4, que se ha truncado, prolongado o mutado de otra manera de tal forma que difiere del 5T4 que se da en la naturaleza. Se ha encontrado que los fragmentos peptídicos derivados de 5T4 son capaces de funcionar como determinantes antigénicos 5T4-específicos. Tales péptidos son capaces de unir moléculas de HLA y de inducir respuestas CTL contra 5T4 de tipo silvestre en sujetos, a menudo de forma más efectiva que 5T4 de longitud total. Además, los péptidos 5T4 se pueden mutar, por inserción, deleción o sustitución de aminoácidos; los péptidos mutados se unen ventajosamente de incluso de forma más efectiva a HLA y provocan una respuesta CTL incluso más potente en sujetos. Los péptidos pueden ser de cualquier longitud, pero son ventajosamente de entre 5 y 25 aminoácidos, preferentemente entre 6 y 15 aminoácidos y ventajosamente aproximadamente de 9 aminoácidos de longitud.

Los péptidos modificados son ventajosamente epítomos de CTL de HLA de 5T4. La modificación de tales epítomos se puede llevar a cabo en base a predicciones para inducción de CTL más eficiente derivada usando el programa "Peptide Binding Predictions" diseñado por K. Parker (NIH) que puede encontrarse en http://www-bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform (véase también Parker, K. C y cols. (1994) J. Immunol. 152: 163).

45 El antígeno 5T4, según se refiere en el presente documento, incluye péptidos y otros fragmentos de 5T4 que retienen al menos un determinante antigénico común de 5T4.

"Determinante antigénico común" quiere decir que el derivado en cuestión tiene al menos una función antigénica de 5T4. La función antigénica incluye posesión de un epítomo o sitio antigénico que es capaz de reticularse con anticuerpos obtenidos contra un polipéptido 5T4 que se da en la naturaleza o desnaturalizado o fragmentos del mismo, o la capacidad para unir moléculas de HLA e inducir una respuesta inmune 5T4-específica. Así 5T4 como se proporciona en la presente invención incluye variantes de ajuste codificadas por ARNm generado por ajuste alternativo de un transcrito primario, mutantes aminoácidos, variantes de glucosilación y otros derivados covalentes de 5T4 que retienen las propiedades fisiológicas y/o físicas de 5T4. Los derivados ejemplares incluyen moléculas en las que la proteína de la invención está covalentemente modificada por sustitución, química, enzimática o por otro medio apropiado con un resto distinto de un aminoácido que se dé en la naturaleza. Un resto tal puede ser un resto detectable tal como una enzima o un radioisótopo. Están incluidas adicionalmente variantes que se dan en la naturaleza de 5T4 encontradas con una especie particular, preferentemente un mamífero. Una variante tal puede estar codificada por un gen relacionado de la misma familia génica, por una variante alélica de un gen particular, o puede representar una variante de ajuste alternativa del gen 5T4.

Los derivados que pueden retener determinantes antigénicos comunes pueden ser fragmentos de 5T4. Los fragmentos de 5T4 comprenden dominios individuales de los mismos, así como polipéptidos menores derivados de los dominios. Preferentemente, polipéptidos menores derivados de 5T4 de acuerdo con la invención definen un epítomo individual que es característico de 5T4. Los fragmentos pueden en teoría ser casi de cualquier tamaño, así como retener una característica de 5T4. Preferentemente, los fragmentos estarán entre 5 y 400 aminoácidos en longitud. Los

fragmentos más largos se consideran como truncaciones del 5T4 de longitud total y están abarcados generalmente por el término "5T4". Ventajosamente, los fragmentos son péptidos relativamente pequeños del orden de 5 a 25 aminoácidos en longitud. Se prefieren péptidos de aproximadamente 9 aminoácidos en longitud.

5 Los derivados de 5T4 también comprenden mutantes de los mismos, que pueden contener deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, sometidos al requerimiento de mantener al menos un rasgo característico de 5T4. Así, las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden hacerse sustancialmente sin alterar la naturaleza de 5T4, como pueden ser truncaciones de los extremos 5' o 3'.

10 Se pueden hacer además deleciones y sustituciones a los fragmentos de 5T4 comprendidos por la invención. Se pueden producir mutantes de 5T4 a partir de un ADN que codifica 5T4 que se ha sometido a mutagénesis *in vitro* dando como resultado por ejemplo una adición, intercambio y/o deleción de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, variantes sustitucionales, delecionales o insercionales de 5T4 pueden prepararse por procedimientos recombinantes y rastrearse por reactividad cruzada inmunitaria con las formas nativas de 5T4.

15 Además, se pueden rastrear péptidos variantes para capacidades de unión a HLA superiores usando el programa "Predicciones de Uniones Peptídicas" diseñado por K. Parker en los National Institutes of Health (véase Parker, K. C y cols. 1994, J. Immunol. 152: 163).

20 Los fragmentos, mutantes y otros derivados de 5T4 preferentemente retienen homología sustancial con 5T4. Como se usa en el presente documento, "homología" quiere decir que dos entidades comparten suficientes características para la persona experta para determinar que son similares en origen y función. Preferentemente, la homología se usa para referirse a identidad de secuencia.

25 "Homología sustancial" donde homología indica identidad de secuencia, quiere decir más del 40 % de identidad de secuencia, preferentemente más del 45 % de identidad de secuencia y lo más preferentemente una identidad de secuencia del 50 % o más, según se juzga por alineamiento directo y comparación directa de secuencias.

30 La homología (o identidad) de secuencias puede además determinarse usando cualquier algoritmo de homología adecuado, usando por ejemplo parámetros por defecto. Ventajosamente, se emplea el algoritmo BLAST, con parámetros ajustados a valores por defecto. El algoritmo BLAST se describe en detalle en http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html, que se incorpora en el presente documento por referencia.

35 Ventajosamente, "homología sustancial" cuando se valora por BLAST equivale a secuencias que coinciden con un valor EXPECT de al menos aproximadamente 7, preferentemente al menos 9 y lo más preferentemente 10 o más. El umbral por defecto para EXPECT en búsqueda de BLAST es usualmente 10.

