

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 945**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2011** **E 11703182 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 2531527**

54 Título: **Un anticuerpo monoclonal para CD44 para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello**

30 Prioridad:

04.02.2010 US 301449 P

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

16.05.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH y
UNIVERSITY OF MIAMI (50.0%)

72 Inventor/es:

DA CRUZ, LUIS A.G. y
FRANZMANN, ELIZABETH JANE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 460 945 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

Un anticuerpo monoclonal para CD44 para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

La presente invención se refiere a métodos para prevenir, tratar o diagnosticar carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) usando uno o más anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB). En ciertos aspectos, el CDMAB es un anticuerpo específico para CD44. También se desvelan métodos de terapia de combinación que comprenden el uso de un CDMAB de acuerdo con la invención, opcionalmente combinado con uno o más segundos CDMAB y/o agentes quimioterapéuticos como un medio para prevenir o tratar el cáncer.

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) es una enfermedad debilitante y letal que habitualmente se presenta en estadio tardío y afecta a 50.000 personas en los Estados Unidos y 500.000 individuos en todo el mundo cada año. El HNSCC es una enfermedad que provoca morbilidad significativa, especialmente con respecto a las funciones del habla y la deglución. La cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de estas están disponibles generalmente como opciones de tratamiento.

A pesar de rigurosas combinaciones de cirugía, quimioterapia y radiación, las tasas de cura solamente alcanzan el 30 % para enfermedad de estadio tardío, y la reaparición sigue siendo la causa más habitual de fallo después de terapias convencionales (en el 40 %-50 % de los pacientes). El tratamiento de rescate consiste en las mismas opciones de tratamiento que para terapia de primera línea. Sin embargo, la cirugía paliativa es con frecuencia difícil y desfigura. Además, la radioterapia es pocas veces factible o beneficiosa, y la quimioterapia no mejora sustancialmente las tasas de supervivencia en pacientes con HNSCC. El pronóstico para estos pacientes sigue siendo negativo, de modo que la mediana de la supervivencia después de reaparición es solamente de aproximadamente seis meses.

Los malos resultados pueden deberse a destrucción ineficaz de células iniciadoras de tumores o células madre cancerosas (CSC). Las CSC son capaces de autorrenovarse y también generan descendencia con un fenotipo diferenciado y autorrenovación limitada. Las CSC, como las células madre normales, son resistentes a quimioterapia y radioterapia debido a ventajas de supervivencia tales como aumento de la capacidad de reparación del ADN. De hecho, la quimioterapia convencional, por ejemplo, cisplatino y los regímenes de radioterapia expanden de hecho la población de células madre.

CD44 desempeña un papel crítico en la tumorigénesis. Una glucoproteína transmembrana, CD44 se une con el ácido hialurónico (HA) en la matriz extracelular y proteínas citoesqueléticas. Las interacciones entre CD44, HA, componentes citoesqueléticos y moléculas de señalización tales como ciclina D1, EGFR, Rho y Ras promueven el crecimiento y la migración. Adicionalmente, CD44 se libera de la membrana en forma soluble (solCD44) por metaloproteinasas de la matriz (MMP), un acontecimiento que es crítico para la migración celular. También se ha descubierto que CD44 es un marcador de CSC importante, hallado en cáncer de mama, cánceres colorrectales y HNSCC. También se ha mostrado que la actividad de CD44 presenta actividad en la formación de tumores en modelos de xenoinjerto; las células de tumor HNSCC CD44+ son tumorigénicas en ratones inmunocomprometidos, mientras que las células de tumor HNSCC CD44- produjeron tumores en los mismos modelos.

VFF-18, también designado BIWA 1, es un anticuerpo de alta afinidad para la variante v6 de CD44, específico para la región 360-370 del polipéptido. Diversas versiones o derivados de BIWA 1 han experimentado ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer. En particular, BIWA 1 se usó como un conjugado marcado con ^{99m}Tecnecio en un ensayo clínico de Fase 1 para el ensayo de seguridad y potencial de dirección en 12 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Cuarenta horas después de la inyección, el 14 por ciento de la dosis inyectada se captó por el tumor, con mínima acumulación en otros órganos tales como el riñón, el bazo y la médula ósea. Aunque la unión a tumor altamente selectiva sugiere un papel para BIWA 1 en radioinmunoterapia, la afinidad excepcionalmente alta de este anticuerpo evitó la penetración en las capas más profundas del tumor. Además, también se descubrió que BIWA era significativamente inmunogénico. Once de los doce pacientes del estudio desarrollaron anticuerpos humanos anti ratón (HAMA) que mostraron acumulación heterogénea en todo el tumor y condujeron a formación de complejos de CD44 soluble-anticuerpo.

El documento WO 02/094879 desvela versiones humanizadas de VFF-18 diseñadas para superar la respuesta HAMA, designadas BIWA 4 y BIWA 8. Se descubrió que BIWA 4 tenía una afinidad de unión a antígeno significativamente inferior en comparación con el anticuerpo parental VFF 18. Sin embargo, el anticuerpo BIWA 4 de menor afinidad demostró características de captación tumoral superiores en relación con el BIWA 8 de mayor afinidad. Se evaluaron anticuerpos BIWA 4 tanto marcados con ^{99m}Tecnecio como con ¹⁸⁶Renio en un ensayo clínico de Fase 1 de 33 pacientes para determinar la seguridad, tolerabilidad, acumulación tumoral y, para BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re, dosis máxima tolerada. Parecía haber una captación relacionada con el tumor de BIWA 4 marcado con ^{99m}Tc. No hubo respuestas tumorales observadas a ninguna dosis de BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re. Aunque varios pacientes demostraron enfermedad estable durante el transcurso del estudio, la toxicidad limitante de dosis sucedió a 60 mCi/m². Hubo una tasa del 50-65 por ciento de acontecimientos adversos considerándose que 12 de 33 pacientes tenían acontecimientos adversos graves (trombocitopenia, leucopenia y fiebre). Adicionalmente, 6 de

estos 12 pacientes, todos tratados con BIWA 4 marcado con ^{186}Re , murieron en el transcurso del tratamiento o el seguimiento debido a la progresión de la enfermedad. Dos pacientes también desarrollaron anticuerpos humanos anti humanos (HAHA). En consecuencia, el VFF-18 radiomarcado no consiguió demostrar ningún efecto clínico.

También se realizó un ensayo de aumento de dosis de Fase 1 de BIWA 4 marcado con ^{186}Re en 20 pacientes. Se observaron mucositis oral y trombocitopenia y leucocitopenia limitante de dosis; un paciente desarrolló una respuesta HAHA. Se vio enfermedad estable en 5 pacientes tratados a la mayor dosis de 60 mCi/m^2 . Aunque se considera que es aceptable tanto en seguridad como tolerabilidad en este intervalo de dosis, los estudios dieron como resultado solamente estabilización de la enfermedad. Adicionalmente, estos estudios tienen mayores tasas de acontecimientos adversos en comparación con otras terapias biológicas no conjugadas con radioisótopos en estudios clínicos.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos US 2003/0103985 desvela una versión humanizada de VFF-18 (BIWA 4) conjugada con un maitansinoide para su uso en terapia tumoral, designado BIWI 1. Se descubrió que BIWI 1 tenía efectos antitumorales significativos en modelos de ratón de carcinoma epidermoide humano de la vulva, carcinoma de células escamosas de la faringe y carcinoma de mama. La versión no conjugada, es decir, BIWA 4, no mostró efectos antitumorales. El conjugado BIWI 1 no tiene pruebas de seguridad o eficacia en seres humanos.

Mab U36 es un anticuerpo IgG1 monoclonal murino desarrollado por inmunización con células de carcinoma hipofaríngeo humano UM-SCC-22B y se seleccionó para especificidad de cáncer y tejido. La caracterización de antígenos mediante clonación de ADNc y análisis de secuencia identificó que el epítipo de Mab U36 estaba dentro del dominio v6 del epicán variante de corte y empalme de CD44 específico de queratinocitos. Los estudios de inmunohistoquímica muestran que el epítipo reconocido está restringido a la membrana celular. El Mab U36 marcó el 94 por ciento de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) fuertemente, y dentro de estos tumores hubo uniformidad en la tinción celular.

Da Cruz, (2008), European J. of Cancer, Suplemento, 6, página 170 menciona la expresión de CD44 en células cancerosas y que está en desarrollo para tratamiento el anticuerpo humanizado anti CD44 ARH460-16-2. El documento US 2009/004103 desvela que el ARH460-16-2 quimérico anti CD44 inhibe el crecimiento tumoral en células de cáncer prostático o cáncer de mama humano en modelos de xenoinjerto.

Un estudio de Mab U36 marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de 10 pacientes mostró acumulación selectiva del anticuerpo para cánceres HNSCC ($20,4 \pm 12,4$ por ciento de dosis inyectada/kg a los 2 días); no se presentaron efectos adversos pero dos pacientes desarrollaron HAMA. En un estudio de Mab U36 murino radioyodado, hubo 3 casos de HAMA en 18 pacientes y captación homogénea selectiva en HNSCC. Para reducir la antigenicidad de Mab U36 y reducir la tasa de HAMA, se construyó un anticuerpo quimérico, no mostrando ni el Mab U36 quimérico ni el murino original actividad ADCC. Sin embargo, el estudio no encontró pruebas de actividad antineoplásica de Mab U36 no marcado.

Se usó el Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re para determinar la utilidad de Mab U36 como un agente terapéutico. En este ensayo de aumento de dosis de Fase 1, 13 pacientes recibieron una dosis de exploración de Mab U36 quimérico marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ seguido de Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re . No se presentaron acontecimiento adversos agudos. Sin embargo, después del tratamiento, se observó mielotoxicidad limitante de dosis ($1,5 \text{ GBq/m}^2$) en 2 de 3 pacientes, y se observó trombocitopenia en un paciente tratado con la dosis máxima tolerada ($1,0 \text{ GBq/m}^2$). Aunque hubo algunos efectos en el tamaño tumoral, estos efectos no cumplieron los criterios para respuestas objetivas al tratamiento. Un estudio adicional de Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re empleó una estrategia de usar el factor estimulante de colonias de granulocitos para estimular la reinfusión de sangre completa para duplicar la actividad máxima tolerada a $2,8 \text{ Gy}$. En este estudio de nueve pacientes con diversos tumores de cabeza y cuello, 3 requirieron transfusiones para anemia relacionada con el fármaco. Otra toxicidad incluyó mielotoxicidad de grado 3 y mucositis de grado 2. No se presentaron respuestas tumorales objetivas, aunque se consiguió enfermedad estable durante 3-5 meses en 5 pacientes.

Debido al mal pronóstico para pacientes con HNSCC, el impacto de la enfermedad en la calidad de vida, y las opciones de tratamiento limitadas, hay un considerable interés en, y una necesidad acuciante para, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al HNSCC. Hasta la fecha no ha habido informes de un anticuerpo denominado "desnudo" (es decir no conjugado) anti CD44 que tenga eficacia en HNSCC. Por lo tanto, aunque parece que CD44 es una diana antineoplásica potencial para inmunoterapia, los anticuerpos anti CD44 requieren un radioinmunoconjugado para conseguir efectos antineoplásicos. Sin embargo, los estudios de anti CD44 radiomarcado han demostrado toxicidad inaceptable asociada con la terapia en relación con los efectos clínicos conseguidos. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevas terapias específicas de HNSCC.

El problema técnico que subyace en la presente invención es la provisión de métodos y medios para la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de HNSCC usando anticuerpos anti CD44 y, en algunos aspectos anticuerpos anti CD44 no marcados, particulares.

El problema técnico se resuelve por la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Se describen en el presente documento nuevos métodos para prevenir, tratar o diagnosticar carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) que comprenden el uso de anticuerpos anti CD44. La invención abarca el uso de anticuerpos anti CD44 que se unen con el dominio amino terminal del dominio extracelular de CD44 y/o que se unen inmuno-específicamente con una o más, preferentemente múltiples variantes humanas de CD44 como se expresa en seres humanos, para el tratamiento de HNSCC. Se describe en el presente documento el uso del anticuerpo anti CD44 producido por el hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-4621, y variantes y/o derivados del mismo, por ejemplo, versiones quiméricas y humanizadas de PTA-4621. También se describe el uso de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten por la unión con PTA-4621. En particular la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal anti CD44, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un mamífero, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44, en el que dicho anticuerpo comprende

(a) una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; o

(b) un dominio V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11;

en el que dicho anticuerpo compite por la unión con CD44 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de Referencia PTA-4621. La invención también se refiere a un anticuerpo anti CD44 humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un ser humano, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44 y en el que dicho anticuerpos humanizado comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, o comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.

Los anticuerpos y fragmentos usados de acuerdo con los métodos son específicos para CD44, en particular CD44 como se expresa en la superficie de una célula y, preferentemente, específicos para el dominio extracelular amino terminal de una o más variantes de CD44 humano, por ejemplo, como se expresa en la superficie de una célula de cáncer HNSCC. En ciertos aspectos los anticuerpos para su uso de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento son versiones humanizadas o quiméricas del anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-4621. Los anticuerpos para su uso de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden uno o más de

una CDR1 de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos de RYWMS (SEC ID N°: 3),

una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de EVNPDSTSINYTPSLKD (SEC ID N°: 4),

una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de PNYYGSRYHYAMDY (SEC ID N°: 5),

una CDR1 de dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de RASQDINNYLN (SEC ID N°: 6),

una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de YTSRLHS (SEC ID N°: 7); y

una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de QQGSTLPFT (SEC ID N°: 8).

Los anticuerpos como se usan en el presente documento pueden comprender también dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más y, en ciertos aspectos todos de una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8.

La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti CD44, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un mamífero, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44, en el que dicho anticuerpo comprende

(a) una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8;

o

(b) un dominio V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11;

en el que dicho anticuerpo compete por la unión con CD44 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de Referencia PTA-4621.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno para su uso de acuerdo con los métodos de la invención pueden comprender

un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de

EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLS CATSGFDFSR YWMSWVRQAPGKGL
EWIGEVPDSTSINYTPSLKDQFIISRDNAKNTLDLQMSKVSS EDTA
L YYCTRPNYYGSR YHYAMDYWGQGTSVTVSS (SEC ID N°: 1)

y/o un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQTSSLSVSLGDRVTINCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKL
LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLEKEDVATYFCQQGSTL
PFTFGSGTKLEIK (SEC ID N°: 2).

En ciertos aspectos la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.

La invención abarca además el uso de un anticuerpo anti CD44, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, para tratar, prevenir o diagnosticar un HNSCC, en el que el anticuerpo anti CD44 es humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo anti CD44 humanizado o fragmento de unión a antígeno comprende

un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSR YWMSWVRQAPGKGL
VWVGEVPDSTSINYTPSLKDRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCTRPNYYGSR YHYAMDYWGQGT LVTVSS (SEC ID N°: 9)

o

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDFSR YWMSWVRQAPGKGL
VWIGEVPDSTSINYTPSLKDQFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCTRPNYYGSR YHYAMDYWGQGT LVTVSS (SEC ID N°: 10)

y/o un dominio V_L que tiene la secuencia de

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKL
LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQGSTLP
FTFGQGTLEIK (SEC ID N°: 11).

