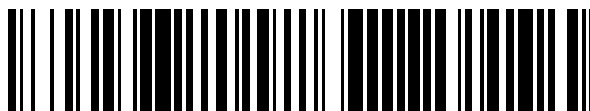


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 767**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2003 E 03740743 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1519958**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humanizado HPAM4**

30 Prioridad:

14.06.2002 US 388314 P

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

12.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOLDENBERG, DAVID, M.;
HANSEN, HANS y
QU, ZHENGXING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 767 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humanizado HPAM4

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo monoclonal (MAb) PAM4 murino y secuencias de una región marco (FR) y de una región constante del anticuerpo humano; un conjugado que comprende dicho anticuerpo humanizado; un anticuerpo multivalente y multiespecífico que comprende al menos uno de dichos anticuerpo o fragmento del mismo; una proteína de fusión de anticuerpo que comprende al menos dos de dichos anticuerpo y fragmento del mismo; una proteína de fusión de anticuerpo que comprende al menos un primer anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el primer anticuerpo o fragmento del mismo es dicho anticuerpo y fragmento del mismo, y un segundo anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el segundo anticuerpo o fragmento del mismo es diferente de dichos anticuerpo y fragmento del mismo; una secuencia de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un MAb o fragmento del mismo elegido entre el grupo que consiste en (a) dicho anticuerpo o fragmento del mismo y (b) dicha proteína de fusión de anticuerpo; un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN; una célula hospedadora que comprende dicha secuencia de ADN; el uso de dicho anticuerpo o fragmento del mismo, dicho anticuerpo multivalente multiespecífico; dicho conjugado o dicha proteína de fusión en la preparación de un agente para el tratamiento o el diagnóstico de cáncer; dicho anticuerpo o fragmento del mismo, dicho anticuerpo multivalente multiespecífico, dicho conjugado o dicha proteína de fusión para su uso en un método para suministrar un agente de diagnóstico o terapéutico o una combinación de los mismos con un objetivo; dicho anticuerpo o fragmento del mismo dicho anticuerpo polivalente multiespecífico, dicho conjugado o proteína de fusión para su uso en un método para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer; un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende realizar un ensayo de diagnóstico *in vitro* en una muestra de dicho sujeto con una composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento o dicho conjugado; el uso de dicha proteína de fusión de anticuerpo en la fabricación de un preparado para uso en la identificación intraoperatoria de cáncer de páncreas; y dicha la proteína de fusión de anticuerpo para su uso en la fabricación de un preparado para su uso en la identificación intraoperatoria del cáncer de páncreas o para su uso en la identificación de cáncer de páncreas intraoperatoriamente.

Fundamento de la invención

30 El páncreas produce insulina para ayudar al organismo a convertir la glucosa en energía y enzimas para ayudar al organismo a digerir los alimentos. El cáncer de páncreas es un tumor maligno del páncreas que se presenta principalmente en las células de los conductos pancreáticos. Esta enfermedad es la novena forma de cáncer más común, si bien es la cuarta y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. El cáncer de páncreas es casi siempre fatal, con una tasa de supervivencia de cinco años que es inferior al 3%.

35 Los síntomas más comunes de cáncer de páncreas incluyen ictericia, dolor abdominal y pérdida de peso, que, junto con otros factores que se presentan, no son de naturaleza específica. Así pues, es a menudo difícil diagnosticar el cáncer de páncreas en una etapa temprana del crecimiento del tumor y requiere un considerable recelo y una amplia labor de diagnóstico, incluyendo con frecuencia una cirugía exploratoria. La ultrasonografía endoscópica y la tomografía computerizada son los mejores medios no invasivos disponible en la actualidad para el diagnóstico del cáncer de páncreas. Sin embargo, la detección fiable de pequeños tumores, así como la distinción del cáncer pancreático de una pancreatitis focal, son problemáticas. Por desgracia, la amplia mayoría de los pacientes son diagnosticados en la actualidad en una etapa tardía, cuando el tumor se ha extendido ya fuera de la cápsula para invadir los órganos circundantes o ha metastatizado extensamente. Gold et al., Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39:147-54 (2001). La detección tardía de la enfermedad es común, y el diagnóstico precoz de cáncer de páncreas es raro en el marco clínico.

45 Los actuales procedimientos de tratamiento disponibles para el cáncer de páncreas no han conducido a una cura, ni a un tiempo de supervivencia sustancialmente mejorado. La resección quirúrgica ha sido la única modalidad que ofrece una oportunidad de supervivencia. Sin embargo, debido a una carga tumoral grande, solamente del 10% al 25% de los pacientes son candidatos para "resección curativa". Para esos pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico, la tasa de supervivencia de cinco años es aún escasa, con un promedio de sólo alrededor del 10%.

50 La detección y el diagnóstico tempranos del cáncer de páncreas, así como el apropiado estadiaje de la enfermedad, proporcionarían una ventaja en el aumento de la supervivencia. Varios laboratorios están procediendo al desarrollo de un método de diagnóstico basado en la liberación en el torrente circulatorio de un marcador asociado al tumor, así como en la detección de la sustancia marcadora en las muestras de biopsia. El mejor marcador asociado al tumor para el cáncer de páncreas ha sido el inmunoensayo de CA19.9. Se encontraron niveles elevados de esta estructura de epítipo sialilada Le^a en el 70% de los pacientes de cáncer de páncreas, pero no se encontraron en ninguna de las muestras de pancreatitis focal examinadas. Sin embargo, se encontró que los niveles de CA19.9 eran elevados en otras varias condiciones benignas y malignas, por lo que actualmente el ensayo no puede usarse para diagnóstico. Sin embargo, el ensayo es útil para monitorización, siendo indicativo de un mal pronóstico el continuo aumento en los niveles séricos de CA19.9 después de la cirugía. Se han publicado muchos otros anticuerpos

monoclonales (MAbs) con los inmunoensayos para diagnóstico en etapas de desarrollo variadas. Éstos incluyen, pero no se limitan a ellos, DUPAN2, SPAN1, B72.3, Ia3 y varios anticuerpos anti-CEA.