40 BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica) es el algoritmo de búsqueda heurística empleado por los programas blastp, blasitn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas atribuyen significancia a sus hallazgos usando los procedimientos estadísticos de Karlin y Altschul (véase http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html) con unas pocas potenciaciones. Los programas de BLAST se adaptaron para búsqueda de similitud de secuencia, por ejemplo para identificar homólogos a una secuencia consultada. Los programas no son generalmente útiles para búsqueda estilo restos. Para una discusión de artículos básicos en búsqueda de similitud de bases de datos de secuencias, véase Altschul y cols. (1994) Nature Genetics 6: 119-129. Lo más preferentemente, las comparaciones de secuencias se llevan a cabo usando al algoritmo de búsqueda BLAST simple dado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

50 De forma alternativa, la homología de secuencia se puede determinar por algoritmos tales como FastA, disponible en <http://biology.ncsa.uiuc.edu/BW30/BW.cgi>. FastA se considera que es superior a BLAST para alineamiento de secuencias cortas. Ventajosamente, el algoritmo FastA se emplea usando parámetros por defecto a <http://biology.ncsa.uiuc.edu/BW30/BW.cgi>.

Anticuerpos que se unen específicamente a antígeno 5T4

55 De acuerdo con la presente invención, tras la unión de un anticuerpo de 5T4 a 5T4, el complejo se internaliza.

Como se usa en el presente documento, el término unión "específica" quiere decir que tal unión no está inhibida competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

60 El anticuerpo de 5T4 puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo.

El anticuerpo se puede usar en combinación con uno o más compuestos farmacéuticamente activos, que se pueden administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente.

65 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos completos, anticuerpos biespecíficos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a 5T4 según se define en el presente documento, e

incluye Fv, ScFv, Fab' y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos manipulados incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados y anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando presentación en fagos o técnicas alternativas.

5 Un anticuerpo quimérico hace referencia a una fusión realizada por ingeniería genética de partes de un anticuerpo de ratón con partes de un anticuerpo humano. Generalmente, los anticuerpos quiméricos contienen aproximadamente el 33 % de proteína de ratón y el 67 % de proteína humana. Desarrollados para reducir la respuesta HAMA facilitada por anticuerpos murinos, combinan la especificidad del anticuerpo murino con la interacción del sistema inmune humano eficiente de un anticuerpo humano.

10 Los anticuerpos humanizados se han obtenido reemplazando la región constante de un anticuerpo de ratón con proteína humana, pero también reemplazando partes de la región variable del anticuerpo con proteína humana. Generalmente los anticuerpos humanizados son de ratón del 5-10 % y de ser humano del 90-95 %. Los anticuerpos humanos se desarrollaron para contrarrestar las respuestas inmunes vistas con anticuerpos murinos y quiméricos. Los datos de anticuerpos humanizados usados en ensayos clínicos muestran respuesta mínima o no muestran ninguna respuesta del sistema inmune humano contra ellos.

15 Un enfoque más sofisticado para anticuerpos humanizados implica no solamente proporcionar regiones constantes derivadas de ser humano, sino además modificar las regiones variables también. Esto permite a los anticuerpos reconfigurarse tan cercanamente como sea posible a la forma humana. Las regiones variables tanto de cadenas pesadas como de cadenas ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que proporcionan teóricamente un andamiaje para las CDR. Cuando los anticuerpos no humanos se preparan con respecto a un antígeno individual, las regiones variables pueden "reconfigurarse" o "humanizarse" injertando CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano a modificarse. Esta aproximación se ha comunicado en, por ejemplo, los documentos Cancer Res (1993) 53: 851-856, Nature (1988) 332: 323-327, Science (1988) 239: 1534-1536, Proc Natl Acad Sci EE.UU. (1991) 88: 4181-4185 y J Immunol (1992) 148: 1149-1154.

20 Ventajosamente los anticuerpos para usar de acuerdo con la presente invención son H8 monoclonal, que es un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno oncofetal 5T4 y se describe en el documento Biochim Biophys Acta, (2000), 15 de diciembre, 1524 (2-3): 238-46 que se incorpora por referencia y/o scFv 5T4scFvmycHis derivado del monoclonal que se describe en el documento WO 00/29428 que se incorpora también en el presente documento por referencia.

35 Preparación de anticuerpos

La preparación de anticuerpos se lleva a cabo usando técnicas de laboratorio. Los anticuerpos se pueden obtener de suero animal, o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, se pueden producir en cultivo. Se puede usar tecnología de ADN recombinante para producir los anticuerpos de acuerdo con el procedimiento establecido, en cultivo celular bacteriano o preferentemente de mamífero. El sistema de cultivo celular seleccionado secreta preferentemente el producto de anticuerpo.

45 La multiplicación de células de hibridoma o de células huésped de mamífero *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados, que son los medios de cultivo estándar normales, por ejemplo medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640, repuesto opcionalmente por un suero de mamífero, por ejemplo, suero de ternero fetal, o elementos traza y complementos de mantenimiento del cultivo, por ejemplo células alimentadoras tales como células de exudado peritoneal de ratones normales, células de bazo, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares. La multiplicación de células huésped que son células bacterianas o células de levadura se lleva cabo asimismo en medios de cultivo adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, para bacterias en medio LB, NZCYM, NZYM, NZM, Terrific Broth, SOB, SOC, 2 x YT o medio mínimo M9 y para levadura en medio YPD, YEPD, medio mínimo, o medio de goteo mínimo completo.

50 La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite la aumentar de escala para dar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Las técnicas para el cultivo celular de células bacterianas, el cultivo celular de levaduras o el cultivo de células de mamífero se conocen en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor de aire o en un reactor de agitación continua, o cultivo de células inmovilizadas o atrapadas, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica.

60 También se pueden obtener grandes cantidades de los anticuerpos deseados multiplicando células de mamíferos *in vivo*. Con este fin, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se inyectan en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, en especial aceites minerales tales como pristana (tetrametil-pentadecano) antes de la inyección. Después de una a tres semanas, se aíslan los anticuerpos de los fluidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, las células de hibridoma obtenidas por fusión de células de mieloma adecuadas con células de bazo

productoras de anticuerpos de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de la línea celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados, se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c pretratados opcionalmente con pristina y después de una o dos semanas, se toma fluido ascítico de los animales.

5 Las técnicas anteriores y otras, se discuten, por ejemplo, en Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497; el documento US 4.376.110; Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor, incorporado en el presente documento por referencia. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes se describen en las referencias anteriores y además, por ejemplo, en los documentos EP 0623679; EP 0368684 y EP 0436597, que se incorporan en el presente documento por referencia.