En un aspecto particular, la invención proporciona un anticuerpo anti CD44 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en la prevención, tratamiento o diagnóstico de HNSCC en un sujeto, en el que dicho anticuerpo anti CD44 humanizado comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, o en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11. En aspectos particulares el sujeto es un ser humano. La invención

también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD44 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo para la prevención, tratamiento o diagnóstico de HNSCC en un sujeto, en el que dicho anticuerpo anti CD44 humanizado comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, o en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.

En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con los métodos de la invención reconoce el epítipo dentro del dominio amino terminal de la región extracelular de CD44 que tiene la secuencia de aminoácidos de AFDGPITITIV (SEC ID N°: 12).

Los anticuerpos anti CD44 para su uso de acuerdo con la invención pueden conjugarse con restos activos tales como restos terapéuticos o indicadores. Los anticuerpos anti CD44 también pueden conjugarse con células hematógenas del sujeto. En ciertos aspectos los restos terapéuticos son restos que se sabe en la técnica que son beneficiosos para el tratamiento, prevención o diagnóstico de HNSCC, tales como, pero sin limitación, una citotoxina, una enzima, un elemento radiactivo, una citocina, un antimetabolito o un interferón.

La invención también abarca anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso como terapias de agentes individuales o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o de diagnóstico y/o terapias. En consecuencia, la invención abarca anticuerpos anti CD44 (por ejemplo, anticuerpos humanizados o quiméricos), o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, para su uso en combinación con un régimen de tratamiento convencional o experimental para HNSCC (por ejemplo, quimioterapia, radioinmunoterapia o radioterapia). Los ejemplos de agentes terapéuticos que son particularmente útiles en combinación con un anticuerpo específico de CD44 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento para prevención, tratamiento o diagnóstico de HNSCC, incluyen, pero sin limitación, productos quimioterapéuticos como se conocen en la técnica, agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales y hormonas. Las terapias de combinación como se desvelan en el presente documento pueden permitir dosificaciones menores de un anticuerpo anti CD44 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y/o administración menos frecuente de anticuerpo anti CD44 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto con un HNSCC, para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico. De acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, los anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden coadministrarse, administrarse simultáneamente y/o administrarse secuencialmente con el o los otros agentes quimioterapéuticos o de diagnóstico, o puede administrarse junto con radioterapia o cirugía. La administración de los anticuerpos, fragmentos y/o agentes o terapias adicionales puede ser por cualquier medio conocido en la técnica que sea adecuado para suministrar el agente particular o terapia al sitio tumoral. Dicha administración puede ser parenteral (por ejemplo, administración IV, intramuscular o subcutánea), oral o, en ciertos aspectos, suministro directo al sitio tumoral o al sitio de aparición o reaparición de tumor sospechada. Los anticuerpos, fragmentos y/o composiciones también pueden administrarse como una formulación de liberación prolongada.

La invención proporciona además una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o diagnóstico de HNSCC en un sujeto que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD44 como se desvela en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado), o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan en el presente documento métodos de diagnóstico de HNSCC en un sujeto que se sospecha que tiene dicha enfermedad que comprenden: (i) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD44 como se desvela en el presente documento o fragmento de unión a antígeno del mismo; y (ii) detectar la unión de dicho anticuerpo o un fragmento del mismo en el que la detección de dicho anticuerpo o fragmento sobre un nivel de fondo o convencional indica que dicho sujeto tiene HNSCC. La detección del anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ayudarse del uso de un marcador detectable como se conoce en la técnica. La divulgación también abarca un kit de diagnóstico o pronóstico para la detección de HNSCC en una muestra tisular de un sujeto que se sabe o se sospecha que comprende células HNSCC. En ciertos aspectos, el kit comprende un medio para detectar CD44, en particular como se expresa por células de HNSCC y/o una muestra tisular de un sujeto que se sabe o se sospecha que contiene células HNSCC. El kit puede comprender (1) el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621, (2) un anticuerpo que compite por la unión con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621; (3) un anticuerpo que comprende una o más de una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; o (4) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (1), (2) o (3). El kit también puede comprender uno o más de: un sustrato o recipiente para contener una muestra biológica, patrón o patrones de referencia de biomarcador o biomarcadores en forma de solución o sólida (por ejemplo, CD44 o péptido unido específicamente por el anticuerpo producido por el anticuerpo PTA-4621), uno o más anticuerpos específicos para los biomarcadores (por ejemplo,

- anticuerpo PTA-4621 y fragmento de unión a antígeno del mismo, o una variante o derivado del mismo) e instrucciones para llevar a cabo el ensayo o ensayos de detección para los biomarcadores con los contenidos del kit. Es un objetivo adicional de la divulgación enseñar un método de tratamiento de HNSCC usando el anticuerpo PTA-4621 o fragmentos de unión a antígeno del mismo. Es otro objetivo de la divulgación enseñar el diagnóstico de HNSCC usando el anticuerpo PTA-4621 o fragmentos de unión a antígeno del mismo. Es un objetivo adicional de la divulgación enseñar el uso de PTA-4621 o fragmentos de unión a antígeno del mismo para el pronóstico o estadificación de HNSCC. Es un objetivo adicional de la divulgación enseñar el uso de PTA-4621 o fragmentos de unión a antígeno del mismo para la selección de un paciente para el tratamiento de un HNSCC.
- En ciertos aspectos, los anticuerpos anti CD44 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender una secuencia de aminoácidos de un dominio V_H y/o dominio V_L que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio V_H y/o dominio V_L del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-4621, siempre que los anticuerpos anti CD44 o fragmentos muestren especificidad de unión por CD44 y/o compitan por la unión con PTA-4621. La invención también abarca el uso de anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio V_H y/o dominio V_L que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y/o el dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, siempre que los anticuerpos anti CD44 o fragmentos muestren especificidad de unión por CD44 y/o compitan por la unión con PTA-4621. En ciertos aspectos, la presente invención abarca anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente con CD44 y que comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el hibridoma depositado en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-4621, siempre que dichos anticuerpos o fragmentos muestren especificidad de unión por CD44 y/o compitan por la unión con PTA-4621. La invención también abarca el uso de anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que son al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idénticas a una o más de una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8, siempre que dichos anticuerpos o fragmentos muestren especificidad de unión por CD44 y/o compitan por la unión con PTA-4621.
- Se desvela en el presente documento, en consecuencia, el uso de anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo específicos para CD44 o que compiten por la unión con el anticuerpo PTA-4621, en el que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) se han sustituido por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donante que se une específicamente con CD44, por ejemplo, del anticuerpo monoclonal murino producido por el clon PTA-4621. Preferentemente, el anticuerpo humanizado se une específicamente con el mismo epítipo que el anticuerpo murino donante. Se apreciará por un experto en la materia que la invención abarca injertos de CDR de anticuerpos en general. En aspectos particulares, la presente invención abarca el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente con CD44 y/o compiten por la unión con PTA-4621, comprendiendo dichos anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo una secuencia de aminoácidos de un dominio V_H y/o dominio V_L que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y/o el dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.
- Los anticuerpos anti CD44 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento pueden codificarse por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H , la cadena pesada completa, un dominio V_L o la cadena ligera completa del anticuerpo monoclonal murino PTA-4621. En otros aspectos, la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10. En otros aspectos, la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_L que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11. La invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con

la secuencia de nucleótidos que codifica una o más CDR del anticuerpo monoclonal murino PTA-4621, o la secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero sin limitación, (i) hibridación con ADN unido a filtro en cloruro sódico/citrato sódico 6X (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X/SDS 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C; (ii) condiciones altamente rigurosas tales como hibridación con ADN unido a filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,1X/SSC 0,2 % a aproximadamente 60 °C, o (iii) otras condiciones de hibridación rigurosas cualesquiera conocidas por los expertos en la materia.

También se desvela en el presente documento el uso de un vector que comprende los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento (es decir, ácidos nucleicos que codifican dominios V_H , dominios V_L y/o una o más CDR de anticuerpo anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno). Dicho vector puede ser un vector de expresión y las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos como se describen en el presente documento están unidas operativamente con secuencias reguladoras de ácido nucleico o secuencias que codifican secuencias reguladoras de aminoácidos (por ejemplo, señales de transcripción, traducción, translocación) necesarias para la expresión apropiada de las secuencias de aminoácidos codificadas. También se desvelan células hospedadoras que contienen los vectores o secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo desvelados en el presente documento.

La invención también se ilustra por los ejemplos adjuntos.

DEFINICIONES

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando se usa en el sumario, descripción, ejemplos y reivindicaciones.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores, anticuerpos desinmunizados, murinos, quiméricos, humanizados o humanos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, inmunoconjugados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv ligados a disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti Id y anti anti Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. La invención abarca el uso de moléculas de inmunoglobulina de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Un “fragmento de anticuerpo” o “fragmento de unión a antígeno” comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente que comprende la unión a antígeno o epítipo, o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos de menos de longitud completa, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, así como construcciones de los dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; anticuerpos monocatenarios, moléculas de anticuerpo de un único dominio, proteínas de fusión, proteínas recombinantes y anticuerpos multispecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpo.

Las formas “humanizadas” y/o “quiméricas” de los anticuerpos/inmunoglobulinas no humanos (por ejemplo murinos) se refieren a anticuerpos que comprenden inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) lo que da como resultado la reducción de una respuesta de anticuerpo humano anti ratón (HAMA), anticuerpo humano anti quimérico (HACA) o anticuerpo humano anti humano (HABA), en comparación con anticuerpo original, que contiene las partes necesarias (por ejemplo, CDR, región o regiones de unión a antígeno, dominio o dominios variables, etc.) derivadas de dicha inmunoglobulina no humana, necesarias para reproducir el efecto deseado, conservando a la vez simultáneamente características de unión que son comparables con dicha inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor por restos de las CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (por ejemplo, especificidad por CD44). En algunos casos, se reemplazan restos de región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana por restos de FR no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o FR importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, típicamente dos, dominios variables, en los que todas o

sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los restos de FR son los de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígenos. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "Región Determinante de Complementariedad" o "CDR" (por ejemplo los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada de acuerdo con Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los restos de "Región Marco conservada" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento. Como se usan en el presente documento, las expresiones "dominio variable de cadena pesada", "dominio V_H" y/o "V_H" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a la región hipervariable (que abarca los dominios tanto de CDR como de marco conservado) de la cadena pesada de un anticuerpo; las expresiones "dominio variable de cadena ligera", "dominio V_L" y/o "V_L" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a la región hipervariable (que abarca los dominios tanto de CDR como de marco conservado) de la cadena pesada de un anticuerpo.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se hace referencia a líneas celulares de hibridoma, así como a los anticuerpos monoclonales que se producen de las mismas, por el número de referencia de ATCC PTA-4621. La designación interna de este anticuerpo es ARH460-16-2. Por lo tanto, la referencia a PTA-4621 puede hacer referencia al clon de células de hibridoma depositado en la ATCC que produce un anticuerpo anti CD44, o puede hacer referencia al anti CD44 producido por el hibridoma en sí mismo. La referencia a PTA-4621 también se refiere al anticuerpo con la designación interna ARH460-16-2. En consecuencia, como se usa en el presente documento, las versiones químicas de PTA-4621 pueden denominarse "chPTA-4621" o "chARH460-16-2", y las versiones humanizadas de PTA-4621 pueden denominarse "huPTA-4621" o "huARH460-16-2". Un experto en la materia reconocerá inmediatamente a partir del contexto si se hace referencia al anticuerpo o al clon de hibridoma. El anticuerpo monoclonal murino anti CD44 PTA-4621 se descubrió usando la metodología para producir anticuerpos antineoplásicos específicos de paciente enseñada en la Patente de Estados Unidos 6.180.357. Usando el proceso, los ratones se inmunizaron con células tanto de una biopsia de tumor de pulmón de un paciente como de la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460. El anticuerpo se desvela en la Patente de Estados Unidos 7.252.821 y la línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 4 de septiembre de 2002, con el número de referencia PTA-4621. Este anticuerpo ha demostrado efectos antitumorales significativos en varios modelos de xenoinjerto preclínicos, incluyendo modelos *in vivo* tanto preventivos como establecidos de cáncer de mama humano (como se desvela en la Patente de Estados Unidos 7.252.821), en cáncer de hígado (como se desvela en la Patente de Estados Unidos 8.048.416) y en el cáncer de próstata (como se desvela en la Patente de Estados Unidos 7.507.537). Además, el tratamiento con PTA-4621 en combinación con un fármaco quimioterapéutico (Cisplatino) demostró actividad antitumoral en un modelo de cáncer de próstata *in vivo* establecido (misma referencia). Se desvelan versiones químicas y humanizadas del anticuerpo murino PTA-4621/ARH460-16-2 en la Patente de Estados Unidos 8.071.072.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por el método de hibridoma (murino o humano) descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

Un "anticuerpo modificador de enfermedad cancerosa" (CDMAB) se refiere a un anticuerpo monoclonal que modifica el proceso de enfermedad cancerosa de una manera que es beneficiosa para el paciente, por ejemplo reduciendo la carga tumoral o prolongando la supervivencia de individuos que portan tumores, y ligandos de anticuerpo del mismo.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que “se une” o “se une específicamente” con un antígeno de interés, por ejemplo, CD44, es uno capaz de unirse con ese antígeno con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico o de diagnóstico en la dirección de una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une con CD44, habitualmente se unirá preferentemente con CD44 a diferencia de otros receptores, y no incluye unión accidental tal como contacto de Fc no específico, o unión con modificaciones postraduccionales habituales para otros antígenos y puede ser uno que no reaccione de forma cruzada significativamente con otras proteínas. Se conocen bien en la técnica métodos para la detección de un anticuerpo que se una con un antígeno de interés y puede incluir pero sin limitación ensayos tales como FACS, ELISA de células y transferencia de Western.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para su uso de acuerdo con los métodos de la invención se unen específicamente con CD44, en particular, como se expresa en HNSCC y/o compiten por la unión con el anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 con CD44 usando métodos convencionales como se conocen en la técnica. CD44 media en un enlace directo entre la matriz extracelular y el citoesqueleto mediante sus regiones de unión a HA extracelulares conservadas y regiones de unión a anquirina intracelulares. También se liberan proteínas CD44 en forma soluble (solCD44) mediante proteasas y son detectables en circulación normal y saliva. El receptor de CD44 comprende una familia de isoformas expresadas en muchos tipos celulares. Estas isoformas surgen de corte y empalme alternativo de una región de exones variables (exones 5-14) presentes en el ARNm de CD44, dando como resultado “tallos” diferentes que conectan el dominio amino terminal de la región extracelular con el dominio transmembrana. Se encuentran isoformas en células normales como CD44 convencional (CD44s), CD44 epitelial (CD44E) o CD44v8-10, y CD44v3-10 en queratinocitos. Otras isoformas variantes de CD44 (CD44v) se expresan diferencialmente en algunos tumores. En aspectos particulares, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso de acuerdo con los métodos de la invención se unen de forma inmuno-específica con el dominio amino terminal de la región extracelular de CD44, mostrando de este modo especificidad para múltiples, y preferentemente todas las isoformas funcionales de CD44 expresadas en seres humanos. En aspectos particulares, la invención abarca el uso de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente con CD44 como se expresa por HNSCC. En ciertos aspectos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno para su uso de acuerdo con los métodos de la presente invención se unen con el epítipo del dominio amino terminal de la región extracelular de CD44 que tiene la secuencia de aminoácidos de AFDGPITIV (SEC ID N°: 12). Preferentemente, los anticuerpos para su uso de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento compiten por la unión con CD44 con PTA-4621 como se determina por métodos convencionales conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan de forma intercambiable, y todas estas designaciones incluyen descendencia. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia mutante que tenga la misma función o actividad biológica con respecto a la que se explora en la célula transformada originalmente. Resultará evidente a partir del contexto cuándo se entienden designaciones distintas.