Se han ensayado ampliamente anticuerpos sintéticos, en particular MAbs y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contruidos por ingeniería genética, y se ha demostrado que son valiosos en la detección y el tratamiento del cáncer de páncreas, así como otros varios trastornos humanos, incluyendo cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y enfermedades cardiovasculares [Filpula y McGuire, Exp. Opin Ther. Patentes (1999) 9: 231-245]. La utilidad clínica de un anticuerpo o un agente derivado de anticuerpo, depende principalmente de su capacidad para enlazar con un antígeno dirigido específico asociado con un trastorno específico. Selectividad es valiosa para suministrar un agente de diagnóstico o terapéutico, tal como isótopos, fármacos; toxinas, citocinas, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, inhibidores de enzimas, oligonucleótidos, factores de crecimiento, oligonucleótidos, radionucleidos, un inhibidor de la angiogénesis o metales, a una localización diana durante las fases de detección y tratamiento de un trastorno humano, en particular si el agente de diagnóstico o terapéutico es tóxico para los tejidos normales del organismo. Se han usado con cierto éxito anticuerpos radiactivos en numerosos tumores malignos, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de colon y linfoma. Esta tecnología también puede resultar útil para el cáncer de páncreas. Sin embargo, aparte de la aplicación de anticuerpos anti-CEA y B72.3, hay poca información clínica.

Las limitaciones potenciales de tales sistemas de anticuerpos se discuten en Goldenberg, The American Journal of Medicine, 94: 298-299 (1993). Los parámetros importantes en las técnicas de detección y tratamiento son la cantidad de dosis inyectada localizada específicamente en el sitio o los sitios en los que están presentes las células diana y la relación de absorción, es decir, la relación de la concentración de anticuerpo unido específicamente a la de la radiactividad presente en los tejidos circundantes normales. Cuando el anticuerpo es inyectado en el torrente circulatorio, pasa a través de varios compartimientos a medida que es metabolizado y excretado. El anticuerpo debe ser capaz de localizar y unirse al antígeno de la célula diana mientras pasa por el resto del organismo. Entre los factores que controlan la dirección u orientación del antígeno se incluyen la ubicación, tamaño, densidad de antígeno, accesibilidad del antígeno, la composición celular del tejido patológico y la farmacocinética de los anticuerpos objetivos. Otros factores que afectan específicamente al señalamiento como diana de tumores por anticuerpos incluyen la expresión de los antígenos diana o de destino, tanto en el tumor como en otros tejidos y la toxicidad para la médula ósea que resulta del lento aclaramiento o eliminación de la sangre de los anticuerpos radiomarcados. La cantidad de anticuerpos objetivo incorporados por las células tumorales específicas está influenciada por la vascularización y las barreras contra la penetración del anticuerpo de tumores, así como la presión intratumoral. La absorción no específica por órganos no diana tales como el hígado, los riñones o la médula ósea es otra limitación potencial de la técnica, especialmente para radioinmunoterapia, donde la irradiación de la médula ósea causa frecuentemente la toxicidad limitante de la dosis.

Un planteamiento sugerido para el suministro de los agentes a un sitio diana, denominado orientación directa, es una técnica diseñada para dirigir antígenos específicos con anticuerpos que son portadores de radioisótopos de diagnóstico o terapéuticos. En el contexto de los tumores, el planteamiento de la orientación directa utiliza un anticuerpo radiomarcado anti-tumoral monoespecífico que reconoce el tumor diana por medio de sus antígenos. La técnica implica inyectar en el paciente el anticuerpo monoespecífico marcado y dejar que el anticuerpo localice el tumor diana para obtener beneficios diagnósticos o terapéuticos. El anticuerpo no unido se aclara o elimina del organismo. Este planteamiento puede utilizarse para diagnosticar o tratar trastornos adicionales en los mamíferos.

Otra solución sugerida, denominada "Sistema de Potenciación de la Afinidad" (Affinity Enhancement System: AES), es una técnica destinada especialmente para superar las deficiencias de la orientación del tumor por anticuerpos que portan radioisótopos de diagnóstico o terapéuticos [documento US-5.256.395 (1993), Barbet et al., Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 14: 153-166 (1999)]. El AES utiliza un hapteno divalente radiomarcado y un anticuerpo biespecífico anti-tumor/anti-hapteno que reconoce tanto el tumor diana como el hapteno radiactivo. También pueden ser utilizados para este procedimiento haptenos con mayor valencia y anticuerpos con especificidad más alta. La técnica implica inyectar el anticuerpo en el paciente y dejar que se localice en el tumor diana. Después de un tiempo suficiente para que el anticuerpo no enlazado se elimine del torrente circulatorio, se administra el hapteno radiomarcado. El hapteno se une al complejo antígeno-anticuerpo localizado en el sitio de la célula diana para obtener beneficios de diagnóstico o terapéuticos, mientras que el hapteno no unido se elimina rápidamente del organismo. Barbet menciona la posibilidad de que un hapteno bivalente se reticule con un anticuerpo biespecífico, cuando este último se une a la superficie del tumor. Como resultado, el complejo radiomarcado es más estable y se queda en el tumor durante un periodo de tiempo más prolongado. Este sistema puede ser usado para diagnosticar o tratar trastornos del mamífero.

Mariani G et al. (Mariani G et al., Cancer Research (Suppl) diciembre de 1995, vol. 55, pp. 5911s-5915s) publican sobre la orientación tumoral inicial, biodistribución y evaluación farmacocinética del anticuerpo monoclonal PAM4 en pacientes de cáncer de páncreas.

Gold D V et al. (Gold D V et al., The International Journal of Cancer, 1997, vol. 71, págs. 660-667) informan sobre radioinmunoterapia del cáncer de páncreas experimental con anticuerpo monoclonal PAM4 marcado con ¹³¹I.

Cardillo T M et al. (Cardillo T M et al., Clinical Cancer Research, octubre de 2001, vol. 7, pp. 3186-3192) informan sobre la ventaja terapéutica del anticuerpo PAM4 marcado con ⁹⁰itrio frente al marcado con ¹³¹yodo en el cáncer pancreático experimental.