10 Los sobrenadantes de cultivo celular se examinan para determinar los anticuerpos deseados, preferencialmente por tinción inmunofluorescente de células que expresan el objetivo deseado por inmunotransferencia, por un inmunoensayo de enzimas, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich o un ensayo de puntos, o un radioinmunoensayo.

15 Para el aislamiento de los anticuerpos, se pueden concentrar las inmunoglobulinas en los sobrenadantes del cultivo o en el fluido ascítico, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, diálisis frente a material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas, o similares. Si es necesario y/o se desea, los anticuerpos se purifican por procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)-afinidad, por ejemplo, 20 cromatografía de afinidad con la molécula objetivo o con Proteína-A.

Los anticuerpos generados de acuerdo con los procedimientos anteriores se pueden clonar por aislamiento de ácido nucleico de células, de acuerdo con procedimientos estándar. De forma útil, los dominios variables de ácidos nucleicos de los anticuerpos se pueden aislar y usar para construir fragmentos de anticuerpos, tales como scFv.

25 Por lo tanto, la invención emplea preferentemente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o para un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos. Por definición, estos ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos de hebra sencilla codificantes, ácidos nucleicos de doble hebra que consisten en dichos ácidos nucleicos codificantes y en ácidos nucleicos complementarios a los mismos, o estos propios ácidos nucleicos complementarios (de hebra sencilla).

Los anticuerpos quiméricos se pueden preparar reemplazando la región constante de un anticuerpo de ratón con proteína humana, permitiendo mientras que la región variable del anticuerpo permanezca como proteína de ratón. Se conocen varios procedimientos para la producción de anticuerpos quiméricos. A modo de ejemplo, anticuerpos 35 quiméricos se pueden preparar en los que las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos monoclonales de ratón se convierten en regiones constantes humanas, se producen en células animales haciendo uso de técnicas de ADN recombinante. Ejemplos de tales procedimientos incluyen un procedimiento en el que se produce anticuerpo quimérico humanizado usando ADN cromosomático como un gen que codifica región variable de cadena H (a referirse como "V.sub.H" de ahora en adelante) y región variable de cadena L (a referirse como "V.sub.L" de ahora 40 en adelante) (Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81, 6851 (1984); Neuberger y cols., *Nature*, 314, 268 (1985); Nishimura y cols., *Cancer Res.*, 47, 999 (1987); Dorai y cols., *J. Immunol.*, 139, 42S2 (1987); Kameyama y cols., *FEBS letter*, 244, 301 (1989)) y otros procedimientos en los que el anticuerpo quimérico humanizado se produce usando ADNc (Gillies y cols., *J. Immunol. Methods*, 125, 191 (1989); Liu y cols., *Solicitud Internacional publicada en Japón N.º: 2-501886*).

45 Se pueden usar diversos procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales con carácter humano, que evitan la necesidad de una línea celular humana productora de anticuerpos. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón útiles pueden "humanizarse" engarzando regiones variables de roedores y regiones constantes humanas (Winter, G. y Milstein, C. (1991) *Nature* 349, 293-299). Esto puede reducir la inmunogenicidad anti-ratón humana del anticuerpo pero la inmunogenicidad residual se retiene en virtud del marco de la región V exógena. Además, la especificidad de unión a antígeno es esencialmente aquella del donante murino. La manipulación realizando injertos de CDR y la manipulación de regiones estructurales (véase, por ejemplo, documento EP 0239400) ha mejorado y refinado la manipulación de anticuerpos hasta el punto en el que es posible producir anticuerpos murinos humanizados que son aceptables para uso terapéutico en seres humanos. Los anticuerpos humanizados se pueden obtener usando otros 50 procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo como se describen en el documento US-A-239400).

Además, los ácidos nucleicos que codifican un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos pueden ser ácidos nucleicos sintetizados enzimática o químicamente que tienen la secuencia auténtica que codifica para un dominio variable de cadena pesada natural y/o para el dominio variable de cadena ligera, o un mutante de los mismos. Un mutante de la secuencia auténtica es un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos mencionados anteriormente en el que uno o más aminoácidos se suprimen o se intercambian con uno o más de otros aminoácidos. Preferentemente, dicha(s) modificación/modificaciones está(n) fuera de las CDR del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo. Un ácido nucleico mutante de este tipo también está diseñado para ser un mutante silencioso en el que uno o más nucleótidos se reemplazan por otros nucleótidos con los codones nuevos que 65 codifican el/los mismo(s) aminoácido(s). Una secuencia mutante de este tipo también es una secuencia degenerada.

Las secuencias degeneradas son degeneradas en el sentido del código genético ya que un número ilimitado de nucleótidos se reemplaza por otros nucleótidos sin dar como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos codificada originalmente. Estas secuencias degeneradas pueden resultar útiles debido a sus diferentes sitios de restricción y/o frecuencia de codones particulares que se prefieren por el huésped específico, en particular células de levaduras, bacterianas o de mamíferos, para obtener una expresión óptima del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera.

De forma alternativa se pueden seleccionar y generar anticuerpos usando tecnología de presentación de fagos. Los procedimientos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos de bacteriófagos y de bibliotecas de expresión en fagos lambda son muy conocidos en la técnica (McCafferty *y cols.* (1990) *supra*; Kang *y cols.* (1991) *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 88: 4363; Clackson *y cols.* (1991) *Nature*, 352: 624; Lowman *y cols.* (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Burton *y cols.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.*, 88: 10134; Hoogenboom *y cols.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133; Chang *y cols.* (1991) *J. Immunol.*, 147: 3610; Breitling *y cols.* (1990) *Gene*, 104: 147; Marks *y cols.* (1991) *supra*; Barbas *y cols.* (1992) *supra*; Hawkins y Winter (1992) *J. Immunol*, 22: 867; Marks *y cols.*, 1992, *J. Biol Chem.*, 267: 16007; Lerner *y cols.* (1992) *Science*, 258: 1313, incorporado en el presente documento por referencia).

Las técnicas para la preparación de anticuerpos biespecíficos se describen por ejemplo en las siguientes revisiones y referencias citadas en el mismo: Winter y Milstein, (1991) *Nature* 349: 293-299; Plueckthun (1992) *Immunological Reviews* 130: 151-188; Wright *y cols.*, (1992) *Crit. Rev. Immunol.* 12: 125-168; Holliger, P. & Winter, G. (1993) *Curr. Op. Biotechn.* 4, 446-449; Carter *y cols.* (1995) *J. Hematother.* 4, 463-470; Chester, K.A. y Hawkins, R.E. (1995) *Trends in Biotechn.* 13, 294-300; Hoogenboom, H.R. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 125-126; Fearon, D. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 618- 619; Pluckthun, A. y Pack, P. (1997) *Immunotechnology* 3, 83-105; Carter, P. & Merchant, A.M. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454; Holliger, P. & Winter, G. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 128-130.