Como se usa en el presente documento, la frase “administración directamente al cáncer o sitio tumoral” y frases análogas se refieren a la introducción directa o sustancialmente directa incluyendo, sin limitación, inyecciones individuales o múltiples de los anticuerpos, fragmentos o composiciones directamente al tumor o de forma peritumoral, perfusión continua o discontinua en el tumor o de forma peritumoral, introducción de un depósito en el tumor o de forma peritumoral, introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor o de forma peritumoral, introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor o de forma peritumoral, aplicación directa al tumor, inyección directa en una arteria que alimenta de forma sustancialmente directa el área del tumor, inyección directa a un vaso linfático que drene sustancialmente al área del tumor, introducción directa o sustancialmente directa en una cavidad sustancialmente cerrada (por ejemplo, cavidad pleural) o lumen (por ejemplo, intravesicular). “Peritumoral” es un término que describe una región, a una distancia de aproximadamente 10 cm, preferentemente a una distancia de 5 cm, más preferentemente a una distancia de 1 cm, de lo que se considera el límite del tumor, tal como, pero sin limitación, un límite de tumor palpable. “Administración directa” en el contexto de prevención de la aparición o prevención de la reaparición se define como administración directamente en un sitio en riesgo de desarrollo o reaparición de un cáncer.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “ácidos nucleicos”, “secuencia de ácido nucleico” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitación, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que proporcionan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa o una capacidad aumentada de cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener partes tanto monocatenarias como bicatenarias, y pueden contener partes tricatenarias, pero preferentemente es ADN bicatenario.

El término “hibridación” o “hibrida” como se usa en el presente documento puede referirse a hibridaciones en condiciones rigurosas o no rigurosas. Dichas condiciones de hibridación pueden establecerse de acuerdo con protocolos convencionales descritos, por ejemplo, en Sambrook, Russell; “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (2001); Ausubel; “Current Protocols in Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989), o Higgins y Hames (Eds.); “Nucleic acid hybridization, a practical approach” IRL Press Oxford, Washington DC, (1985). El ajuste de las condiciones está dentro de la experiencia de la técnica y puede determinarse de acuerdo con protocolos descritos en la técnica. Por lo tanto, la detección de secuencias que hibridan solamente de forma específica habitualmente requerirá hibridación rigurosa y condiciones de lavado tales como SSC 0,1 x, SSC 0,1 a 65 °C. Las condiciones de hibridación no rigurosas para la detección de secuencias homólogas o no exactamente complementarias pueden ajustarse a SSC 6 x, SDS 1 % a 65 °C. Como se conoce bien, la longitud de la sonda y la composición del ácido nucleico para determinar constituyen parámetros adicionales de las condiciones de hibridación. Obsérvese que las variaciones en las condiciones anteriores pueden conseguirse de acuerdo con métodos rutinarios en la técnica mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos usados para suprimir el fondo en experimentos de hibridación. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas disponibles en el mercado. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad. Las moléculas de ácido nucleico hibridantes también comprenden fragmentos de las moléculas anteriormente descritas. Dichos fragmentos pueden representar secuencias de ácido nucleico que codifican WAVE1 o un fragmento funcional del mismo que tienen una longitud de al menos 12 nucleótidos, preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 18, más preferentemente al menos 21 nucleótidos, más preferentemente al menos 30 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 40 nucleótidos y más preferentemente al menos 60 nucleótidos. Además, las moléculas de ácido nucleico que hibridan con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriormente mencionadas también incluyen fragmentos complementarios, derivados y variantes alélicas de estas moléculas. Adicionalmente, un complejo de hibridación se refiere a un complejo entre dos secuencias de ácido nucleico según la formación de enlaces de hidrógeno entre bases G y C complementarias y entre bases A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente por interacciones de acumulación de bases. Las dos secuencias de ácido nucleico complementarias se enlazan por hidrógeno en una configuración anti paralela. Puede formarse un complejo de hibridación en solución (por ejemplo, análisis de Cot o Rot) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, membranas filtros, microplacas, clavijas o portaobjetos de vidrio a los que, por ejemplo, se han fijado células). Los términos “complementario” o “complementariedad” se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones de sal y temperatura permisivas por formación de pares de bases. Por ejemplo, la secuencia “A-G-T” se une con la secuencia complementaria “T-C-A”. La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser “parcial”, porque solamente se unen algunos de los ácidos nucleicos, o puede ser completa cuando existe complementariedad total entre moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es particularmente importante en reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre cadenas de ácido nucleico.

La expresión “secuencias hibridantes” se refiere preferentemente a secuencias que presentan una identidad de secuencia de al menos 40 %, preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 60 %, aún más preferentemente al menos 70 %, particularmente preferentemente al menos 80 %, más particularmente preferentemente al menos 90 %, aún más particularmente preferentemente al menos 95 % y más preferentemente al menos 97 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente (es decir SEC ID N°: 1-11) que codifican el dominio V_H o dominio V_L de anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la invención y/o CDR de dichos anticuerpos anti CD44 o fragmentos.

De acuerdo con la presente invención, la expresión “idéntico” o “porcentaje de identidad” en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 60 % o 65 % de identidad, preferentemente 70-95 % de identidad, más preferentemente al menos 95 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, SEC ID N°: 1-11 o las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1-11) en comparación y alineadas para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o sobre una región designada como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencia como se conoce en la técnica, o por alineamiento manual e inspección visual. Se considera que las secuencias que tienen, por ejemplo, 60 % a 95 % o más identidad de secuencia son sustancialmente idénticas. Dicha definición también se aplica al complemento de una secuencia de ensayo. Los expertos en la materia sabrán como determinar el porcentaje de identidad entre secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson, Nucl. Acids Res. 2(1994) 4673-4680) o FASTDB (Brutlag, Comp. App. Biosci. 6(1990) 237-245), como se conoce en la técnica.

Aunque el algoritmo FASTDB típicamente no considera delecciones o adiciones no coincidentes internas en secuencias, es decir, huecos, en sus cálculos, esto puede corregirse manualmente para evitar una sobreestimación del porcentaje de identidad. CLUSTALW, sin embargo, sí tiene en cuenta huecos de secuencia en sus cálculos de identidad. También están disponibles para los expertos en la materia los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul,

Nucl. Acids Res. 25(1997) 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36(1993) 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215(1990) 403-410). El programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff, PNAS 89(1989) 10915) usa alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico cuya secuencia está degradada en comparación con la secuencia de una molécula hibridante anteriormente descrita. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención la expresión "estar degradada como resultado del código genético" significa que debido a la redundancia del código genético diferentes secuencias de nucleótidos codifican el mismo aminoácido.

Se usan técnicas informáticas análogas usando BLAST para moléculas idénticas o relacionadas en bases de datos de nucleótidos tales como GenBank o EMBL. Este análisis es mucho más rápido que múltiples hibridaciones basadas en membrana. Además, la sensibilidad de la búsqueda informática puede modificarse para determinar si se clasifica cualquier coincidencia particular como exacta o similar. La base de la búsqueda es la puntuación de producto que se define como:

$$\frac{\% \text{ de identidad de secuencia} \times \% \text{ de puntuación de BLAST máxima}}{100}$$

y se tiene en cuenta tanto el grado de similitud entre dos secuencias como la longitud de la coincidencia de secuencia. Por ejemplo, con una puntuación de producto de 40, la coincidencia será exacta con un margen de error del 1-2 %; y a 70, la coincidencia será exacta. Se identifican habitualmente moléculas similares seleccionando las que muestran puntuaciones de producto entre 15 y 40, aunque puntuaciones más bajas pueden identificar moléculas relacionadas. Otro ejemplo de un programa capaz de generar alineamientos de secuencia es el programa informático CLUSTALW (Thompson, Nucl. Acids Res. 2(1994) 4673-4680) o FASTDB (Brutlag, Comp. App. Biosci. 6(1990) 237-245), como se conoce en la técnica.

"Tratamiento o tratar" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir, aliviar o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico diana (por ejemplo, HNSCC), o uno o más síntomas asociados con el mismo. Los términos también se usan en el presente documento para indicar el retardo de la aparición de, inhibición (por ejemplo, reducción o detención del crecimiento de), alivio de los efectos de o prolongación de la vida de un paciente que padece cáncer, en particular, HNSCC. Las personas que necesitan tratamiento incluyen a las que se ha diagnosticado el trastorno, las que se sospecha que tienen el trastorno, las predispuestas a tener el trastorno así como en las que va a prevenirse el trastorno. Por lo tanto, puede diagnosticarse que el mamífero para tratar en el presente documento tiene el trastorno o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la erradicación, retirada, modificación o control de tejido canceroso primario, regional o metastásico que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos de acuerdo con los métodos de la invención. En otras realizaciones, dichos términos se refieren a la minimización o retardo de la propagación del cáncer que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad. En otras realizaciones, dichos términos se refieren a la eliminación de células que provocan enfermedad.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la aparición y/o reaparición o comienzo de uno o más síntomas de una enfermedad cancerosa en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Los individuos considerados en riesgo de desarrollar cáncer pueden beneficiarse particularmente de la invención, principalmente porque el tratamiento profiláctico puede comenzar antes de que haya ninguna prueba del trastorno (por ejemplo, lesiones pretumor maligno ("precáncer") o displasia que pueden ser visibles o no a simple vista, pero albergan cambios premalignos histológicos). Los individuos "en riesgo" incluyen, por ejemplo, individuos expuestos a carcinógenos, por ejemplo, por consumo, por ejemplo, por inhalación y/o ingestión, a niveles que se ha mostrado estadísticamente que promueven el cáncer en individuos susceptibles. También se incluyen individuos en riesgo debido a exposición a radiación ultravioleta, o su ambiente, ocupación y/o herencia, así como los que muestran señales de una afección precancerosa tales como pólipos. De forma similar, los individuos en estadios muy tempranos de cáncer o desarrollo de metástasis (es decir, solamente una o unas pocas células aberrantes están presentes en el cuerpo del individuo o en un sitio particular en el tejido de un individuo) pueden beneficiarse de dicho tratamiento profiláctico.

Las expresiones "cantidad eficaz" y "eficaz para tratar", como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o concentración de anticuerpo utilizado durante un periodo de tiempo (incluyendo administración aguda o crónica y administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para provocar un efecto o resultado fisiológico pretendido. Las cantidades eficaces de anticuerpo para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que inhiben el crecimiento de cáncer, por ejemplo, tumores y/o células

tumorales, mejoran el resultado para un paciente que padece o está en riesgo de cáncer, y mejoran el resultado de otros tratamientos de cáncer.

Los términos “paciente” y “sujeto” se usan de forma intercambiable y se usan a lo largo de la memoria descriptiva para describir a un animal, ser humano o no humano, a quien se proporciona tratamiento o diagnóstico de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Las expresiones “carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello” o HNSCC incluyen, pero sin limitación, cánceres de la boca, labio, cavidad nasal, senos paranasales, faringe, laringe, nasofaringe, garganta y tráquea.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer.

“Mamífero” para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, ratones, ratones o cepas de ratones SCID o desnudos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero en el presente documento es humano.

Como se usa en el presente documento, la expresión “en combinación” se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico, por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico además de los anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en el presente documento. El uso de la expresión “en combinación” no restringe el orden en el que se administran agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno, por ejemplo, HNSCC. Puede administrarse un primer agente profiláctico o terapéutico antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), simultáneamente con o posterior a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto que ha tenido, tiene o es susceptible de un trastorno. Los agentes profilácticos o terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo temporal de modo que el agente de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administrara de otro modo. Puede administrarse cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional en cualquier orden con los otros agentes profilácticos o terapéuticos adicionales. “En combinación” también puede referirse al uso de anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se desvela en el presente documento junto con modalidades de tratamiento antineoplásico convencionales como se conocen en la técnica, por ejemplo, radioterapia o cirugía.

Como se usa en el presente documento, un “inmunoconjugado” significa cualquiera molécula o CDMAB tal como un anticuerpo unido química o biológicamente a citotoxinas, agentes radiactivos, citocinas, interferones, restos diana o indicadores, enzimas, toxinas, fármacos antitumorales o agentes terapéuticos. El anticuerpo o CDMAB puede estar unido a la citotoxina, agente radiactivo, citocina, interferón, resto diana o indicador, enzima, toxina, fármaco antitumoral o agente terapéutico en cualquier localización a lo largo de la molécula siempre que sea capaz de unirse con su diana. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados químicos de toxina y anticuerpo y proteínas de fusión anticuerpo-toxina. Los inmunoconjugados pueden encontrar uso particular como agentes de diagnóstico.

Se conocen por los expertos en la materia agentes radiactivos adecuados para su uso como agentes antitumorales y/o en relación con los métodos de diagnóstico como se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse ^{131}I o ^{211}At . Estos isótopos se unen al anticuerpo usando técnicas convencionales (por ejemplo, Pedley *et al.*, Br. J. Cancer 68, 69-73 (1993)). Como alternativa, el agente antitumoral que se une con el anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. Puede administrarse un profármaco que permanecerá en su forma inactiva hasta que alcance el sitio tumoral donde se convierte en su forma de citotoxina una vez que se administre el complejo de anticuerpo. En la práctica, el conjugado de anticuerpo-enzima se administra al paciente y se permite que se localice en la región del tejido para tratar. Después se administra el profármaco al paciente de modo que la conversión del fármaco citotóxico se produzca en la región del tejido para tratar. Como alternativa, el agente antitumoral conjugado con el anticuerpo es una citocina tal como interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo dirige la citocina al tumor de modo que la citocina medie en el daño a o destrucción del tumor sin afectar a otros tejidos. La citocina se fusiona con un anticuerpo al nivel de ADN usando técnicas de ADN recombinante convencionales. También pueden usarse interferones.

Breve descripción de las figuras

Las figuras muestran:

La Figura 1 muestra histogramas de FACS representativos de anticuerpos ARH460-16-2 dirigidos contra las líneas celulares de HNSCC T.Tn, SCC-15 y Detroit-562 (Figura 1A) y CAL 27 (Figura 1B), que muestran que ARH460-16-2 se une con dichas líneas celulares. En la Figura 1A, el anticuerpo C225 (anti EGFR) actuó como control; en la Figura 1B, el anticuerpo anti CD20 RITUXANTM actuó como control.