5 Cardillo T M et al. (Cardillo T M et al., International Journal of Cancer, marzo de 2002, vol. 97, pp.386-392) informan sobre la combinación de gemcitabina y radioinmunoterapia para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Gold D V et al (Gold D V et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, 19-22 de Mayo, 1993, vol. 34, p. 480 Abstract N° 2866) informan sobre la quimerización y humanización injertada en una CDR de PAM4.

10 Se mantiene en la técnica la necesidad de la producción de anticuerpos monoespecíficos multivalentes, que son útiles en un sistema de orientación directa y para la producción de anticuerpos multivalentes y multiespecíficos que son útiles en un sistema de potenciación de la afinidad. Concretamente, sigue habiendo la necesidad de un anticuerpo que actúe como una herramienta de diagnóstico útil para el cáncer de páncreas que muestre la absorción potenciada en los antígenos señalados, la disminución de la concentración en la sangre y la protección óptima de los tejidos y células normales frente a los fármacos tóxicos.

15 **Sumario de la invención**

El problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes anexas. Pueden escogerse realizaciones preferidas entre las reivindicaciones dependientes anexas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en una primera realización mediante un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo monoclonal (Mab) PAM4 murino y región de marco (FR) del anticuerpo humano y secuencias de la región constante, en donde las CDRs de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos SASSSVSSSYLY; CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos STSNLAS y CRD3 que comprende una secuencia de aminoácidos HQWNRYPYT; y las CDRs de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos SYVLH; CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos YINPYNDGTQYNEKFKG y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GFGGSYGfAY.

En una segunda realización que es una realización de la primera realización, las FRs de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprenden por lo menos un aminoácido sustituido a partir de las correspondientes FRs de un Mab PAM4 murino, elegido entre el grupo formado por los restos de aminoácido 5, 27, 30, 38, 48, 66, 67 y 69 de la región variable de la cadena pesada murina de la Fig. 1B y restos de aminoácido 21, 47, 59, 60, 85, 87 y 100 de la Fig. 1A.

En una tercera realización que es una realización de la primera realización, dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de hPAM4 V_H de la Fig. 4A y la secuencia de aminoácidos de hPAM4 V_K de la Fig. 4B.

En una cuarta realización el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un conjugado que comprende un componente de anticuerpo que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de una cualquiera de las realizaciones 1^a a 3^a, en donde dicho componente de anticuerpo está unido a por lo menos un agente de diagnóstico o terapéutico.

40 En una quinta realización que es una realización de la cuarta realización, dicho agente de diagnóstico se elige entre el grupo que comprende un radionucleido, un agente de contraste y un agente de diagnóstico fotoactivo y en donde el conjugado se dirige a las células cancerosas.

En una sexta realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de diagnóstico es un radionucleido.

45 En una séptima realización que es una realización de la sexta realización, dicho radionucleido tiene una energía entre 20 y 4.000 keV.

En una octava realización que es una realización de la sexta realización, dicho radionucleido es un isótopo emisor de radiaciones alfa, gamma, beta o de positrones.

50 En una novena realización que es una realización de la octava realización, dicho radionucleido es un isótopo emisor de radiaciones alfa, en donde dicho radionucleido tiene una energía de desintegración de 2.000 a 10.000 keV, preferiblemente de 3.000 a 8.000 keV y más preferiblemente de 4.000 a 7.000 keV.

ES 2 524 767 T3

En una décima realización que es una realización de la sexta realización, dicho radionucleido se elige entre el grupo que consiste en ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Lc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$ y ^{83}Sr .

5 En una undécima realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de diagnóstico es un agente de contraste radiológico.

En una duodécima realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de contraste es un ion paramagnético.

10 En una 13ª realización que es una realización de la duodécima realización, dicho ion paramagnético es un metal que comprende cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III).

En una 14ª realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de contraste es un metal que comprende lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III).

En una quinta realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de contraste es un agente potenciador de ultrasonido.

15 En una 16ª realización que es una realización de la 15ª realización, dicho agente potenciador de ultrasonido es un liposoma.

En una 17ª realización que es una realización de la 16ª realización, dicho liposoma está lleno de gas.

20 En una 18ª realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de contraste es un material radiopaco elegido entre el grupo formado por compuestos de yodo, compuestos de bario, compuestos de galio y compuestos de talio.

25 En una 19ª realización que es una realización de la 18ª realización, dicho material radiopaco se elige entre el grupo compuesto por diatrizoato de bario, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida meglumina, ácido iosemético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxáglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro de talio.

En una 20ª realización que es una realización de la quinta realización, dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico fotoactivo.

30 En una 21ª realización que es una realización de la 20ª realización, dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto de marcaje fluorescente elegido entre el grupo formado por isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, allofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

En una 22ª realización que es una realización de la 20ª realización, dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto de marcaje quimioluminiscente elegido entre el grupo que comprende luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster oxalato.

35 En una 23ª realización que es una realización de la 20ª realización, dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto bioluminiscente elegido entre el grupo formado por luciferina, luciferasa y aequorina.

En una 24ª realización que es una realización de la quinta realización, el conjugado es para uso en diagnóstico intraoperatorio, endoscópico o intravascular del tumor.

40 En una 25ª realización que es una realización de la cuarta realización, dicho agente terapéutico es elegido entre el grupo formado por un radionucleido, un inmunomodulador, una hormona, un antagonista de hormonas, un oligonucleótido, una enzima, un inhibidor de enzimas, un agente terapéutico fotoactivo, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis y una combinación de los mismos.

En una 26ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.

45 En una 27ª realización que es una realización de la 26ª realización, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido contra un oncogén.

En una 28ª realización que es una realización de la 27ª realización, dicho oncogén es bcl-2 o p53.

En una 29ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho el agente terapéutico es un agente citotóxico.