Procedimiento para la administración específica de agentes al interior de las células tumorales

Muchas citotoxinas y otros agentes o componentes de agentes están activados por componentes citoplásmicos por ejemplo enzimas celulares y por lo tanto la internalización de un agente es esencial para su actividad.

Así en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de 5T4 unido a un agente para usar en un procedimiento para la administración específica de uno o más agentes al interior de las células tumorales. El procedimiento puede comprender la etapa de tratar las una o más células con un anticuerpo de 5T4 unido a uno o más agentes.

En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se refiere al procedimiento de puesta en contacto de una o más células con un anticuerpo de 5T4 específico unido a un agente. Los procedimientos adecuados para "tratar" células dependerán de si el procedimiento se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro*.

(1) Agentes

Los agentes incluyen moléculas, que afectan la estructura celular interaccionado con uno o más elementos citoesqueléticos.

Además, los agentes pueden comprender ácido nucleico capaz de expresarse para formar un producto génico. Los ácidos nucleicos adecuados se pueden incorporar dentro de un vector. Los vectores adecuados serán familiares para aquellos expertos en la técnica. El vector puede ser un vector basado en fagos, un vector basado en plásmidos y/o un vector basado en virus incluyendo retrovirus.

Si el vector es un vector viral puede incluir entonces, pero no se limita a, vector adenovírico, un vector vírico adeno-asociado, un vector herpesvírico, vector retrovírico, vector lentivírico, vector baculovírico, vectores poxvíricos o vectores parvovíricos (véase Kestler *y cols.* 1999 *Human Gene Ther* 10 (10): 1619-32). En el caso de vectores víricos, la administración de la secuencia de nucleótidos que codifica el agente de la presente invención puede estar mediada por infección vírica. Alguien experto en la técnica apreciará que esta lista no pretende ser exhaustiva.

Preferentemente, el vector vírico es un vector lentivírico. Los lentivirus son un subtipo de retrovirus, que puede representar una alternativa a los retrovirus. Los lentivirus, tales como VIH, virus de la inmunodeficiencia simia y virus de la inmunodeficiencia felina, pueden infectar células que no se dividen e integrarse de la misma manera que otros retrovirus.

Ventajosamente, el vector será un vector de expresión e incluirá los elementos adicionales necesarios para expresión de ácido nucleico (por ejemplo secuencias de promotor y de potenciador).

El ácido nucleico para administración en el interior de las células tumorales puede codificar una o más moléculas, que afectan a la estructura y/o función de la célula tumoral. Tales moléculas incluyen enzimas, inhibidores de enzimas, co-factores para enzimas u otras proteínas, agentes secuestrantes de proteínas, genes suicidas o ARN de interferencia. Alguien experto en la técnica apreciará que esta lista no pretende ser exhaustiva.

El ácido nucleico para administrar dentro del interior de las células tumorales puede codificar por lo tanto una o más moléculas que afectan a la estructura y/o a la función de la célula tumoral inhibiendo la expresión de un componente celular, por ejemplo al nivel de la transcripción, estabilidad de la transcripción, traducción o estabilidad postraduccional. Por ejemplo, la molécula puede ser una secuencia antisentido de un ARNip. La inhibición de la expresión génica usando tecnología antisentido es bien conocida.

La silenciación génica postranscripcional (PTGS) mediada por ARN de cadena doble (ARNds) es un mecanismo de defensa celular conservado para controlar la expresión de genes exógenos. Se piensa que la integración aleatoria de los elementos tales como transposones o virus causa la expresión de ARNds, que activa la degradación específica de secuencia de ARNm de cadena simple homóloga o de ARN genómico vírico. El efecto silenciador se conoce como interferencia de ARN (iARN). El mecanismo de iARN implica el procesamiento de ADNds largos en dúplex de ARN de 21-25 nucleótidos (nt). Estos productos se llaman ARN de interferencia pequeños o ARN de silenciación (ARNsi) que son los mediadores de secuencia específica de degradación de ARNm. En células de mamífero diferenciadas se ha encontrado que RNAs > 30 pares de bases activa la respuesta de interferón que conduce a que deje de funcionar la síntesis de proteínas y la degradación de ARNm no específica (Stark y cols. 1998). Sin embargo esta respuesta puede evitarse usando dúplex de ARNip de 21 nucleótidos (Elbashir y cols. 2001, Hutvagner y cols. 2001) permitiendo a la función génica analizarse en células de mamíferos cultivadas.

El ácido nucleico para administración en el interior de las células tumorales puede codificar uno o más genes suicidas que afectan a la estructura y/o función de la célula tumoral. Se ha identificado un número de sistemas de genes suicidas, incluyendo, pero no limitados a, el gen de timidina cinasa del virus herpes simplex, el gen de citosina deaminasa, el gen de timidina cinasa del virus varicela-zóster, el gen de nitrorreductasa, el gen *gpt* de *Escherichia coli* y el gen *Deo* de *E. coli*. Los genes suicidas en terapia del cáncer se han revisado en, por ejemplo, los documentos *World J Surg* julio de 2002; 26 (7): 783-9, *Adv Exp Med Biol* 2000; 465: 411-22 y *Semin Oncol.* febrero de 1996; 23 (1): 31-45).

El ácido nucleico para administración en el interior de las células tumorales puede codificar también una o más secuencias de nucleótidos que son capaces de "desactivar" la expresión de un gen en particular que afecte la estructura y/o función de la célula tumoral. Hay varias estrategias de "desactivación" conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica puede ser capaz de integración en el genoma de una célula tal como para alterar la expresión de un gen en particular. La expresión puede alterarse, por ejemplo, introduciendo un codón de parada prematuro, volviendo a la secuencia codificante fuera de fase, o afectando la capacidad de la proteína codificada para plegarse (afectando de este modo su función).

(2) Métodos *in vivo* para tratar células con agentes

Generalmente los agentes según se definen en el presente documento y el anticuerpo de 5T4 están unidos para combinarse con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos para formar una composición para tratar células.