- 5 La Figura 2 demuestra el efecto de chARH460-16-2 en el crecimiento tumoral en un modelo de HNSCC T.Tn humano establecido. Las líneas discontinuas verticales indican el periodo durante el que el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- La Figura 3 demuestra el efecto de un PTA-4621 quimérico en el peso corporal del ratón en un modelo de HNSCC T.Tn humano establecido. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- 10 La Figura 4 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el crecimiento tumoral en un modelo de HNSCC SCC-15 establecido. Las líneas discontinuas verticales indican el periodo durante el que el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- La Figura 5 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el peso corporal del ratón en un modelo de HNSCC SCC-15 establecido. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- 15 La Figura 6 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el crecimiento tumoral en un modelo de HNSCC Detroit 562 establecido. Las líneas discontinuas verticales indican el periodo durante el que el anticuerpo se administró por vía intraperitoneal. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- 20 La Figura 7 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el peso corporal del ratón en un modelo de HNSCC Detroit 562 establecido. Los puntos de datos representan la media +/- ETM.
- La Figura 8 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el volumen tumoral relativo en un modelo de HNSCC CAL 27 establecido.
- 25 La Figura 9 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de HNSCC CAL 27 establecido. El volumen tumoral se presenta como la media de grupo $\pm$ menos ETM. Las líneas discontinuas verticales indican el primer y el último día de dosificación.
- 30 La Figura 10 demuestra el efecto de PTA-4621 humanizado en el peso corporal del ratón en un modelo de HNSCC CAL 27 establecido. El peso corporal se presenta como la media de grupo $\pm$ ETM.
- La Figura 11 presenta la secuencia de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 (SEC ID N°: 1). Los restos de la secuencia se han enumerado de acuerdo con Kabat. Las CDR están subrayadas, y se identifican adicionalmente con guiones sobre la secuencia; la CDR1 de V_H (SEC ID N°: 3) corresponde a los restos 31 a 35, la CDR2 de V_H (SEC ID N°: 4) corresponde a los restos 50 a 65 y la CDR3 de V_H (SEC ID N°: 5) corresponde a los restos 95 a 102.
- 35 La Figura 12 presenta la secuencia de aminoácidos del dominio V_L del anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 (SEC ID N°: 2). Los restos de la secuencia se han enumerado de acuerdo con Kabat. Las CDR están subrayadas, y se identifican adicionalmente con guiones encima de la secuencia; la CDR1 de V_L (SEC ID N°: 6) corresponde a los restos 24 a 34, la CDR2 de V_L (SEC ID N°: 7) corresponde a los restos 50 a 67 y la CDR3 de V_L (SEC ID N°: 8) corresponde a los restos 89 a 97.
- 40 La Figura 13 presenta las secuencias de aminoácidos de dos dominios V_H humanizados alternativos basados en el anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 (SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10). Los restos de la secuencia se han enumerado de acuerdo con Kabat.
- 45 La Figura 14 presenta la secuencia de aminoácidos de un dominio V_L humanizado basado en el anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 (SEC ID N°: 11). Los restos de la secuencia se han enumerado de acuerdo con Kabat.
- 50

Descripción detallada

- 55 La presente invención resuelve el problema técnico identificado porque se mostró sorprendentemente que el anticuerpo anti CD44 PTA-4621 es eficaz en el tratamiento de HNSCC como un anticuerpo desnudo (es decir, no conjugado). Específicamente, a diferencia de terapia anti CD44 previa en modelos establecidos de HNSCC, las versiones quiméricas y humanizadas no conjugadas de PTA-4621 inhibieron significativamente y/o redujeron el crecimiento tumoral en modelos de HNSCC que comprendían xenoinjertos de células T.Tn, SCC-15, Detroit 562 y Cal 27.
- 60

- En consecuencia, la invención proporciona métodos para prevenir, tratar y/o aliviar la afección clínica de pacientes que padecen HNSCC que comprenden el uso de anticuerpos anti CD44, en particular, anticuerpos anti CD44 que compiten por la unión con el anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y/o anticuerpos anti CD44 que se unen inmuno-específicamente con el dominio amino terminal de la región extracelular de CD44 y reconocen una o más isoformas de CD44 expresadas en seres humanos. En ciertos
- 65

aspectos, la invención proporciona métodos para (i) reducir el tamaño, velocidad de crecimiento, invasividad, grado de malignidad y/o riesgo de reaparición del tumor de HNSCC, (ii) prolongar el intervalo sin enfermedad después del tratamiento y/o (iii) mejorar la respiración, deglución y/o función del habla en un paciente con HNSCC, que comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD44 como se desvela en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La mejora clínica puede determinarse de forma subjetiva u objetiva, por ejemplo evaluando la capacidad de un sujeto para respirar con menos dificultad, la capacidad del sujeto para tragar líquidos frente a sólidos, el grado de obstrucción, la calidad o el volumen del habla, y otros índices conocidos en la técnica clínica.

Los resultados clínicos de tratamientos de cáncer usando los métodos de la invención son fácilmente discernibles por un experto en la técnica relevante, tal como un médico. Por ejemplo, los ensayos médicos convencionales para medir marcadores clínicos de cáncer pueden ser fuertes indicadores de la eficacia del tratamiento. Dichos ensayos pueden incluir, sin limitación, examen físico, escalas de rendimiento, marcadores de enfermedad, ECG de 12 derivaciones, mediciones de tumor, biopsia tisular, cistoscopia, citología, cálculos del diámetro más largo del tumor, radiografía, captura de imágenes digitales del tumor, signos vitales, peso, registro de acontecimientos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicaciones simultáneas, evaluación del dolor, química de sangre o suero, análisis de orina, exploración de CT y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de una terapia de combinación que comprende el anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento de acuerdo con los métodos de la invención y otro producto terapéutico de cáncer pueden determinarse por estudios comparativos con pacientes que se someten a monoterapia.

Particularmente en el caso del HNSCC, se pueden determinar fácilmente las mejoras en respiración, deglución, habla y ciertas medidas de la calidad de vida. Adicionalmente, puede evaluarse la remisión del HNSCC usando criterios aceptados por los expertos en la materia, por ejemplo, Therasse *et al.*, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. 92(2000) 205-16.

En ciertas realizaciones, el cáncer es susceptible de tratamiento por administración directa de los anticuerpos anti CD44, fragmentos o composiciones como se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, una masa tumoral diana puede estar cerca de la superficie de la piel. En otro ejemplo, un tejido enfermo puede estar encapsulado por un quiste, o se encuentra en una cavidad sustancialmente cerrada incluyendo, sin limitación, un lumen. La dosis eficaz del anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento para administrar puede variar de acuerdo con el modo de administración. La administración directa (por ejemplo, inyección intratumoral) requiere dosis corporales totales mucho más pequeñas de los anticuerpos anti CD44 desvelados o fragmentos en comparación con administración sistémica, intravenosa. Resultará evidente para el experto en la materia que la administración local puede dar como resultado dosis corporales menores, y en esas circunstancias, y se esperaría y desearía un nivel de inmunotoxina en plasma en circulación bajo resultante. En dichos casos, el anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno como se desvela en el presente documento puede administrarse por vía intratumoral en una dosis total por ciclo equivalente a, o por debajo de la dosis máxima tolerada establecida en un ensayo de seguridad pero la dosificación está normalizada en relación con el volumen tumoral. En ciertas realizaciones, la dosis se administrará en un volumen que no excederá aproximadamente el 20-50 % del volumen tumoral.

La invención también proporciona métodos para reducir el riesgo de complicaciones postquirúrgicas que comprenden administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento, antes, durante o después de la cirugía para tratar el HNSCC.

La invención también proporciona métodos para prevenir la aparición, prevenir o retardar la reaparición, o reducir la tasa de reaparición de HNSCC que comprenden administrar (por ejemplo, administración directa) a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento. La administración directa de un anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento a un paciente que necesite dicho tratamiento puede dar como resultado dosis reducidas de otro producto terapéutico de cáncer que tenga eficacia clínicamente significativa. Dicha eficacia de la dosis reducida del otro producto terapéutico de cáncer puede no observarse sin los métodos de la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer que comprenden administrar una dosis reducida de uno o más productos terapéuticos de cáncer adicionales.

La invención también proporciona métodos para sensibilizar un tumor o cáncer a uno o más productos terapéuticos de cáncer adicionales que comprenden administrar un anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento. En una realización no limitante el otro producto terapéutico de cáncer comprende un producto quimioterapéutico conocido por su actividad contra HNSCC como se conoce en la técnica. En otra realización no limitante, el otro producto terapéutico de cáncer comprende radiación. El otro producto terapéutico de cáncer puede administrarse antes de, solapante con, simultáneamente con y/o después de la administración del anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento. Cuando se administra simultáneamente, el anticuerpo anti CD44, fragmento o composición como se desvela en el presente documento y otro producto terapéutico de cáncer pueden administrarse en una única formulación o en formulaciones separadas, y

si es por separado, entonces opcionalmente, por modos de administración diferentes. En consecuencia, la combinación de una o más inmunotoxinas y uno o más productos terapéuticos de cáncer adicionales pueden actuar de forma sinérgica para combatir el tumor o el cáncer.

Los anticuerpos anti CD44 para su uso en los métodos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden comprender un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10, un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 11, y/o una o más de CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8. En una realización específica, la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y un dominio V_L que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2. En otras realizaciones, la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, o que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11. En ciertas realizaciones, la invención abarca el uso de un anticuerpo anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cada una de una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8.

Los anticuerpos anti CD44 o fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos de la invención pueden estar (i) caracterizados con respecto a unión específica con CD44, en particular, con el dominio amino terminal de la región extracelular de CD44; (ii) caracterizados con respecto a unión específica con el epítipo del dominio amino terminal de la región extracelular de CD44 que tiene la secuencia de aminoácidos de AFDGPITITIV (SEC ID N°: 12); o (iii) caracterizados con respecto a competición por la unión con el anticuerpo monoclonal murino PTA-4621 usando cualquier método de base inmunológica o bioquímica conocido en la técnica para dicha caracterización incluyendo cuantificar la interacción del anticuerpo (específico) para CD44 o un epítipo del mismo. Puede determinarse la unión específica o competitiva de un anticuerpo de la invención con CD44 o un epítipo del mismo, por ejemplo, usando métodos de base inmunológica o bioquímica incluyendo, pero sin limitación, un ensayo de ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis en equilibrio. Los inmunoensayos incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solamente algunos. Dichos ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos humanizados de la invención también pueden ensayarse usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción del anticuerpo con un antígeno, por ejemplo, CD44. Puede usarse cualquier instrumento de SPR disponible en el mercado en la presente invención como se conoce en la técnica.

La invención contempla además el uso de CDMAB, por ejemplo, anticuerpos anti CD44 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con los que se unen restos diana o indicadores. Los restos diana son primeros miembros de pares de unión. Se conjugan agentes antitumorales, por ejemplo, con segundos miembros de dichos pares y se dirigen de este modo al sitio en el que se une la proteína de unión a antígeno. Un ejemplo habitual de dicho par de unión es avidina y biotina. En una realización preferida, la biotina se conjuga con el antígeno diana del CDMAB de la presente invención, y de este modo proporciona una diana para un agente antitumoral u otro resto que se conjuga con avidina o estreptavidina. Como alternativa, la biotina u otro de dichos restos se une con el antígeno diana del CDMAB de la presente invención y se usa como un indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en el que se conjuga un agente productor de señal detectable con avidina o estreptavidina. Además, un CDMAB de acuerdo con los métodos de la invención puede conjugarse con un agente terapéutico o resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o restos farmacológicos no deben interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina (por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica, ricina, gelonina), una enzima, una proteína (por ejemplo, factor de necrosis tumoral), un interferón (por ejemplo, interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β)), un agente apoptótico, un agente trombótico, un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina, endostatina) o un modificador de la respuesta biológica (por ejemplo, una linfoquina, factor estimulante de colonias de macrófagos o un factor de crecimiento), una proteasa, o una ribonucleasa. El CDMAB para su uso de acuerdo con los métodos de la invención también puede conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos. Un ejemplo habitual de un quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse con el anticuerpo mediante una

molécula enlazadora. Dichas moléculas enlazadoras se conocen habitualmente y se usan de forma rutinaria en la técnica.

Pueden usarse anticuerpos marcados, en particular, los anticuerpos anti CD44 o sus fragmentos de unión a antígeno como se desvela en el presente documento, en los métodos de la invención para fines de diagnóstico o pronóstico para detectar, diagnosticar o controlar la enfermedad de cáncer. Los marcadores como se describen en el presente documento son señales detectables acopladas con el anticuerpo anti CD44, o fragmento de unión a antígeno para su uso, por ejemplo, en métodos de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de la invención. El agente productor de señal produce una señal medible que es detectable por medios externos, habitualmente la medición de radiación electromagnética. En su mayor parte, el agente productor de señal es una enzima, o cromóforo o radionúclido, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de fracciones catalizadas por enzimas.

Además, se incluye dentro del alcance de la presente invención el uso de CDMAB *in vivo* e *in vitro* para métodos de investigación o diagnóstico, que se conocen bien en la técnica. Para llevar a cabo los métodos de diagnóstico como se contempla en el presente documento, la presente invención puede incluir además kits, que contienen CDMAB útiles en la presente invención. Dichos kits serán útiles para la identificación de individuos en riesgo de cierto tipo de cánceres detectando la sobreexpresión del antígeno diana de CDMAB en células de dicho individuo.

Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención pueden usarse como una composición para prevenir, tratar o diagnosticar cáncer. Estas composiciones tienen baja toxicidad y pueden administrarse como están en forma de preparaciones líquidas, o como composiciones farmacéuticas de preparaciones adecuadas para seres humanos o mamíferos por vía oral o por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravascular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, etc.). Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención pueden administrarse por sí solos, o pueden administrarse como composiciones apropiadas. Una composición usada para dicha administración puede contener un vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo o su sal, un diluyente o excipiente. Dicha composición se proporciona en forma de preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral.

Son ejemplos de la composición para administración parenteral preparaciones inyectables, supositorios, etc. Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación tales como inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones gota a gota, inyecciones intraarticulares, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como el medio acuoso para inyecciones están, por ejemplo, la solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes adyuvantes, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)), etc. Como el medio oleoso se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como bencil benzoato, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de este modo se carga habitualmente en una ampolla apropiada. El supositorio usado para administración rectal puede prepararse mezclando un anticuerpo de la presente invención o su sal con bases convencionales para supositorios. La composición para administración oral incluye preparaciones sólidas o líquidas, específicamente, comprimidos (incluyendo grageas y comprimidos recubiertos con película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Dicha composición se fabrica por métodos públicamente conocidos y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente convencionalmente usado en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Son ejemplos del vehículo o excipiente para comprimidos lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio, etc.

Provechosamente, las composiciones para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en preparaciones farmacéuticas con una dosis unitaria adecuada para encajar una dosis de los principios activos. Dichas preparaciones de dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

La dosis del agente profiláctico/terapéutico anteriormente mencionado que comprende el anticuerpo de acuerdo con los métodos de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto para administrar, enfermedad diana, condiciones, vía de administración, etc. Por ejemplo, cuando se usa para el fin de tratar/prevenir, por ejemplo, HNSCC en un adulto, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 0,0001 mg/kg a 200 mg/kg o de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. En otros aspectos, la dosificación administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a

la respuesta inmunitaria de los polipéptidos ajenos. Por lo tanto, son con frecuencia posibles dosificaciones menores de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos puede reducirse potenciando la captación y penetración tisular de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación. En otros aspectos, los anticuerpos de la invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un sujeto es menor que cuando dichos anticuerpos se usan como una terapia de un único agente.