- En una 30ª realización que es una realización de la 29ª realización, dicho agente citotóxico es un fármaco o una toxina,
- 5 En una 31ª realización que es una realización de la 30ª realización, dicho fármaco posee la propiedad farmacéutica elegida entre el grupo formado por las propiedades antimetabólica, alquilante, antimetabolito, antiangiogénica, apoptótica, alcaloide y agente antibiótico, y combinaciones de las mismas.
- 10 En una 32ª realización que es una realización de la 30ª realización, dicho fármaco se elige entre el grupo que consiste en mostazas nitrogenadas, gemcitabina, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazinas, análogos del ácido fólico, antraciclinas, taxanos, SN-38, inhibidores de la COX-2, análogos de pirimidina, análogos de la purina, antibióticos, enzimas, inhibidores de enzimas, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, alcaloides de la vinca, ureas sustituidos, derivados de metil hidrazina, supresores adrenocorticales, antagonistas de hormonas, endostatina, taxoles, camptotecinas, doxorubicinas y sus análogos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos apoptóticos, metotrexato, CPT-11 y una combinación de los mismos.
- 15 En una 33ª realización que es una realización de la 30ª realización, dicha toxina se deriva de una fuente elegida entre el grupo que comprende un animal, una planta y una fuente microbiana.
- 20 En una 34ª realización que es una realización de la 30ª realización, dicha toxina se elige entre el grupo que comprende ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa, enterotoxina-A *estafilocócica*, proteína antiviral de la hierba carmesí, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.
- En una 35ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho agente terapéutico es un inmunomodulador.
- 25 En una 36ª realización que es una realización de la 35ª realización, dicho inmunomodulador se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, factor hematopoyético, un factor estimulador de colonias (CSF), un interferón (IFN), un factor de crecimiento de células madre, eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de los mismos.
- 30 En una 37ª realización que es una realización de la 36ª realización, dicha linfoxina es un factor de necrosis tumoral (TNF), dicho factor hematopoyético es una interleucina (IL), dicho factor estimulante de colonias es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), dicho interferón es interferón α , β o γ , y dicho factor de crecimiento de células madre es el factor S1.
- En una 38ª realización que es una realización de las realizaciones 35ª a 37ª, dicho inmunomodulador comprende IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL12, IL-18, IL-21, interferón- γ , TNF- α o una combinación de los mismos.
- En una 39ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho el agente terapéutico es un radionucleido.
- En una 40ª realización que es una realización de la 39ª realización, dicho radionucleido tiene una energía entre 60 y 700 keV.
- 35 En una 41ª realización que es una realización de la 39ª realización, dicho radionucleido se elige entre el grupo que consiste en ^{32}P , ^{33}P , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{61}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{155}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}Ra , ^{223}Ra y ^{225}Ac y combinaciones de los mismos.
- En una 42ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho agente terapéutico es un agente terapéutico fotoactivo.
- 40 En una 43ª realización que es una realización de la 42ª realización, dicho agente fotoactivo se elige entre el grupo que consiste en cromógenos y colorantes.
- En una 44ª realización que es una realización de la 25ª realización, dicho agente terapéutico es una enzima.
- 45 En una 45ª realización que es una realización de la 44ª realización, dicha enzima se elige entre el grupo que comprende malato deshidrogenasa, nucleasa estafilococia, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.
- En una 46ª realización el problema subyacente de la invención se resuelve mediante un anticuerpo multivalente y multiespecífico que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo como se define en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª.
- 50 En una 47ª realización que es una realización de la 46ª realización, el anticuerpo multiespecífico comprende además un agente de diagnóstico o terapéutico.

- En una 48ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante una proteína de fusión de anticuerpo que comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de éstos según una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª.
- 5 En una 49ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante una proteína de fusión de anticuerpo que comprende al menos un primer anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª y al menos un segundo MAb o fragmento del mismo donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo no es un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª.
- En una 50ª realización que es una realización de la 49ª realización, el segundo MAb se une a un antígeno asociado a un carcinoma.
- 10 En una 51ª realización que es una realización de la 50ª realización, dicho segundo MAb se une a un antígeno del cáncer de páncreas.
- En una 52ª realización que es una realización de la 50ª realización, dicho segundo MAb se elige entre el grupo formado por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLeuna, anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y), CSAp, MUC2, MUC3 y MUC4, TAG-72, EGFR, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-6, CD40, factores de angiogénesis, VEGF, productos de oncogenes y HER2/neu.
- 15 En una 53ª realización que es una realización de la 48ª realización, dicha proteína de fusión además comprende al menos un agente de diagnóstico o terapéutico.
- En una 54ª realización que es una realización de una cualquiera de las realizaciones 48ª a 53ª, dicha proteína de fusión de anticuerpo comprende al menos dos anticuerpos monoclonales según las realizaciones 1ª a 3ª.
- 20 En una 55ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante una secuencia de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un MAb o un fragmento del mismo elegido entre el grupo que consiste en:
- (a) un anticuerpo o fragmento del mismo tal como se define en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª, que es un anticuerpo monoclonal;
- 25 (b) una proteína de fusión de anticuerpo como se define en una cualquiera de las realizaciones de 48ª a 52ª y 54ª.
- En una 56ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN de la realización 55ª.
- 30 En una 57ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante una célula hospedadora que comprende la secuencia de ADN de la realización 55ª.
- En una 58ª realización el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo tal como se define en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª, un anticuerpo multivalente y multiespecífico como se define en la realización 46ª, un conjugado como se define en una cualquiera de las realizaciones 4ª a 45ª o una proteína de fusión como se define en una cualquiera de realizaciones 48ª a 54ª en la preparación de un agente para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer.
- 35 En una 59ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante el anticuerpo o fragmento del mismo como se define en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª, el anticuerpo multivalente y multiespecífico como se define en la realización 46ª, el conjugado como se define en una cualquiera de las realizaciones 4ª a 45ª o una proteína de fusión como se define en una cualquiera de las realizaciones 48ª a 54ª, para su uso en un método para suministrar un agente de diagnóstico o terapéutico, o una combinación de los mismos, a una diana u objetivo.
- 40 En una 60ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante el anticuerpo o fragmento del mismo definido en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 3ª, el anticuerpo multivalente y multiespecífico, tal como se define en la realización 46ª, el conjugado como se define en una cualquiera de las realizaciones 4ª a 45ª o la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las realizaciones 48ª a 54ª, para su uso en un método para el tratamiento o diagnóstico del cáncer.
- 45 En una 61ª realización que es una realización de la 58ª realización, el uso de acuerdo con la realización 58ª y el anticuerpo o fragmento del mismo, el anticuerpo multivalente y multiespecífico, el conjugado y la proteína de fusión como se define en la realización 60ª, en donde el cáncer es cáncer de páncreas.
- 50 En una 62ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende realizar un ensayo de diagnóstico *in vitro* sobre una

muestra de dicho sujeto con una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo o un conjugado, como se define en una cualquiera de las realizaciones 1ª a 24ª.