El agente o la composición se pueden administrar de una manera conveniente tal como por vías oral, intravenosa (donde es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o de supositorio o implantando (por ejemplo usando moléculas de liberación lenta). Dependiendo de la vía de administración, puede requerirse que el agente esté revestido de un material para proteger dichos ingredientes de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dicho ingrediente.

Con el fin de administrar el agente de manera distinta a por administración parenteral, ello está revestido por, o está administrado con, un material para evitar esta inactivación. Por ejemplo, el agente puede administrarse en un coadyuvante, coadministrado con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Coadyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto estimulante tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como éter oleílico de polioxietileno y éter n-hexadecílico de polietileno. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática.

Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua-en aceite-en agua así como liposomas convencionales.

El complejo agente-anticuerpo de 5T4 puede administrarse también parenteralmente o intraperitonealmente. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Según condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (donde son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable según las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o

de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

5 La prevención de la acción de microorganismos se puede provocar por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiere, seguido de esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y la técnica de secado por congelación que proporcionan un polvo del principio activo más un ingrediente deseado adicional a partir de solución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

20 Cuando el agente-anticuerpo de 5T4 está protegido adecuadamente como se describe anteriormente, ello se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede encerrarse en cápsulas de gelatina duras o blandas, o puede comprimirse en comprimidos, o puede incorporarse directamente con los alimentos de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

30 Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también lo siguiente: un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina puede añadirse o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, ella puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido.

35 Diversos otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otras maneras la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas puede estar revestidas con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, una tinción y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material usado en preparar cualquier forma de unidad de dosificación debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse dentro de las preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

45 Como se usa en el presente documento, "el vehículo y/o diluyente y/o excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualesquiera medios convencionales o cualquier agente sean incompatibles con el agente-ligando de 5T4 de la presente invención, se contempla el uso de los mismos en las composiciones de agentes de la presente invención. Los ingredientes activos suplementarios se pueden incorporar dentro de las composiciones.

50 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se tratan; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las nuevas formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y del efecto terapéutico particular que se logra y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal material activo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos que tienen una afección morbosa en la que la salud corporal se ve afectada.

60 Los principales ingredientes activos están compuestos para administración conveniente y efectiva en cantidades efectivas con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma de dosificación unitaria. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis usual y a la manera de administración de dichos ingredientes.

65

La invención se describe adicionalmente, para los propósitos de ilustración solamente, en los siguientes ejemplos, que no son limitantes de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

5

Ejemplo 1 - Método general

10 El objetivo de este estudio fue establecer que un anticuerpo monoclonal específico para hu5T4 (H8) o un anticuerpo de cadena individual 5T4scFvmycHis (scFv) es capaz de internalizarse con 5T4 después de haberse unido a 5T4 en la superficie celular.

Diseño experimental

15 La base de experimentos de internalización es observar el decrecimiento de 5T4 unido a Ab en la superficie celular de la línea de células tumorales a lo largo del tiempo. En este estudio los autores de la presente invención detectan internalización de 5T4 por marcado extracelular de 5T4 usando H8 o el scFv, 5T4scFvmycHis (esto es scFv recombinante con una etiqueta de myc his). Para internalización por anticuerpo monoclonal (H8) los autores de la presente invención usaron IgG-FITC anti-ratón marcando conjugados 5T4:H8 que no se habían internalizado. Para internalización por scFv usar anti-HIS de ratón seguido por IgG-FITC anti-ratón marcando los conjugados 5T4:scFv
20 que quedan en la superficie celular. La detección de conjugado 5T4:Ab se lleva a cabo por citometría de flujo.

Una reducción en el nivel de conjugados marcados en la superficie celular es indicativo de la velocidad de internalización de conjugados 5T4:Ab. Asegurando que se observasen las células vivas se usó la tinción de exclusión TOPRO-3. Solamente las células negativas en TOPRO-3 se valoraron por su nivel de conjugados 5T4:Ab
25 internalizados.

Ejemplo 2 - Método detallado

- 30 - Incubar $2,5 \times 10^5$ células en 0,5 ml con cantidades saturantes de H8 o scFv a 4 °C durante 60 minutos.
- Lavar células con tampón de tinción de FAC frío añadiendo 3 ml a cada tubo en hielo y centrifugando a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- 35 - Decantar sobrenadante y añadir 1 ml de RPMI + FBS al 10 % a 37 °C a todos los tubos (salvo t = 0 donde se añadió 1 ml de RPMI frío),
- Cerrar herméticamente las tapas de los tubos t = 0 y situarlos inmediatamente en hielo
- 40 - Situar los tubos que quedan en incubador de CO₂ al 5 % a 37 °C con tapas sueltas
- Devolver tubos apropiados al hielo en estos puntos temporales (horas): 0, 1, 2, 4
- 45 - Cuando el último tubo recogió las células sedimentadas por centrifugación decantar el sobrenadante y lavar resuspendiendo en 3 ml de tampón de tinción FACS enfriado en hielo y centrifugar durante 5 minutos a 500 * g.
- Decantar sobrenadante.
- Añadir 100 microlitros de tampón de tinción FACS que contiene anti-HIS de ratón diluido (1:1000) a células marcadas con LscFv
- 50 - Incubar 30 minutos a 4 °C
- Lavar dos veces con azida de PBS (3 ml cada lavado)
- 55 - Añadir 100 µl de tampón de tinción de FACS con FITC anti-ratón de cabra diluido 1:30 (el volumen final será aproximadamente 300 µl) a todos los tubos.
- Incubar 30 minutos a 4 °C
- 60 - Lavar dos veces con azida de PBS (3 ml cada lavado).
- Resuspender en 0,5 ml de azida de PBS mantenida en hielo y añadir Topro-3 (reserva 500x) justo antes de la adquisición en citómetro de flujo.

65 Ejemplos 3 - Resultados

Figura 1: Internalización de hu5T4 sobre la superficie celular de la línea celular murina CT26hu5T4.

Tanto el scFv como el anticuerpo monoclonal H8 son capaces de internalizarse con hu5T4 marcado en la superficie celular de las células vivas. Dentro de las 4 horas siguientes a 37 °C tanto el anticuerpo monoclonal como el scFv son capaces de internalizarse con al menos la mitad de hu5T4 en la superficie celular. H8 es más efectivo en internalización.

Figura 2: Internalización de hu5T4 en la superficie celular de las líneas celulares humanas HT29 y PA1.