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y frecuencia variarán típicamente además de acuerdo con factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico anterior del paciente. Pueden seleccionarse regímenes adecuados por un experto en la materia teniendo en cuenta dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones indicadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002). La dosificación diaria del anticuerpo, fragmento o composición de la invención pueden administrarse como una única dosis de embolada o dividida en múltiples dosis para suministrar durante un periodo de 24 horas. Como alternativa, la dosificación diaria total puede administrarse durante un periodo prolongado de tiempo mediante, por ejemplo, una infusión, de modo que la dosificación total se administre durante 12 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas, 1,5 horas, 1,0 horas, 45 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 9 minutos, 8 minutos, 7 minutos, 6 minutos, 5 minutos, 4 minutos, 3 minutos, 2 minutos o 1 minuto. Cuando la afección es especialmente grave, la dosis puede aumentarse de acuerdo con la afección.

El anticuerpo para su uso de acuerdo con los métodos de la presente invención puede administrarse tal como está o en forma de una composición apropiada. La composición usada para la administración puede contener un vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo anteriormente mencionado o sus sales, un diluyente o excipiente. Dicha composición se proporciona en forma de preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.). Cada composición descrita anteriormente puede contener además otros principios activos. Además, el anticuerpo de la presente invención puede usarse en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato, 5-fluorouracilo, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina, etc.), agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol, etc.), cisplatino, carboplatino, etopósido, irinotecán, etc. El anticuerpo de la presente invención y los fármacos descritos anteriormente pueden administrarse de forma simultánea o en momentos escalonados al paciente. Los métodos para administrar un anticuerpo humanizado de la invención incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, los anticuerpos de la invención se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de embolada, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización.

Los regímenes de agente quimioterapéutico/otro anticuerpo utilizados incluyen cualquier régimen que se crea que es óptimamente adecuado para el tratamiento de la afección del paciente. Diferentes tumores malignos pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y agentes quimioterapéuticos específicos, que se determinarán paciente a paciente. En una realización preferida de la invención, se administra quimioterapia simultáneamente con o, más preferentemente, después de terapia de anticuerpos. Debería enfatizarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ningún método o vía de administración particular.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes en los mismos. Cualquier oligonucleótido, péptido, polipéptido, compuesto biológicamente relacionado, método, procedimiento y técnica descrito en el presente documento es representativo en la actualidad de las realizaciones preferidas, se pretende que sea ejemplar y no se pretende que sea una limitación del alcance.

También están abarcados por la divulgación los siguientes artículos:

Artículo 1: Un método para el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero un anticuerpo monoclonal anti CD44 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad eficaz para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de dicho mamífero.

Artículo 2: El método del artículo 1 en el que el anticuerpo monoclonal anti CD44 es ARH460-16-2.

- Artículo 3: El método del artículo 2 en el que dicho anticuerpo monoclonal está conjugado con un resto citotóxico.
- Artículo 4: El método del artículo 1 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621 o un fragmento de unión a antígeno producido a partir de dicho anticuerpo humanizado.
- 5 Artículo 5: El método del artículo 1 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión quimérica del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621 o un fragmento de unión a antígeno producido a partir de dicho anticuerpo quimérico.
- Artículo 6: El uso de un anticuerpo monoclonal anti CD44 u otro fragmento de unión a antígeno del mismo para el tratamiento de HNSCC en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero dicho anticuerpo monoclonal anti CD44 o fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad eficaz para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de dicho mamífero.
- 10 Artículo 7: El uso del artículo 6 en el que el anticuerpo monoclonal anti CD44 es ARH460-16-2.
- Artículo 8: El uso del artículo 7 en el que dicho anticuerpo monoclonal está conjugado con un resto citotóxico.
- Artículo 9: El uso del artículo 6 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621.
- 15 Artículo 10: El uso del artículo 6 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión quimérica del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621.
- Artículo 11: Un método para el tratamiento de HNSCC en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero un anticuerpo monoclonal anti CD44 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; junto con al menos un agente quimioterapéutico en una cantidad eficaz para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de dicho mamífero.
- 20 Artículo 12: El método del artículo 13 en el que el anticuerpo monoclonal anti CD44 es ARH460-16-2.
- Artículo 13: El método del artículo 14 en el que dicho anticuerpo monoclonal o CDMAB está conjugado con dicho agente quimioterapéutico.
- 25 Artículo 14: El método del artículo 15 en el que dicho agente quimioterapéutico es un resto citotóxico.
- Artículo 15: El método del artículo 11 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621.
- Artículo 16: El método del artículo 11 en el que dicho anticuerpo monoclonal es una versión quimérica del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PAT-4621.
- 30 Artículo 17: Una composición eficaz para el tratamiento de HNSCC que comprende en combinación: un anticuerpo monoclonal anti CD44 producido por un hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y una cantidad necesaria de un vehículo farmacológicamente aceptable; en el que dicha composición es eficaz para tratar dicho HNSCC.
- 35 Artículo 18: La composición del artículo 17, que incluye además un conjugado de dicho anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo con un miembro seleccionado del grupo que consiste en restos citotóxicos, enzimas, compuestos radiactivos, citocinas, interferones, restos diana o indicadores y células hematógenas.
- 40 Artículo 19: Un kit de ensayo para detectar la presencia de HNSCC, en el que dicho HNSCC expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el kit el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con un polipéptido cuya presencia, en un nivel de punto de corte particular, es diagnóstico de dicha presencia de dicho HNSCC.
- 45

Para que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Unión *in vitro* con líneas celulares de HNSCC.

Se desarrollaron versiones quiméricas y humanizadas de PTA-4621 como se desvelan en el presente documento. PTA-4621 quimérico ("chPTA-4621") comprende los dominios V_H y V_L que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente. Se desarrollaron dos versiones humanizadas de PTA-4621 (huPTA-4621), que tenían diferencias menores en la secuencia de aminoácidos de sus dominios variables de cadena pesada. huPTA-4621 comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11. La afinidad de unión a antígeno y avidez de las dos versiones de huPTA-4621 fueron indistinguibles usando ensayos convencionales como se conocen en la técnica.

La unión de chPTA-4621 y huPTA-4621 con líneas celulares de HNSCC T.Tn, SCC-15, Detroit-562 y CALL 27 se evaluó por citometría de flujo (FACS). Las células se prepararon para FACS lavando inicialmente la monocapa celular con DPBS (sin Ca^{++} y Mg^{++}). Se usó después bien el tampón de disociación celular (INVITROGEN, Burlington, ON; para T.Tn, SCC-15 y Detroit-562) o bien la solución de separación celular ACCUTASE™ (SIGMA, St. Lois, MO, Estados Unidos, para CAL 27) para sacar las células de sus placas de cultivo celular a 37 °C. Después de centrifugación y recogida, las células se resuspendieron en DPBS que contenía MgCl_2 , CaCl_2 y suero bovino fetal al 2 por ciento (T.Tn, SCC-15 y Detroit-562) o 3 por ciento (CAL 27) a 4 °C (medio de tinción) y se contaron, se separaron alícuotas a la densidad celular apropiada, se centrifugaron para sedimentar las células y se resuspendieron en medio de tinción a 4 °C en presencia de anticuerpos de ensayo (PTA-4621 quimérico o humanizado) o anticuerpos de control (control de isotipo, anti EGFR (C225; T.Tn, SCC-15 y Detroit-562) o anti CD20 (RITUXAN™; CAL27)). Los anticuerpos de ensayo y de control de isotipo se evaluaron a 20 µg/ml en hielo durante 30 minutos. Para la detección de anticuerpo unido, se usó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546 para los de células T.Tn, SCC-15 y Detroit-562 y se usó un anticuerpo secundario conjugado con APC en los ensayos de CLA 27. Antes de la adición del anticuerpo secundario, las células se lavaron una vez con medio de tinción. El anticuerpo secundario en medio de tinción se añadió después de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron después por última vez y se resuspendieron en medio de fijación (medio de tinción que contenía paraformaldehído 1,5 %). Se evaluó la adquisición citométrica de flujo de las células T.Tn, SCC-15 y Detroit-562 procesando muestras en un FACScan usando el software CellQuest (BD Biosciences, Oakville, ON), mientras que la adquisición de las células CAL 27 se evaluó procesando muestras en un LSR-II usando el Software del sistema Diva 6 (BD Biosciences, Rockville, MD Estados Unidos). La dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de las células se preparó ajustando la tensión y aumentos de amplitud en los detectores de FSC y SSC. Los detectores para el canal de fluorescencia (FITC o APC) se ajustaron procesando células no teñidas (CAL 27) o teñidas solamente con anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546 (T.Tn, SCC-15 y Detroit-562) de modo que las células tuvieron un pico uniforme con una mediana de la intensidad fluorescente de aproximadamente 1-5 unidades. Para cada muestra, se adquirieron aproximadamente 10.000 células fijadas teñidas para análisis y los resultados se presentan en la Figura 1A-B.

En resumen, los datos obtenidos muestran que las versiones quiméricas y humanizadas de PTA-4621 se unen con las líneas celulares T.Tn, SCC-15 y Detroit-562 (Figura 1A) y CAL 27 (Figura 1B).

EJEMPLO 2

Experimento *in vivo* con células T.Tn humanas

Para demostrar la eficacia contra una línea celular de cáncer HNSCC humana *in vivo*, se ensayó PTA-4621 quimérico (chPTA-4621) en un modelo de xenoinjerto de HNSCC T.Tn establecido. Con referencia a las Figuras 2 y 3, se implantaron en ratones SCID hembra de 6 a 8 semanas de edad 10 millones de células T.Tn en 100 microlitros de solución de PBS inyectada por vía subcutánea en el flanco derecho. Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento de 10. Cuando el volumen tumoral medio de los ratones alcanzó aproximadamente 264-268 mm³, se administraron 20 mg/kg del anticuerpo de ensayo chPTA-4621 o control de tampón por vía intraperitoneal a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de dilución de la concentración de reserva con un diluyente que contenía KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y Na_2HPO_4 20 mM. Las muestras de anticuerpo y de control se administraron después 3 veces por semana durante el transcurso del estudio. El crecimiento tumoral se midió aproximadamente cada 7 días con calibradores. El estudio se completó después de 10 dosis de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales se registraron una vez a la semana durante el transcurso del estudio. Al final del estudio los animales se sacrificaron de acuerdo con las directrices de CCAC.

chPTA-4621 redujo el crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* de T.Tn de HNSCC humano. El tratamiento con anticuerpo chPTA-4621 redujo el crecimiento de tumores T.Tn en 54,9 por ciento ($p=0,0068$, ensayo de t) en comparación con el grupo tratado con tampón, como se determinó el día 105, el último día del periodo de estudio (Figura 2).

No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto del bienestar e incapacidad para desarrollarse (Figura 3). No hubo diferencias significativas en el peso corporal medio entre los grupos al final del periodo de tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas en el peso corporal medio dentro de cada grupo desde el inicio al final del estudio.

En resumen, chPTA-4621 se toleró bien y redujo significativamente la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de HNSCC humano.

EJEMPLO 3

Experimento *in vivo* con células SCC-15 humanas

Para demostrar la eficacia contra una línea celular de cáncer HNSCC humana *in vivo*, se ensayó PTA-4621 humanizado (huPTA-4621) en un modelo de xenoinjerto de HNSCC SCC-15. Con referencia a las Figuras 4 y 5, se

implantaron en ratones SCID hembra de 6 a 8 semanas de edad 3 millones de células SCC-15 en 100 microlitros de solución de PBS inyectada por vía subcutánea en el flanco derecho. Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento de 10. Cuando el volumen tumoral medio de los ratones alcanzó aproximadamente 233-235 mm³, se administraron 30 mg/kg del anticuerpo de ensayo huPTA-4621 o control de tampón HNT por vía intraperitoneal a cada cohorte en un volumen de 100 microlitros después de dilución de la concentración de reserva con un diluyente que contenía Histidina HCl 20 mM, NaCl 150 mM y polisorbato 80 0,01 %, pH 6,0. El anticuerpo y las muestras de control se administraron después 1 vez por semana durante el transcurso del estudio. El crecimiento tumoral se midió aproximadamente cada 7 días con calibradores. El estudio se completó después de 4 dosis de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales se registraron una vez a la semana durante el transcurso del estudio. Al final del estudio todos los animales se sacrificaron de acuerdo con las directrices de CCAC.

huPTA-4621 redujo el crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* de SCC-15 de HNSCC humano. El tratamiento con anticuerpo huPTA-4621 redujo el crecimiento de tumores SCC-15 en 44,5 por ciento ($p=0,0379$, ensayo de t) en comparación con el grupo tratado con tampón, como se determinó el día 23, el último día del periodo de estudio (Figura 4).

No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto del bienestar y la incapacidad para desarrollarse (Figura 5). No hubo diferencias significativas en el peso corporal medio entre los grupos al final del periodo de tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas en el peso corporal medio dentro de cada grupo desde el inicio al final del estudio.

En resumen, huPTA-4621 se toleró bien y redujo significativamente la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de HNSCC humano.

EJEMPLO 4

Experimento *in vivo* con células Detroit 562 humanas

Para demostrar la eficacia contra una línea celular de cáncer HNSCC humana *in vivo*, se ensayó huPTA-4621 en un modelo de xenoinjerto de HNSCC Detroit 562. Con referencia a las Figuras 6 y 7, se implantaron en ratones SCID hembra de 6 a 8 semanas de edad 3 millones de células Detroit 562 en 100 microlitros de solución de PBS inyectada por vía subcutánea en el flanco derecho. Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento de 10. Cuando el volumen tumoral medio de los ratones alcanzó aproximadamente 188-192 mm³, se administraron 30 mg/kg de anticuerpo de ensayo huPTA-4621 o control de tampón por vía intraperitoneal a cada cohorte en un volumen de 100 microlitros después de dilución de la concentración de reserva con un diluyente que contenía Histidina HCl 20 mM, NaCl 150 mM y polisorbato 80 0,01 %, pH 6,0. Las muestras de anticuerpo y de control se administraron después 1 vez a la semana durante el transcurso del estudio. El crecimiento tumoral se midió aproximadamente cada 7 días con calibradores. El estudio se completó después de 5 dosis de anticuerpo. Los pesos corporales de los animales se registraron una vez a la semana durante el transcurso del estudio. Al final del estudio todos los animales se sacrificaron de acuerdo con las directrices de CCAC.

huPTA-4621 redujo el crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* Detroit 562 de HNSCC humano. El tratamiento con anticuerpo huPTA-4621 redujo el crecimiento de tumores T.Tn en 52,1 por ciento ($p=0,0259$, ensayo de t) en comparación con el grupo tratado con tampón, como se determinó el día 42, el último día del periodo de estudio (Figura 6).

No hubo señales clínicas de toxicidad durante el transcurso del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto del bienestar y la incapacidad de desarrollarse (Figura 7). No hubo diferencias significativas en el peso corporal medio entre los grupos al final del periodo de tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas en el peso corporal medio dentro de cada grupo desde el inicio al final del estudio.

En resumen, huPTA-4621 se toleró bien y redujo significativamente la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de HNSCC humano.