En una 63ª realización que es una realización de la 62ª realización, el tumor maligno es cáncer de páncreas.

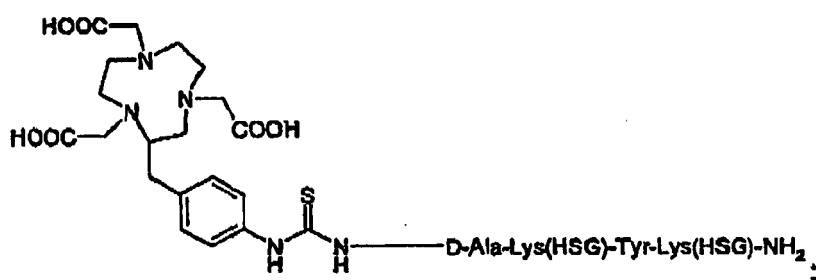
5 En una 64ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante el uso de una proteína de fusión de anticuerpo tal como se define en una cualquiera de las realizaciones 48ª a 54ª, en donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo se une específicamente a un conjugado orientable; y un conjugado orientable en la fabricación de un preparado para su uso en la identificación intraoperatoriamente del cáncer de páncreas y en donde el conjugado orientable se elige entre el grupo que consiste en:

(i) en DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

10 (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

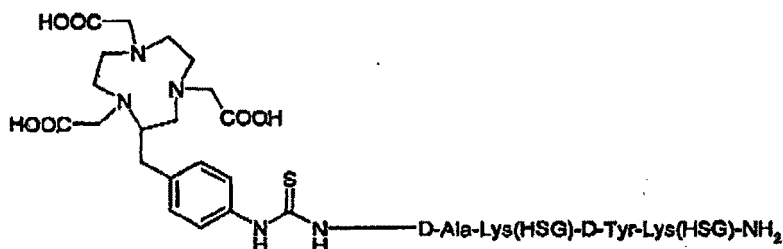
(iii) Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂

(iv)



y

15 (v)



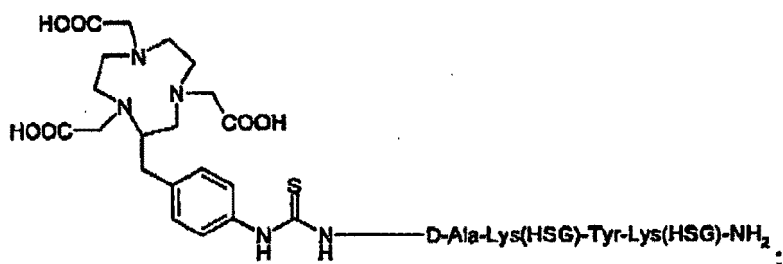
20 En una 65ª realización el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante la proteína de fusión de anticuerpo como se define en una cualquiera de las realizaciones 48ª a 54ª, en donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo se une específicamente a un conjugado orientable; y un conjugado orientable para su uso en la fabricación de un preparado para ser usado en la identificación intraoperatoria del cáncer de páncreas, o para el uso para identificar intraoperatoriamente el cáncer de páncreas y en donde el conjugado orientable se elige entre el grupo consistente en:

(i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

(ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr- Lys (HSG)-NH₂

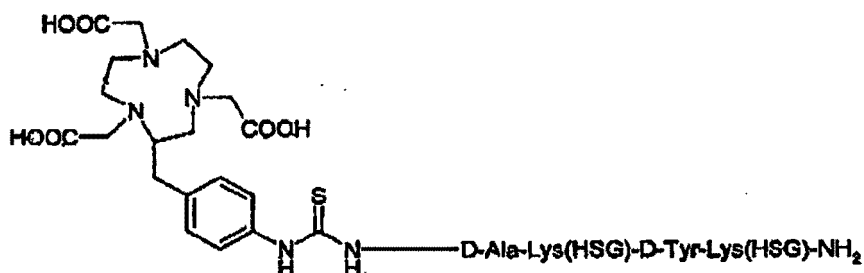
25 (iii) Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂

(iv)



y

(v)



5 En una 66ª realización que es una realización de una cualquiera de las realizaciones 64ª y 65ª, el método de identificación es la detección endoscópica.

10 Se contempla en la presente invención un anticuerpo, la proteína de fusión y fragmentos de los mismos como se definen en las reivindicaciones que se unen a un dominio situado entre el término amino y el comienzo del dominio de repetición de MUC1. En una realización preferida el anticuerpo, la proteína de fusión o fragmento del mismo es un anticuerpo PAM4. El anticuerpo PAM4, proteína de fusión o fragmento del mismo de la presente invención es preferiblemente reactivo contra la mucina del cáncer de páncreas. En consecuencia, el anticuerpo PAM4, la proteína de fusión y fragmentos de los mismos de la presente invención preferiblemente se unen a un antígeno asociado a células del cáncer de páncreas.

15 El anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo de la invención es humanizado y la proteína de fusión de PAM4 comprende un anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo. También preferiblemente el anticuerpo PAM4, la proteína de fusión y fragmentos de los mismos como se definen en las reivindicaciones pueden ser conjugados con al menos un agente terapéutico o de diagnóstico.