El anticuerpo monoclonal, H8, es capaz de mediar internalización de hu5T4 en la superficie de la línea celular humana HT29. De nuevo el 50 % of hu5T4 marcado por H8 se internalizó dentro de las 4 horas siguientes de incubación a 37 °C. El scFv es también capaz de internalizar hu5T4 en la superficie de otra línea celular humana PA1. En este caso la mitad de hu5T4 en la superficie celular se internalizó dentro de 1 hora siguiente de incubación a 37 °C.

Figura 3: Internalización de hu5T4 en la superficie de MDAMB-4355T4.

MDAMB-435 es un tumor de mama humano que expresa de forma natural niveles bajos de 5T4 humano. Se prepararon transfectantes estables de esta línea celular expresando niveles altos de 5T4 y se usaron valorando la internalización de 5T4 en células MDAMB-435. La unión de H8 a 5T4 en esta línea celular da como resultado una reducción rápida de 5T4 en la superficie celular (casi el 30 % en 30 minutos). Después de 1-2 horas a 37 °C, se pierde un 20-30 % adicional de 5T4 marcado de la superficie celular. Esto proporciona evidencia adicional de que 5T4 humano es un objetivo adecuado para transporte mediado por anticuerpos de moléculas dentro de células tumorales humanas.

Figura 4: Internalización de hu5T4 en la superficie de CHO-5T4EKmycHIS.

La línea celular de ovario de hámster chino que expresa 5T4 humano se usa como se describe anteriormente. La proteína 5T4 expresada en esta línea celular contiene un sitio de escisión para enterocinasa seguido por una etiqueta myc-HIS en su extremo C-terminal. Se determina si estos 26 aminoácidos que forman el sitio de reconocimiento de enterocinasas y las etiquetas myc HIS evitan internalización de 5T4 por H8. La Figura 4 demuestra que las propiedades de internalización de H8 y 5T4 no se pierden cuando los restos de enterocinasa y de myc-HIS están presentes en el extremo C-terminal de 5T4 dado que más del 35 % de 5T4 marcado se pierde de la superficie celular después de 2 horas a 37 °C.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en el presente documento por referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos descritos y del sistema de la presente invención resultarán patentes para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque se ha descrito la presente invención junto con las realizaciones preferidas específicas, se debería entender que la invención según se reivindica no se debe limitar indebidamente a estas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en bioquímica, biología molecular y biotecnología o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente citotóxico, que, una vez se internaliza al interior de una célula tumoral, ejerce uno o más efectos biológicos intracelulares, en el que el agente citotóxico comprende una molécula que afecta la estructura celular interaccionando con uno o más elementos citoesqueléticos.
2. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el 5T4Ab es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el anticuerpo es un scFv.
4. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el scFv es 5T4scFvmYcHis.
- 15 5. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que anticuerpo de 5T4 es específico para el antígeno 5T4 de ser humano.
6. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el anticuerpo monoclonal es H8.
- 20 7. Un complejo de superficie celular de un antígeno 5T4 y un anticuerpo de 5T4 unidos a un agente de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
8. Un complejo internalizado de un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 9. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en un procedimiento para la internalización de un anticuerpo de 5T4 unido a un agente.
- 30 10. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en un procedimiento para la administración específica del agente al interior de las células tumorales.
11. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la administración es dentro del citoplasma.
- 35 12. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en un procedimiento para disminuir la velocidad de proliferación de células tumorales.
13. Un anticuerpo de 5T4 unido a un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de cáncer en un mamífero.