EJEMPLO 5

Experimento *in vivo* con células CAL 27 humanas

Para demostrar la eficacia contra una línea celular de cáncer HNSCC humana *in vivo*, se ensayó huPTA-4621 en un modelo de xenoinjerto de HNSCC CAL 27 que comprendía ratones desnudos (NU/J, cepa N°: 002019, Jackson Laboratories) a los que se habían implantado las células CAL27 (ATCC CRL-2095). Las células CAL 27 se cultivaron en DMEM (ATCC, N° de Catálogo 30-2002) complementado con FBS 10 % (ATCC N° de Catálogo 30-2020) en matraces de 75 mm² a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5 % en aire hasta que las células fueron confluentes. Se separaron células CAL 27 humanas de los matraces de cultivo usando tripsina 0,25 % (p/v) (Invitrogen, N° de Catálogo 25200), se contaron, se disolvieron en PBS y se inyectaron por vía subcutánea en la región de la espalda media de ratones desnudos macho de 7 semanas de edad a una dosis de 3×10^6 células/animal con Matrigel™ (BD

Biosciences, N° de Catálogo 354248) en 0,2 ml de volumen (100 µl de células en PBS + 100 µl de Matrigel). Después de la inyección de las células, transcurre un periodo de dos semanas para permitir la formación de nódulos tumorales. Los volúmenes tumorales (mm³) se midieron con un calibrador digital (VWR, N° de Catálogo 36934-152) y se estimaron por la fórmula elipsoide: $[\pi/6] \times a \times b^2$, en la que a y b son la primera y segunda mediciones ortogonales mayores del tumor en mm. Cuando el volumen tumoral alcanzó 400-600 mm³, los animales se seleccionaron aleatoriamente en dos grupos (n=5). Se administró anticuerpo monoclonal huPTA-4621 e IgG1 humano (Sigma, 15154) a 3 mg/kg por inyección intraperitoneal 3 veces a la semana para un total de 10 dosis. Los nódulos tumorales se controlaron tres veces por semana usando un calibrador digital. La actividad antitumoral se determinó con respecto a inhibición del crecimiento tumoral primario calculando el Volumen Tumoral Relativo (RTV) de acuerdo con la siguiente fórmula: $RTV = TV_n / TV_0$, en la que TV_n es el volumen tumoral el día n y TV₀ es el volumen tumoral el día 0. El tamaño del tumor se siguió hasta el día 27. Después de 27 días de terapia se determinó el porcentaje de T/C calculando RTV como % de TC=100x (RTV medio del grupo tratado/(RTV medio del grupo de control). Se descubrió una inhibición del crecimiento tumoral del 60 % en el grupo tratado con anticuerpos (Figura 8), lo que indica que el tratamiento fue eficaz en el alivio de la carga tumoral (P<0,0002).

Estos datos demuestran claramente que huPTA-4621 tiene actividad terapéutica significativa contra tumores de xenoinjerto de CAL 27 ensayados en este estudio.

EJEMPLO 6

Experimento *in vivo* con células CAL 27 humanas

Para comparar la eficacia de la terapia con el anticuerpo PTA-4621 con el tratamiento quimioterapéutico convencional, el sistema modelo descrito en el Ejemplo 5 se usó para comparar la terapia con PTA-4621 con el tratamiento con cisplatino. Las células CAL27 se cultivaron y recogieron como se ha descrito en el Ejemplo 5. El modelo de xenoinjerto de CAL 27 se estableció inyectando por vía subcutánea ratones desnudos macho de 7 semanas de edad (NU/J, cepa N°: 002019, Jackson Laboratories) en la región de la espalda media 5 X 10⁶ células CAL 27 en 100 µl de D-PBS con 100 µl de Matrigel. A los 18 días después de la inoculación, los ratones se evaluaron con respecto a formación de tumores y se seleccionaron aleatoriamente en 3 grupos (para cada cohorte, n=6): tratamiento con huPTA-4621, tratamiento con cisplatino o control (tratamiento con anticuerpo IgG1 de control irrelevante). Se midieron los volúmenes tumorales (mm³) con un calibrador digital (VWR, N° de Catálogo 36934-152) y se estimó por la fórmula elipsoide: $[\pi/6] \times a \times b^2$, en la que a y b son la primera y segunda mayores mediciones ortogonales del tumor en mm. En la selección aleatoria, el volumen tumoral medio fue 84 mm³ (intervalo 79-94 mm³).

En la selección aleatoria se administró i.p. a los animales anticuerpo de ensayo o de control a una dosis de 3 mg/kg, o cisplatino a una dosis de 0,75 mg/kg. El volumen de administración para todos los tratamientos fue de 6,6 ml/kg. Los tratamientos de anticuerpo y control se administraron a continuación 3 veces a la semana durante las semanas primera y tercera, y dos veces a la semana durante la segunda semana, dando como resultado un total de ocho tratamientos. Una semana después del último tratamiento los animales se sacrificaron de acuerdo con las directrices de CCAC; el estudio se completó el día 46, se midió el crecimiento tumoral y peso corporal tres veces a la semana durante el transcurso del estudio.

La actividad antitumoral se determinó con respecto a inhibición de crecimiento tumoral primario calculando el Volumen Tumoral Relativo (RTV) de acuerdo con la siguiente fórmula: $RTV = TV_n / TV_0$, en la que TV_n es el volumen tumoral el día n y TV₀ es el volumen tumoral el día 0. El tamaño tumoral se siguió hasta el día 46. Tras completar el estudio, se determinó el porcentaje de T/C calculando RTV como % de T/C=100x (RTV medio del grupo tratado/(RTV medio del grupo de control). Se encontró una inhibición del crecimiento tumoral del 86 % en el grupo tratado con anticuerpos (Figura 9), lo que indica que el tratamiento fue eficaz en el alivio de la carga tumoral (p=0,024). No se observó inhibición del crecimiento significativa en el grupo tratado con cisplatino en comparación con el control (Figura 9). En consecuencia, huPTA-4621 redujo el crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* de CAL 27 de HNSCC humano.

No hubo diferencias significativas en el peso corporal medio entre los grupos al final del periodo de tratamiento. No hubo tampoco diferencias significativas en el peso corporal medio dentro de cada grupo desde el inicio al final del estudio (Figura 10). Se sacrificó un animal en el grupo de IgG1 de control el día 26 debido a que había alcanzado los puntos finales de IACUC para la determinación del estudio.

En resumen, huPTA-4621 se toleró bien y redujo significativamente la carga tumoral en relación con productos quimioterapéuticos convencionales (cisplatino) en este modelo de xenoinjerto de HNSCC humano.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
Universidad de Miami - Departamento de Medicina

<120> MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO

<130> 26583 WO

<150> US 61/301.449

<151> 04-02-2010

<160> 12

<170> Patent In versión 3.2

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Val Asn Pro Asp Ser Thr Ser Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Gln Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Ser Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 460 945 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Lys
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

Asp

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

ES 2 460 945 T3

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 6

 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

 10
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15
 <400> 7

 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

 20
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25
 <400> 8

 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Phe Thr
 1 5

 30
 <210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

 Gly Glu Val Asn Pro Asp Ser Thr Ser Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 35

ES 2 460 945 T3

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Val Asn Pro Asp Ser Thr Ser Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 460 945 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 11

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo monoclonal anti CD44, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un mamífero, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44, en el que dicho anticuerpo comprende

(a) una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; o

(b) un dominio V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11;

en el que dicho anticuerpo compite por la unión con CD44 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de Referencia PTA-4621.

2. Un anticuerpo monoclonal anti CD44, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un mamífero, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44, en el que dicho anticuerpo comprende

(a) una CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, una CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, una CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; o

(b) un dominio V_H que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica al dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11;

en el que dicho anticuerpo compite por la unión con CD44 con el anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de Referencia PTA-4621.

3. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD44 es una versión quimérica del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621.

4. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD44 es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-4621.

5. El uso de la reivindicación 1 o 3, o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1.

6. El uso de la reivindicación 1, 3 o 5, o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 2, 3 o 5, en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.

7. El uso de la reivindicación 1 o 4, o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 10.

8. El uso de la reivindicación 1, 4 o 7, o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con la reivindicación 1, 4 o 7, en el que dicho anticuerpo anti CD44 comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, o el anticuerpo o fragmento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que dicho anticuerpo o fragmento se conjuga con un producto terapéutico o resto indicador o con células hematógenas.

10. Uso de un anticuerpo humanizado anti CD44, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un ser humano, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44 y en el que dicho anticuerpo humanizado

comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, o comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.

- 5 11. Un anticuerpo anti CD44 humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso en el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un ser humano, en el que dicho HNSCC se caracteriza por la expresión de CD44 y en el que dicho anticuerpo humanizado comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, o comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 y un dominio V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11.
- 10

FIGURA 1A

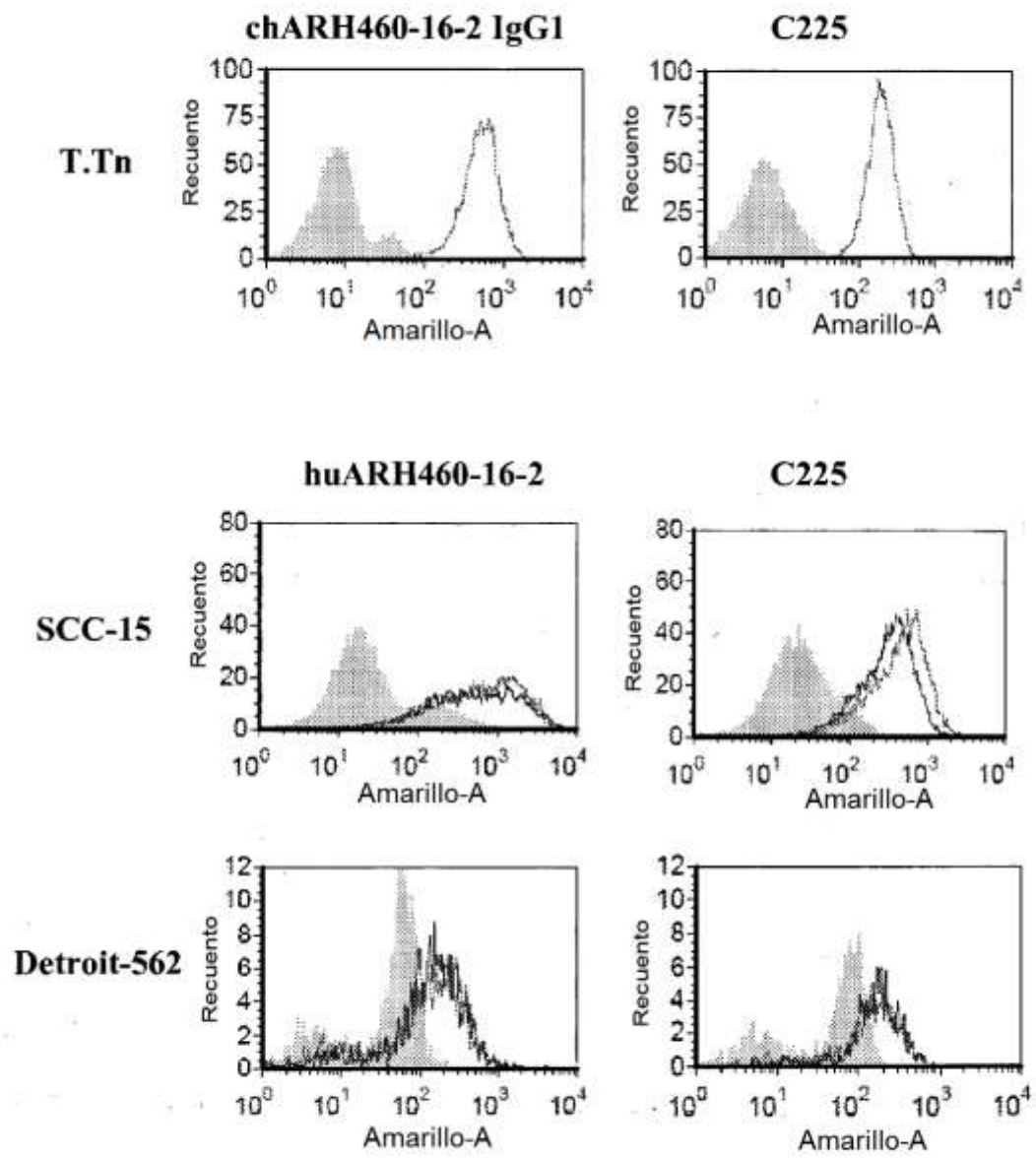
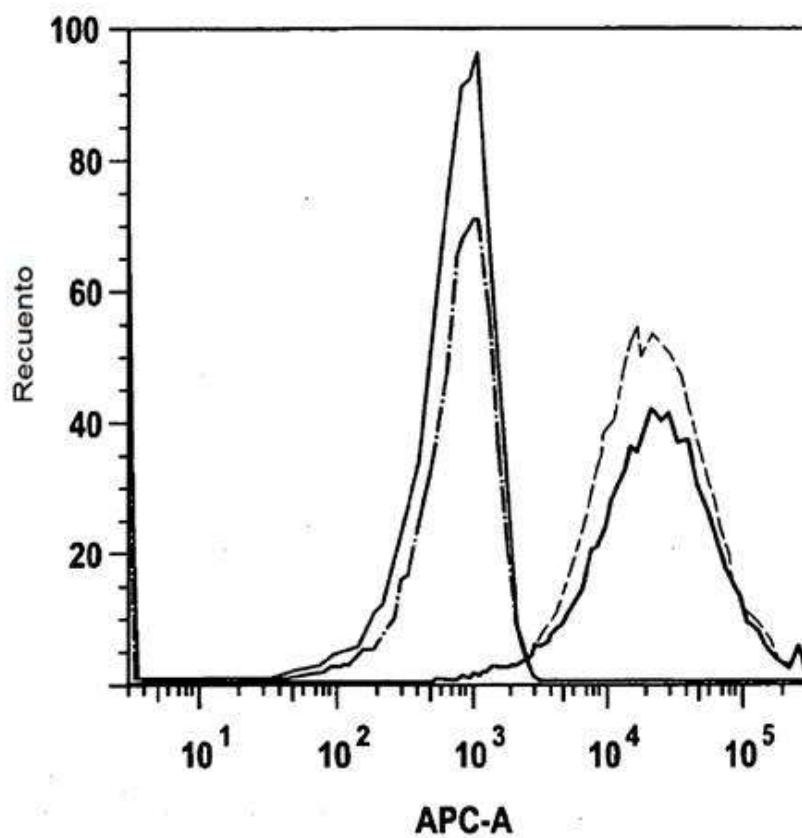


FIGURA 1B



	Nombre de la muestra	Media, APC-A
-----	CAL 27 n°1 Rituximab.fcs	965,14
—————	CAL 27 n°1 huCD44.fcs	35283,00
—————	CAL 27 n°2 Rituximab.fcs	886,42
-----	CAL 27 n°2 huCD44.fcs	33030,21