20 Se contempla en el presente texto un anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un MAb PAM4 murino y las regiones marco (FR) de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano y las regiones constantes de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano, en donde las CDRs de la región variable de la cadena ligera del MAb PAM4 humanizado comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SASSSVSSSYLY; CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de STSNLAS; y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de HQWNRYPYT; y las CDRs de la región variable de la cadena pesada del MAb PAM4 humanizado comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SYVLH; CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de YINPYNDGTQYNEKFKG y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de GFGGSYGFAY. En una realización preferida, las FRs de las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo comprenden al menos un aminoácido sustituido a partir de las correspondientes FRs de un MAb PAM4 murino. Más preferiblemente, el anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo comprende al menos un aminoácido elegido entre el grupo que consiste en restos de aminoácidos 5, 27, 30, 38, 48, 66, 67 y 69 de la región variable de la cadena pesada murina de la Fig. 1B, secuencia de aminoácidos PAM4 VH. También preferiblemente, el anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo en donde dicho aminoácido de dicho MAb murino es al menos un aminoácido elegido entre el grupo formado por los restos de aminoácidos 21, 47, 59, 60, 85, 87 y 100 de la región variable de la cadena ligera murina Fig.1A, secuencia PAM4V_K. Lo más preferiblemente, el anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento del mismo comprende la secuencia de nucleótidos PAM4 V_K de la figura 1A y la secuencia de nucleótidos PAM4 VH de la figura 1B y/o comprende una secuencia de aminoácidos hPAM4H V_H de la figura 4A y una secuencia de aminoácidos hPAM4 V_K de la figura 4B.

35 Otra realización de la presente invención es un inmunocombinado para diagnóstico dirigido a células cancerosas que comprende un componente de anticuerpo que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos, proteína de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención, en donde el anticuerpo, proteína de fusión o fragmento del mismo está unido a al menos un agente de diagnóstico-detección.

45 Preferiblemente, el agente de diagnóstico-detección se elige entre el grupo formado por un radionucleido, un agente de contraste y un agente de diagnóstico-detección fotoactivo. Es más preferible si el agente de diagnóstico-detección es un radionucleido con una energía entre 20 y 4.000 keV o es un radionucleido elegido entre el grupo formado por ¹¹⁰In, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F, ⁵²Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ^{94m}Tc, ⁹⁴Tc, ^{99m}Lc, ¹²⁰I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd, ³²P, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁵¹Mn, ^{52m}Mn, ⁵⁵Co, ⁷²As, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ^{82m}Rb, ⁸³Sr, u otros emisores de radiaciones gamma, beta o de positrones. También se prefiere que el agente de diagnóstico-detección sea un ion paramagnético, tal como un metal comprendido entre cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III) o un material radiopaco, como el diatrizoato de bario, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida, iohexol, iopamidol, ácido iopanoico, ácido ioprocémico, ácido iosefámico, ácido iosérico, iosulamida, meglumina, ácido iosemético, iotasul,

ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxálglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro de talio.

- También preferiblemente, el agente de diagnóstico-detección es un compuesto de marcaje fluorescente elegido entre el grupo que comprende isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldeído y fluorescamina, un compuesto de marcaje quimioluminiscente elegido entre el grupo formado por luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridina y un éster oxalato o un compuesto bioluminiscente elegido entre el grupo que comprende luciferina, luciferasa y aequorina. En otra realización, los inmunoconjugados de diagnóstico de la presente invención se utilizan en el diagnóstico intraoperatorio, intravascular o endoscópico de un tumor.
- Otra realización de la presente invención es un inmunoconjugado terapéutico orientado a células cancerosas que comprende un componente de anticuerpo que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión, o fragmentos de los mismos de la presente invención, en donde el anticuerpo, la proteína de fusión, o el fragmento de los mismos está unido a al menos un agente terapéutico.
- Preferiblemente, el agente terapéutico se elige entre el grupo que consiste en un radionucleido, un inmunomodulador, una hormona, un antagonista de hormonas, una enzima, un oligonucleótido, un inhibidor de enzimas, un agente terapéutico fotoactivo, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis y una combinación de los mismos.
- En una realización, un oligonucleótido tal como una molécula antisentido que inhibe la expresión de bcl-2 como se describe en la patente de EE. UU. nº 5.734.033 (Reed) puede ser conjugado con, o formar la porción del agente terapéutico de un inmunoconjugado o proteína de fusión de anticuerpo de la presente invención. Alternativamente, el oligonucleótido puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente con un anticuerpo PAM4 conjugado o desnudo o fragmento de anticuerpo de la presente invención. En una realización preferida, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que preferiblemente se dirige contra un oncogén o producto de oncogén de un tumor maligno de células B, como bcl-2.
- En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico, como un fármaco o una toxina. También se prefiere elegir el fármaco entre el grupo que consiste en mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas, gemcitabina, triazenos, análogos del ácido fólico, antraciclinas, taxanos, inhibidores de COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antibióticos, enzimas, inhibidores de enzima, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, alcaloides de la vinca, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, antagonistas de hormonas, endostatina, taxoles, camptotecinas, SN-38, doxorubicinas y sus análogos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antimetabólicos, antiangiogénicos, agentes apoptóticos, metotrexato, CPT-11 y una combinación de los mismos.
- En otra realización, el agente terapéutico es un oligonucleótido. Por ejemplo, el oligonucleótido puede ser un oligonucleótido antisentido tal como un oligonucleótido antisentido contra un oncogén como bcl-2 y p53.
- En otra realización preferida, el agente terapéutico es una toxina elegida entre el grupo formado por ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa, enterotoxina-A *estafilocócica*, proteína antiviral de la hierba carmesí, gelonina, toxina de la difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas* y combinaciones de los mismos, un inmunomodulador elegido entre el grupo que consiste en una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulador de colonias (CSF), un interferón (IFN), un factor de crecimiento de células madre, eritropoyetina, trombopoyetina y combinaciones de los mismos, un radionucleido elegido entre el grupo que consiste en en ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{223}Ra y ^{225}Ac y combinaciones de los mismos o un agente terapéutico fotoactivo elegido entre el grupo que comprende cromógenos y colorantes.
- También preferiblemente, el agente terapéutico es una enzima elegida entre el grupo que comprende malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.
- Se contempla en el presente texto un anticuerpo multivalente y multiespecífico o fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones, que comprende más de un sitio de unión del antígeno que tiene afinidad hacia un antígeno diana PAM4 y uno o más sitios de unión de hapteno que tienen afinidad hacia las moléculas de hapteno. Preferiblemente el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o totalmente humano o un fragmento del mismo. También preferiblemente, el anticuerpo multivalente y multiespecífico o fragmento del mismo comprende un agente de diagnóstico-detección y/o terapéutico.
- La invención se refiere también a un anticuerpo biespecífico o fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones, que comprende al menos un sitio de unión de antígeno con afinidad hacia un antígeno diana PAM4

y al menos un sitio de unión con afinidad hacia una construcción/conjugado orientable elegida en el grupo que consiste en:

DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂ (IMP 271);

DOTA-D-Glu-D-Lys (HSG) -D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 277);

5 DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (ESG)-NH₂ (IMP 288);

DOTA-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 281); y

DOTA-D-D-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ (IMP 284),

10 que es capaz de portar al menos un agente de diagnóstico y/o terapéutico. Otras construcciones orientables adecuadas para ser usadas en la presente invención se describen en la solicitud aplicación provisional de EE. UU. que lleva por título "D-Amino Acid Peptides" (McBride), expediente legal número 018733/1206, presentada el 13 de junio de 2003.

15 Otra realización de la presente invención es una proteína de fusión con anticuerpo o fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones que comprende al menos dos MABs PAM4 o fragmentos de los mismos, en donde los MABs o fragmentos comprenden cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención. También preferiblemente la proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo comprende al menos un primer MAB PAM4 o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención y al menos un segundo MAB o fragmento del mismo, excepto el MAB o fragmento del mismo de los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención. Preferiblemente, el segundo MAB es un anticuerpo asociado a un carcinoma, preferiblemente elegido entre el grupo formado por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, 20 Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLe^a, definidos por el antígeno de Lewis Le(y), y anticuerpos contra CSAp, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, IL-6, MUC2, MUC3 y MUC4, TAG-72, EGFR, CD40, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-6, factores de angiogénesis (p. ej. VEGF), productos de oncogenes y HER2/neu. La proteína de fusión de anticuerpo o fragmentos de la presente invención puede además comprender al menos un agente de diagnóstico y/o terapéutico.

25 La presente invención se refiere también a una secuencia de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un MAB o fragmento del mismo elegido entre el grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos de la presente invención;

(b) una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos dos de los MABs o fragmentos de éstos descritos en (a);

30 (c) una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende dicho MAB o fragmento del mismo de los anticuerpos PAM4 o fragmentos de los mismos de la presente invención y al menos un segundo MAB o fragmento del mismo, distinto del MAB o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención; y

35 (d) una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos un primer MAB o fragmento de uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención y al menos un segundo MAB o fragmento del mismo, distinto del MAB o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención, en donde el segundo MAB es un anticuerpo asociado a un carcinoma. Preferiblemente, el anticuerpo asociado a un carcinoma se elige entre el grupo formado por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLe^a, anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y), y anticuerpos contra CD40, factores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), productos de oncogenes, MUC1, MUC-2, 40 MUC-3, 4-MUC, TAG-72, EGFR, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas, tenascina, IL-6 y HER2/neu.

45 La presente invención se refiere también a un vector de expresión y una célula hospedadora que conoende la secuencia de ADN de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención.

50 Otra realización de la presente invención es una composición para ser usada en un método de suministro de un agente de diagnóstico o terapéutico o una combinación de los mismos, a una diana que comprende (i) proporcionar la composición que comprende un anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo de la invención conjugado con al menos un agente de diagnóstico-detección y/o terapéutico y (ii) administrar a un sujeto en necesidad del mismo el conjugado de diagnóstico o terapéutico de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención. Preferiblemente el agente de diagnóstico-detección se elige entre el grupo que consiste en un radionucleido, un agente de contraste y un agente fotoactivo de diagnóstico-detección, y el agente terapéutico se elige preferiblemente entre el grupo que consiste en un fármaco, una toxina, un agente citotóxico, una

citosina, un inmunomodulador, una hormona, un antagonista de hormonas, un factor de crecimiento, un radionucleido, un metal.

5 También se contempla en la presente invención un anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos multivalentes o fragmentos de los mismos de la presente invención que tienen afinidad hacia un antígeno PAM4 y comprenden uno o más sitios de unión al hapteno para su uso en un método para suministrar un agente de diagnóstico-detección, un agente terapéutico o una combinación de los mismos, a una diana, que comprende:

10 (a) administrar a un sujeto el anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos multivalentes y multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la presente invención que tienen afinidad hacia un antígeno PAM4 y comprenden uno o más sitios de unión de hapteno; (b) esperar un periodo de tiempo suficiente para que una cantidad de anticuerpo no unido se elimine del torrente circulatorio del sujeto; y (c) administrar a dicho sujeto una molécula portadora que comprende un agente de diagnóstico-detección, un agente terapéutico o una combinación de los mismos, que se une a un sitio de unión del anticuerpo. Preferiblemente la molécula portadora se une a más de un sitio de unión del anticuerpo. También se prefiere que el agente de diagnóstico-detección o el agente terapéutico se elijan entre el grupo que comprende isótopos, fármacos, toxinas, citosinas, oligonucleótidos, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, inhibidores de enzimas, factores de crecimiento, radionucleidos y metales.

20 En una realización, un oligonucleótido, tal como una molécula antisentido que inhibe la expresión de bcl-2 como se describe en el documento US 5.734.033 (Reed), puede ser conjugado con, o forma la porción de agente terapéutico de un inmunocóncugado o proteína de fusión de anticuerpo de la presente invención. Alternativamente, el oligonucleótido puede administrarse simultáneamente o secuencialmente con un anticuerpo PAM4 desnudo o conjugado o fragmento de anticuerpo de la presente invención. En una realización preferida, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que preferentemente se dirige contra un oncogén o producto oncogénico de un tumor maligno de células B, tal como bcl-2.