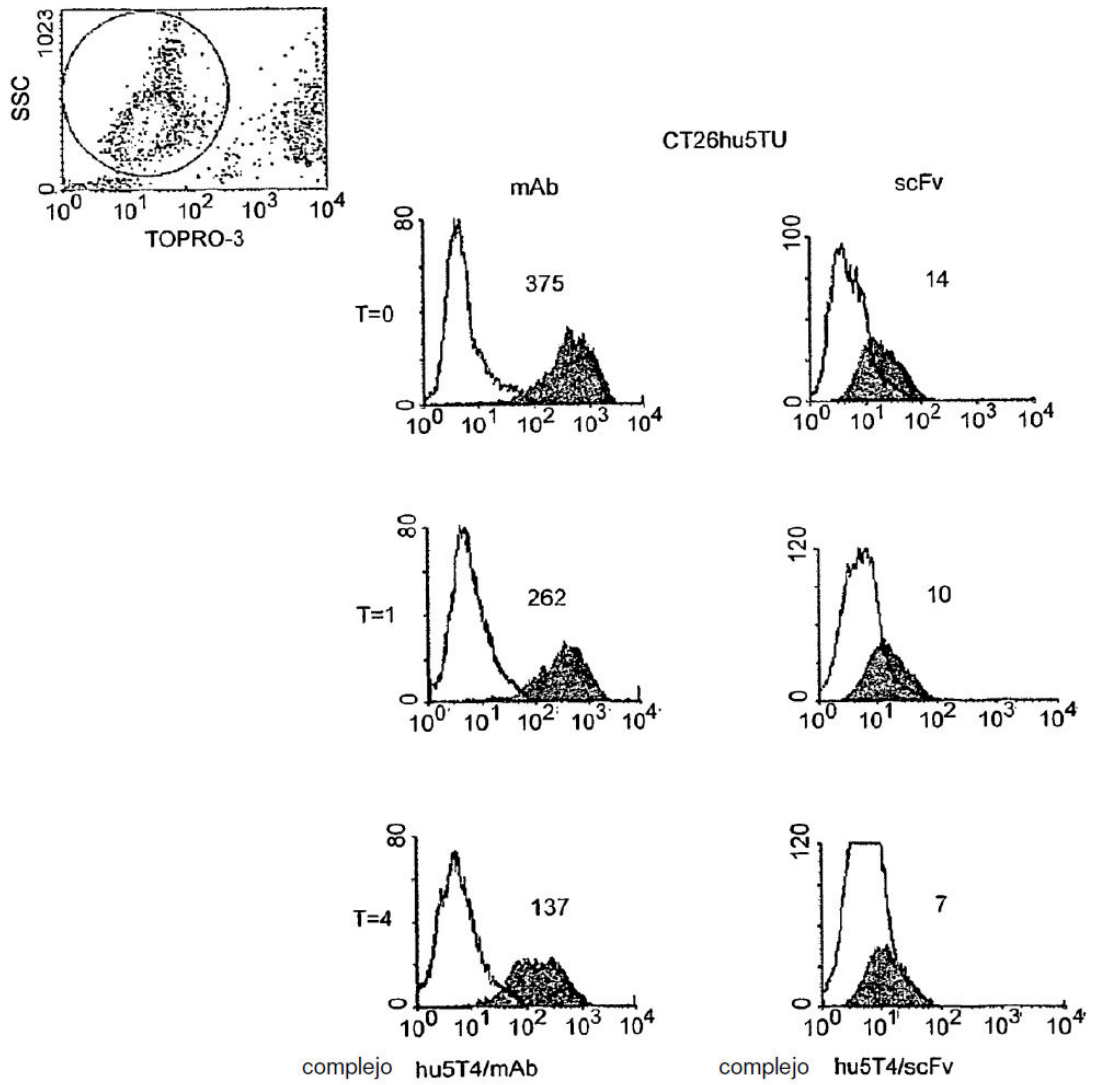


FIG. 1

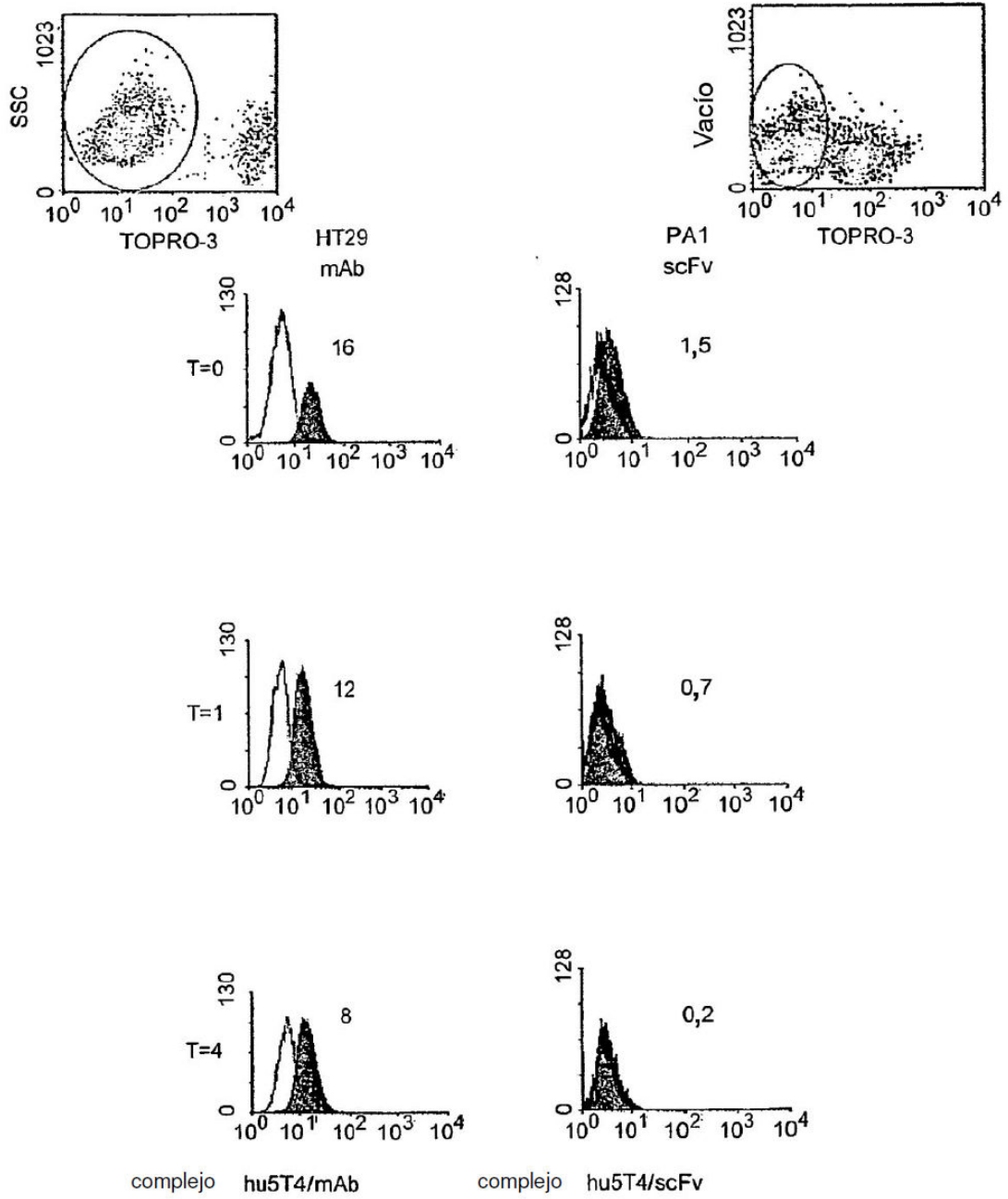


FIG. 2

Decrecimiento en 5T4 detectado en la superficie de MDAMB-435hu5T4
tras incubación con un anticuerpo específico para 5T4