FIGURA 2

Modelo de xenoinjerto de T. Tn establecido

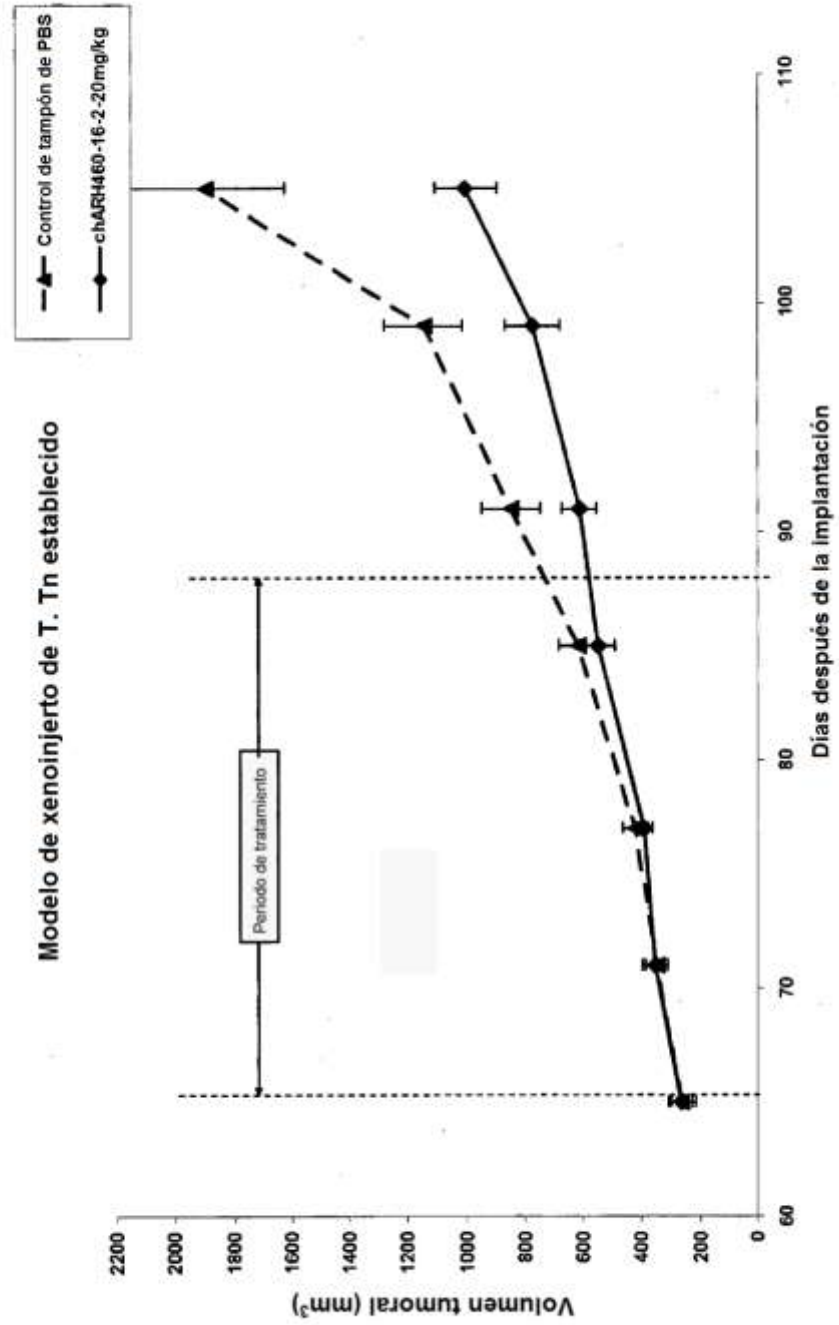


FIGURA 3

Peso corporal de modelo
de xenoinjerto de T. Tn establecido

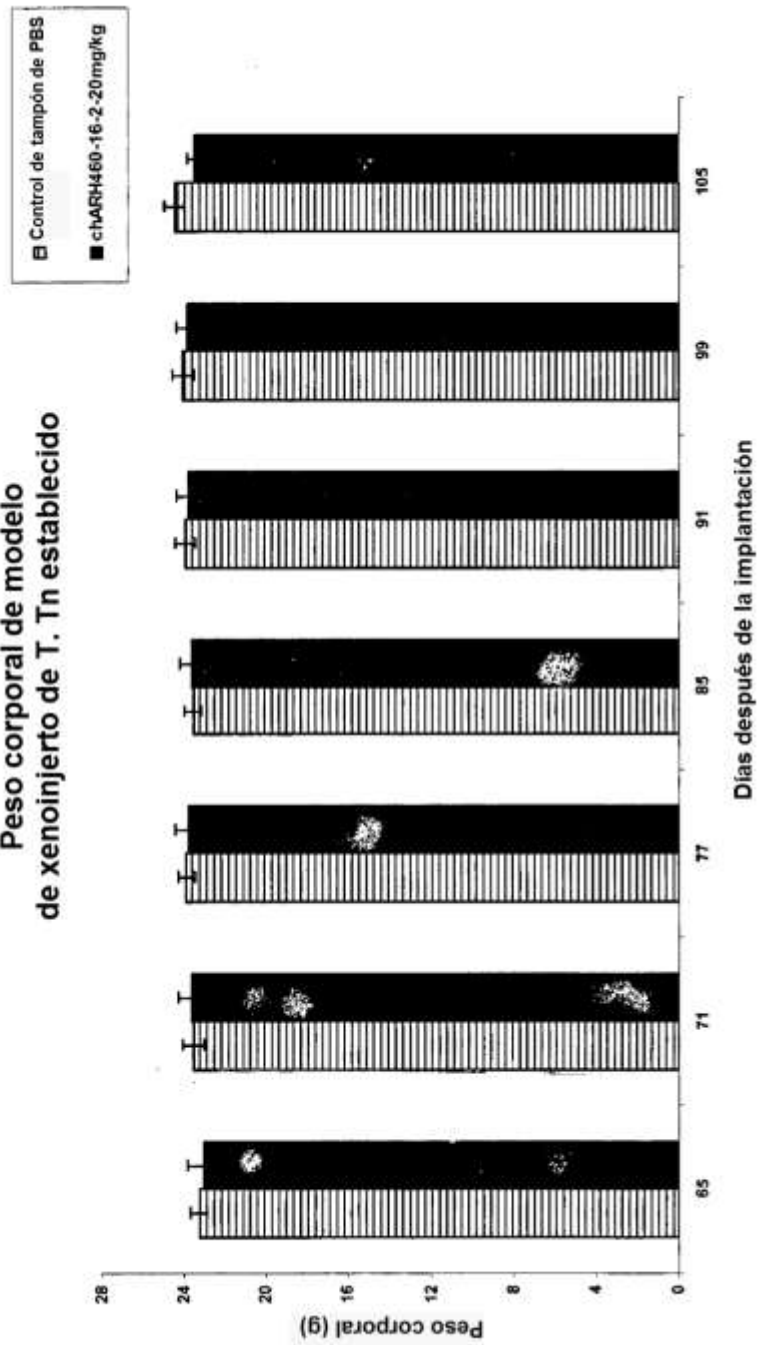


FIGURA 4

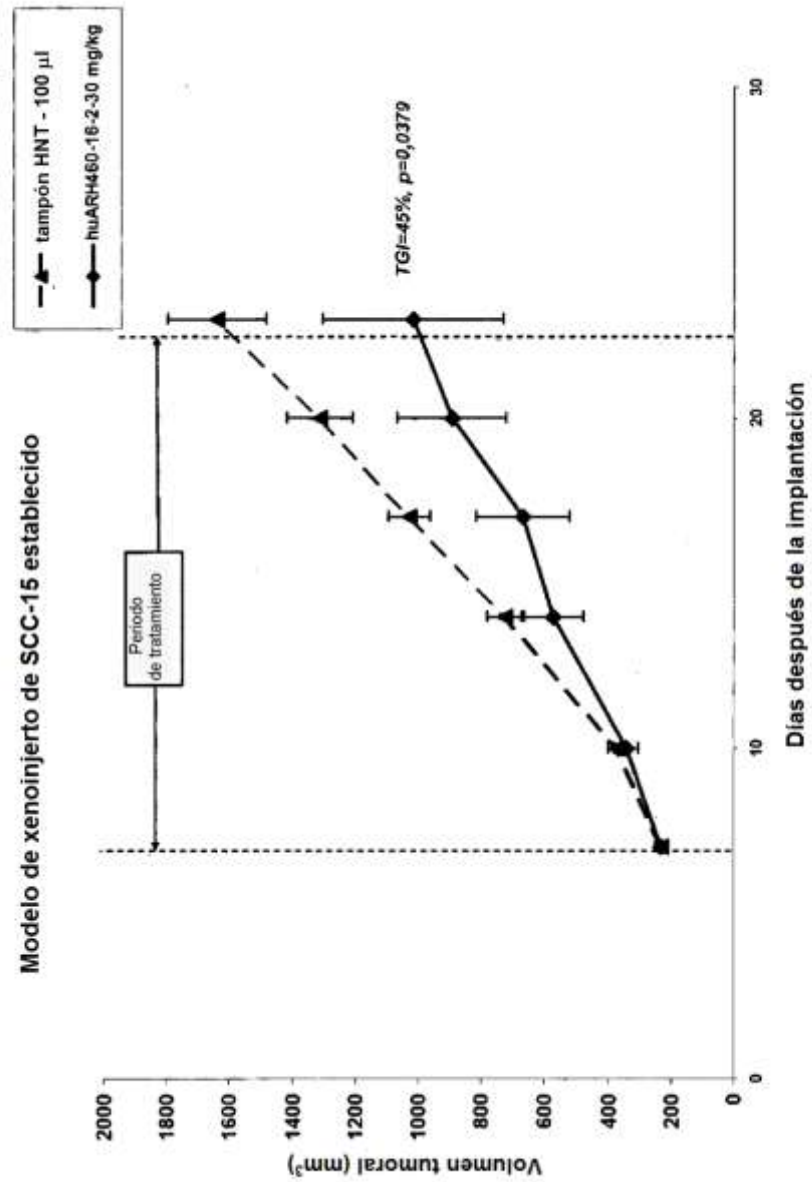


FIGURA 5

Peso corporal de modelo de xenoinjerto
de SCC-15 establecido

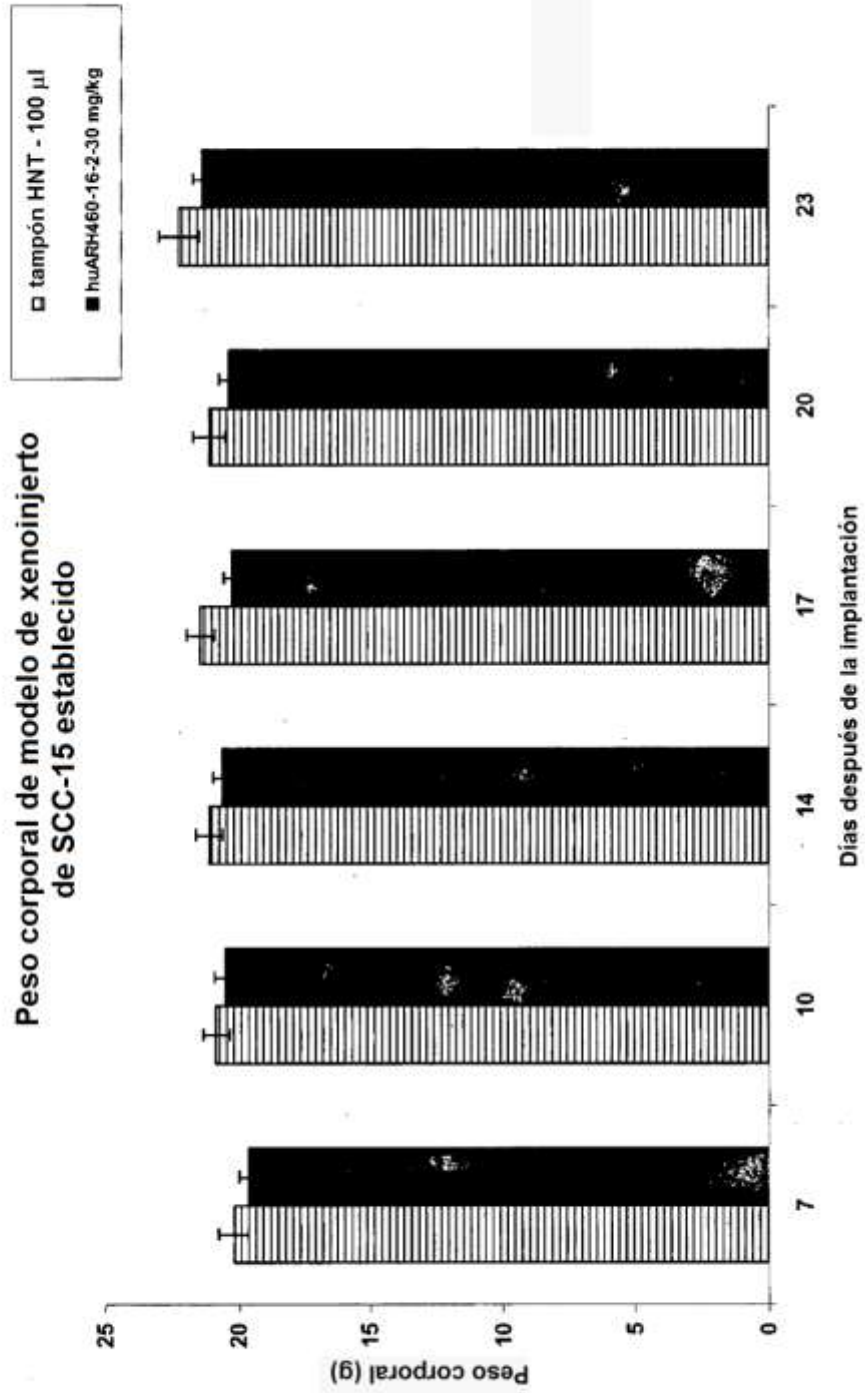


FIGURA 6

Modelo de xenoinjerto de Detroit 562 establecido

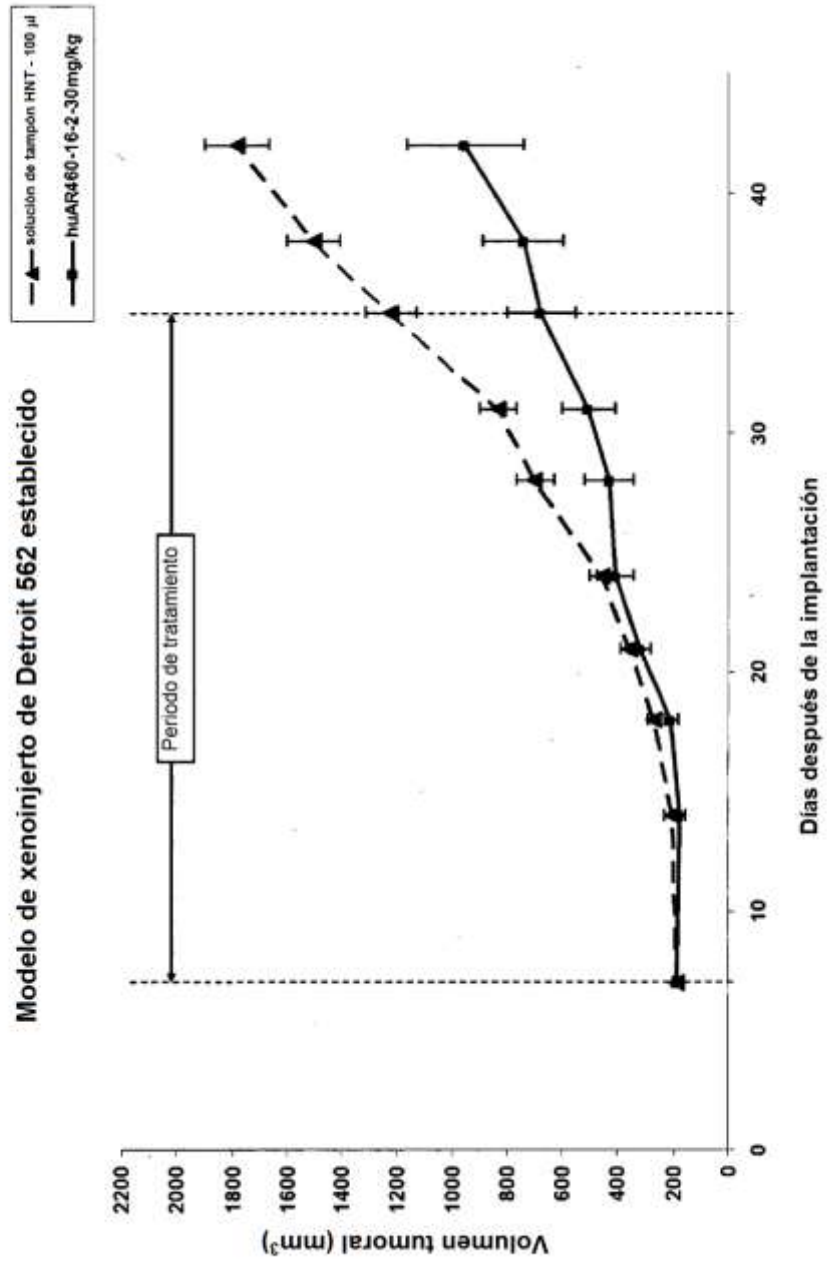


FIGURA 7

Peso corporal de modelo de xenoinjerto
de Detroit 562 establecido

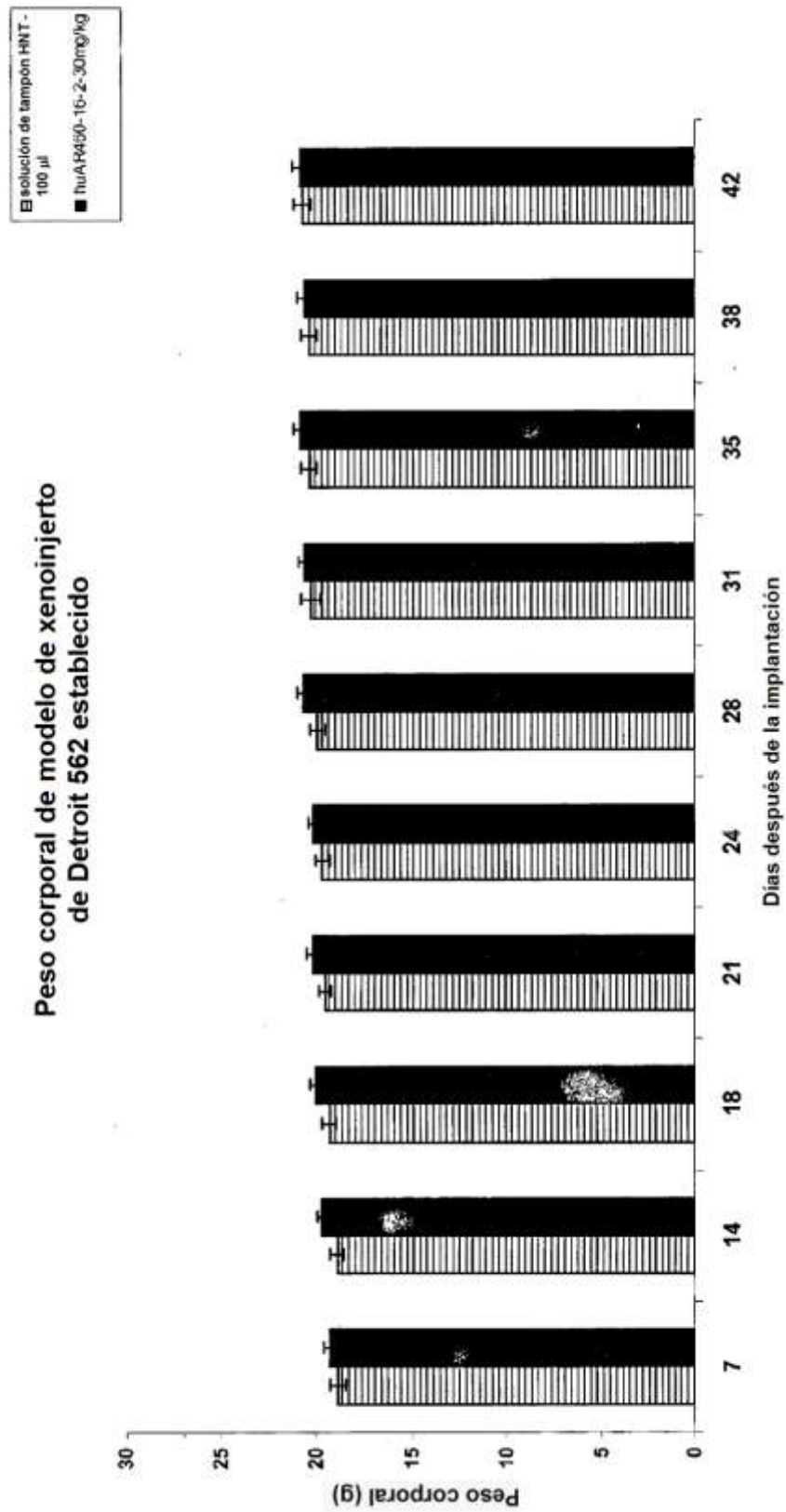


FIGURA 8

Modelo de xenoinjerto de CAL 27 establecido

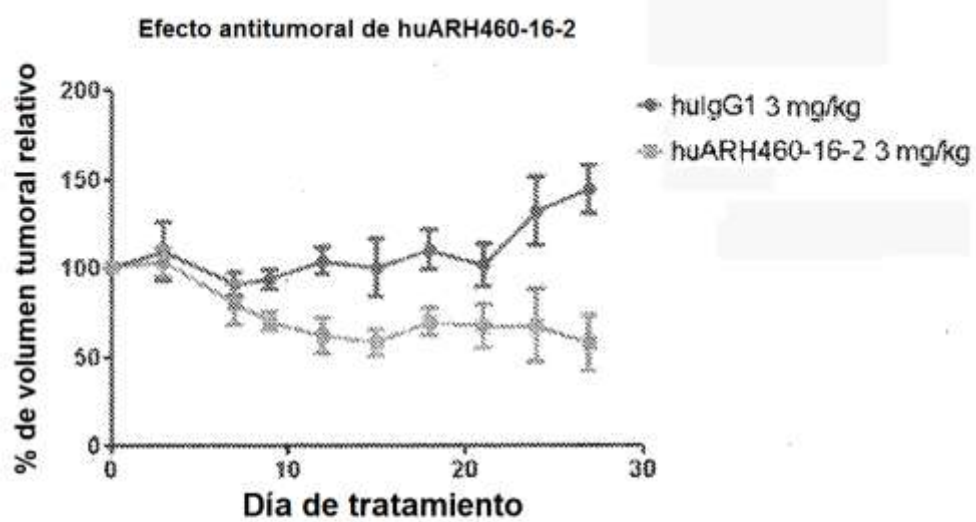


FIGURA 9

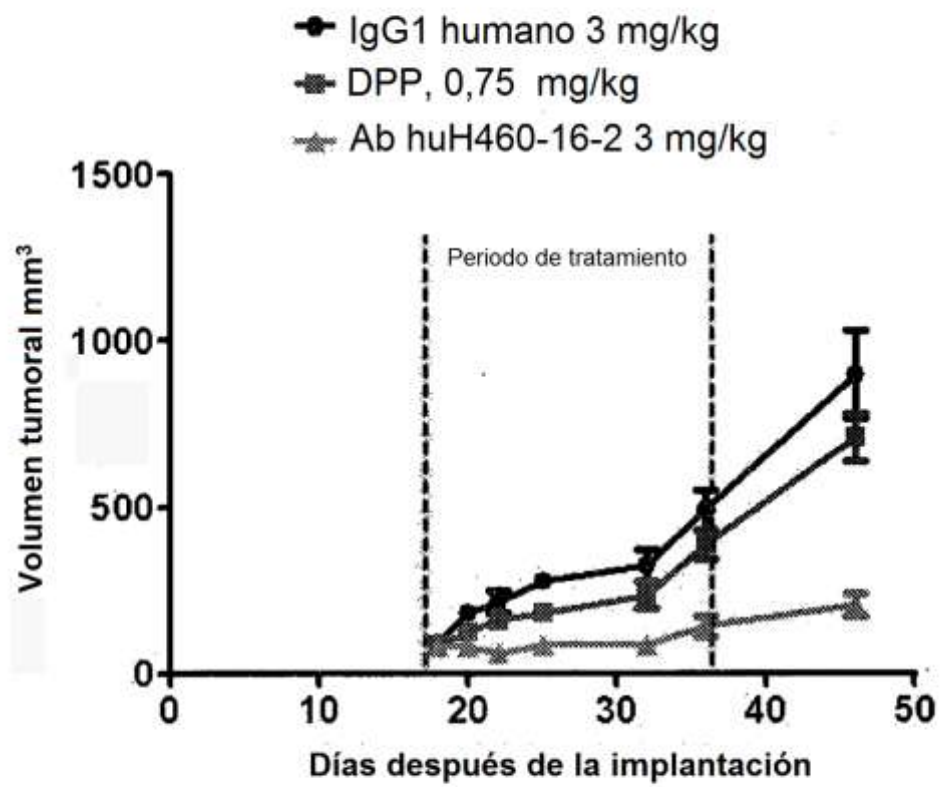


FIGURA 10

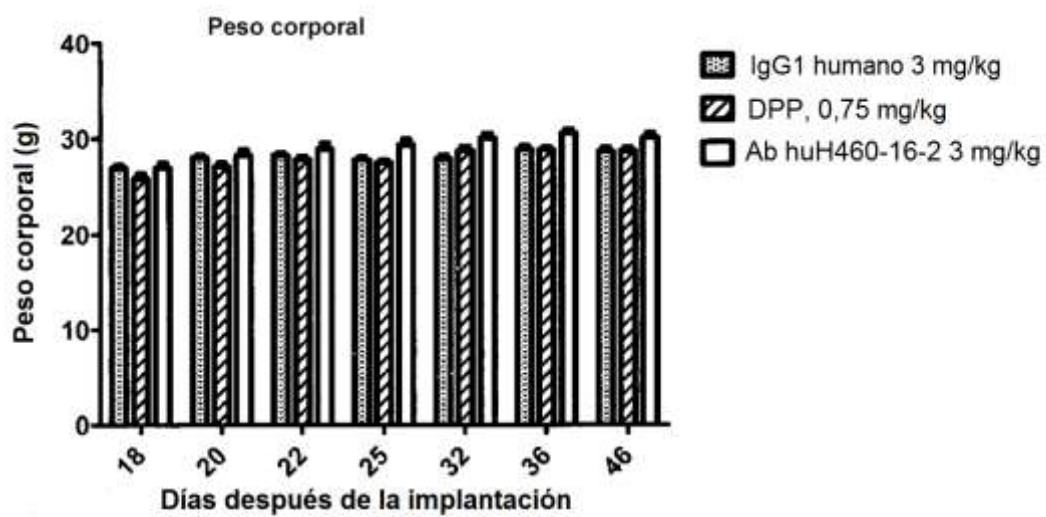


FIGURA 11

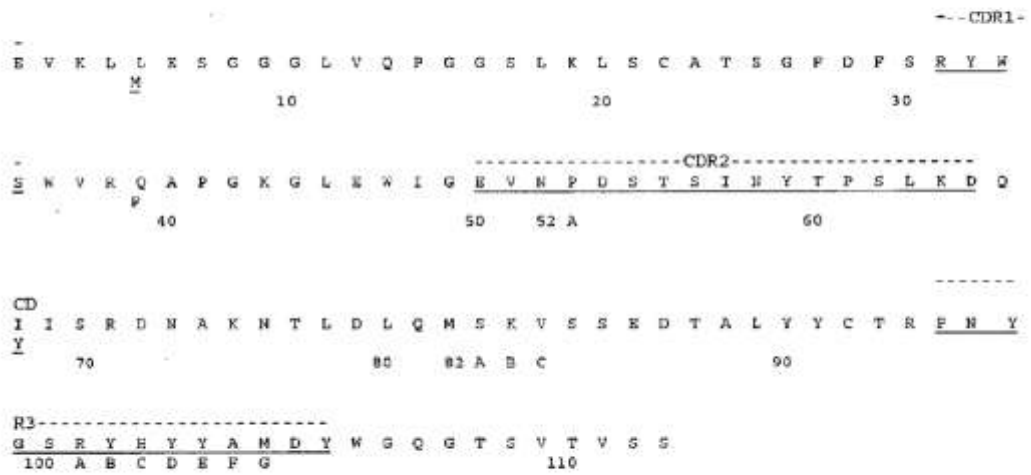