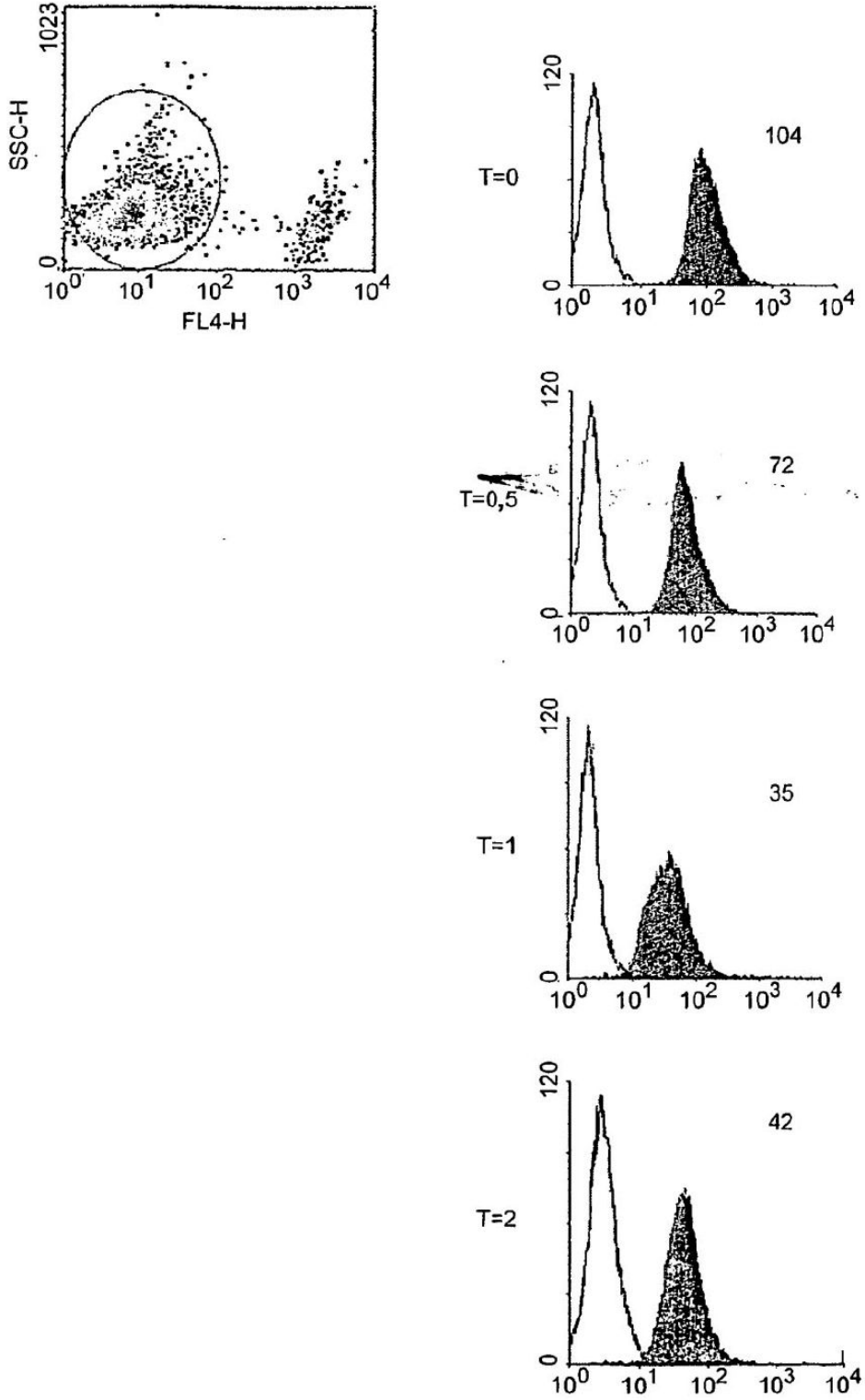


FIG. 3

Decrecimiento en 5T4 detectado en la superficie de CHO-hu5T4 tras incubación con un anticuerpo específico para 5T4

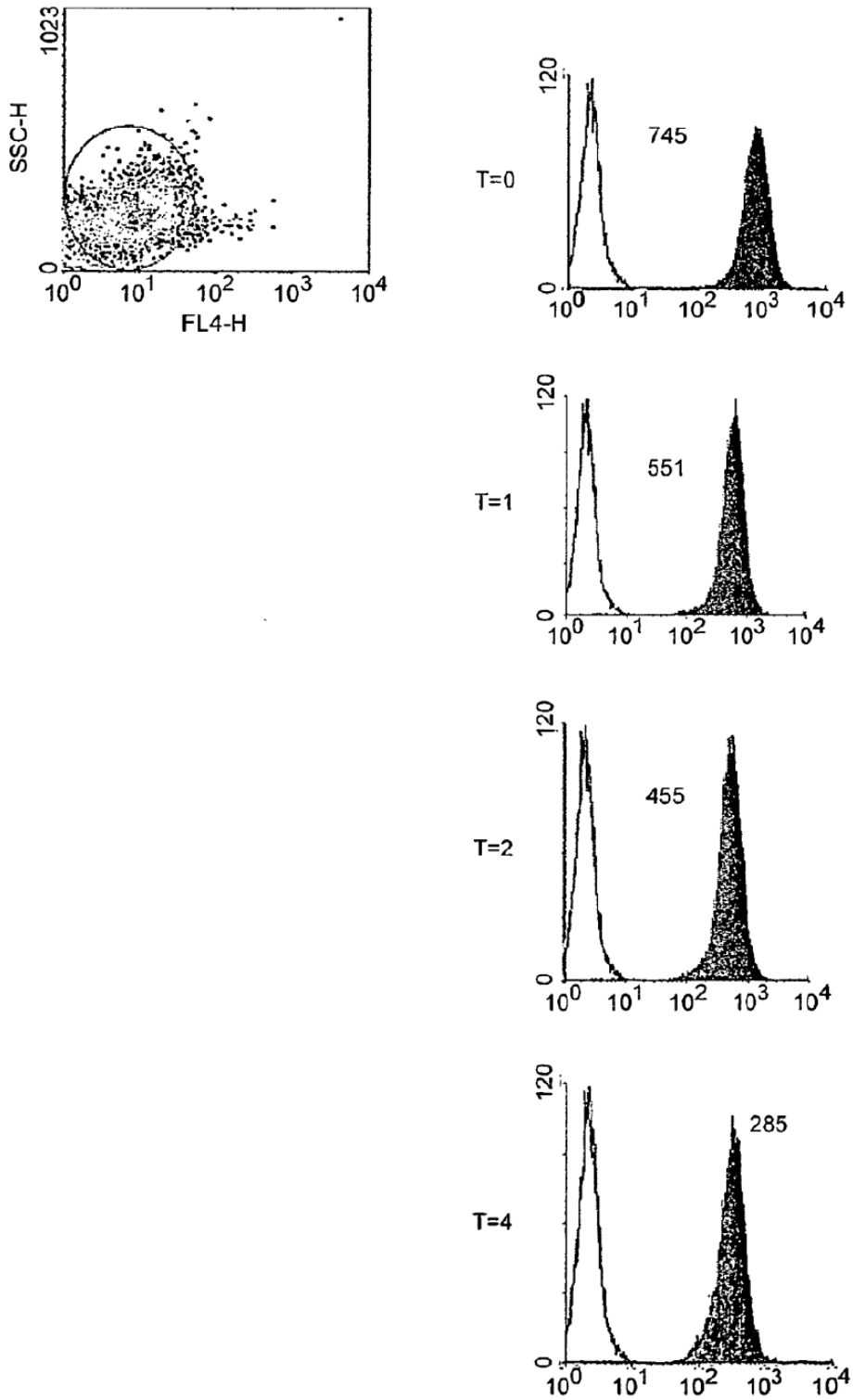


FIG. 4