FIGURA 12

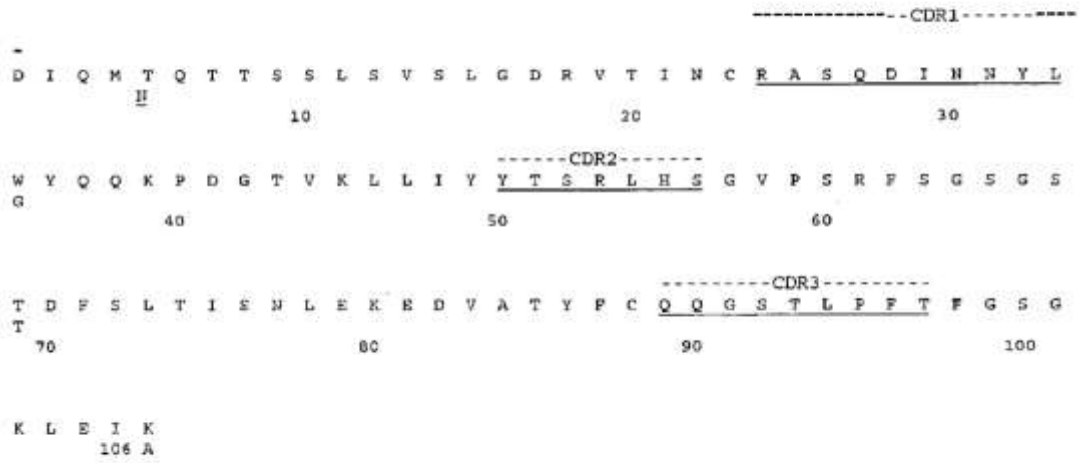


FIGURA 13

Cadena pesada HV1:

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F D F S R Y W M
 10 20 30
 ---CDR1---
 S W V R Q A P G K G L V W V G E V N P D S T S I N Y T P S L K D R F
 40 50 60
 ---CDR2---
 T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R P N Y Y
 70 80 90
 ---CD---
 R3-----
 G S R Y H Y Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
 100 A B C D E F G 110

Cadena pesada HV2:

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A T S G F D F S R Y W N
 10 20 30
 ---CDR1---
 S W V R Q A P G K G L V W I G E V N P D S T S I N Y T P S L K D Q F
 40 50 60
 ---CDR2---
 T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R P N Y Y
 70 80 90
 ---CD---
 R3-----
 G S R Y H Y Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
 100 A B C D E F G 110