25 Se describe en la presente invención un anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos multivalentes y multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la presente invención que tienen afinidad hacia un antígeno PAM4 y comprenden uno o más sitios de unión de hapteno para su uso en un método para diagnosticar o tratar el cáncer, que comprende: (a) administrar a un sujeto en necesidad del mismo el anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos multivalentes y multiespecíficos o fragmentos de los mismos de la presente invención que tienen afinidad hacia un antígeno PAM4 y comprenden uno o más sitios de unión de hapteno; (b) esperar un periodo de tiempo suficiente para que una cantidad de anticuerpo no unido sea aclarada o eliminada del torrente circulatorio del sujeto; y (c) administrar a dicho sujeto una molécula portadora que comprende un agente de diagnóstico-detección, un agente terapéutico o una combinación de los mismos, que se une a un sitio de unión del anticuerpo. En una realización preferida el cáncer es cáncer de páncreas. También preferiblemente, el método puede utilizarse para la identificación intraoperatoria de los tejidos enfermos, la identificación endoscópica de los tejidos enfermos o la identificación intravascular de los tejidos enfermos.

40 Otra realización de la presente invención es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un MAb PAM4 o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de la presente invención, en donde dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con al menos un agente terapéutico, para su uso en un método de tratamiento de un tumor maligno en un sujeto que comprende: (a) administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un MAb PAM4 o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención, en donde dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con al menos un agente terapéutico, y (b) formular dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo en un excipiente adecuado farmacéuticamente. Preferiblemente, el método comprende además un segundo MAb o fragmento del mismo, no en uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención. Más preferiblemente, el segundo MAb o fragmento del mismo es un MAb desnudo o fragmento del mismo. También preferiblemente, el segundo MAb o fragmento del mismo se elige entre el grupo que consiste en CA 19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLe^a, anticuerpos definidos por el antígeno Lewis Le(y) y anticuerpos contra CSAP, MUC1, MUC-2, MUC-3, 4-MUC, TAG-72, EGFR, CD40, factores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-6, productos oncogénicos y HER2/neu.

55 La invención se refiere también a un conjugado para diagnóstico que comprende un MAb PAM4 o un fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de invención, en donde dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo está conjugado con por lo menos un agente de diagnóstico-detección, para su uso en un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende (a) administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva para diagnóstico del conjugado de diagnóstico que comprende un MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo de uno

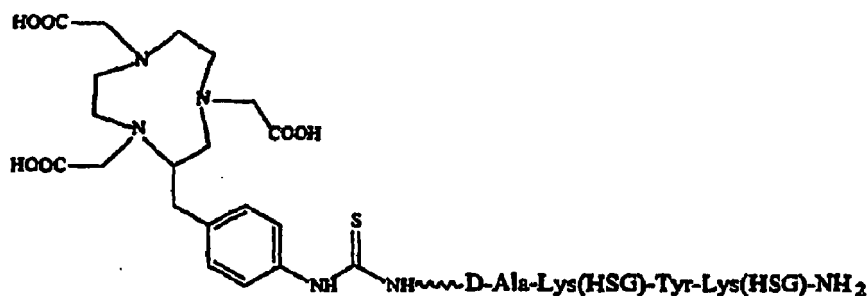
cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención, en donde dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo PAM4 o fragmento de los mismos se conjuga con al menos un agente de diagnóstico-detección y (b) opcionalmente formular dicho MAb PAM4 o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo en un excipiente farmacéuticamente adecuado.

Otra realización de la presente invención es un MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo desnudo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos desnudos, proteínas de fusión o fragmentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de una célula cancerosa en un sujeto, que comprende (i) administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición que comprende un MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo desnudo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos desnudos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención (ii) formular dicho MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo en un excipiente adecuado farmacéuticamente. Preferiblemente, el método comprende además un segundo anticuerpo desnudo o fragmento del mismo, no uno cualquiera de los anticuerpos desnudos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, el segundo anticuerpo o fragmento del mismo puede ser elegido entre el grupo formado por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CBA, aLe^a, anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y) y anticuerpos contra CSAP, MUC1, MUC-2, MUC-3, 4-MUC, TAG-72, EGFR, CD40, factores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-6, productos oncogénicos y HER2/neu.

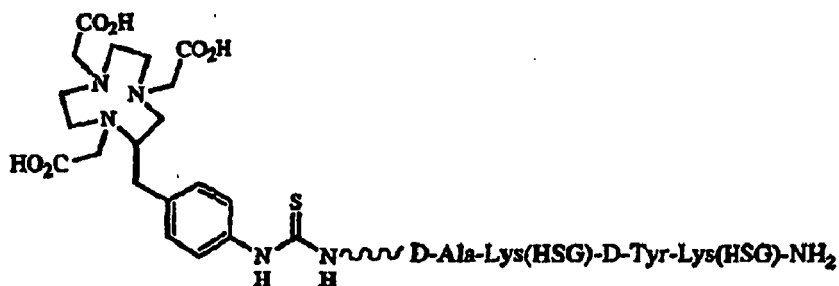
La presente invención se refiere también a una composición que comprende un MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo desnudo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos desnudos, proteínas de fusión o fragmentos de los mismos de la presente invención para su uso en un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende (i) llevar a cabo un ensayo de diagnóstico *in vitro* en una muestra de dicho sujeto con la composición que comprende un MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo desnudo o fragmento del mismo de uno cualquiera de los anticuerpos desnudos, proteínas de fusión, o fragmentos de los mismos de la presente invención. Preferiblemente, el tumor maligno es un cáncer. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de páncreas.

Otra realización de la presente invención es un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido específico que expresa PAM4- antígeno y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable, en donde dicho un brazo que se une específicamente a un tejido objetivo es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo de la presente invención, para su uso en un método para identificar intraoperatoriamente tejidos enfermos que expresan antígeno PAM4, en un sujeto, que comprende: (A) administrar una cantidad efectiva del anticuerpo biespecífico o fragmento del anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido objetivo que expresa antígeno-PAM4 y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable, en donde dicho un brazo que se une específicamente a un tejido orientable es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo; y (B) administrar un conjugado orientable elegido entre el grupo que consiste en:

- (i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (iii) Ac-Lys (HSG) D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys) - NH₂;
- (iv)



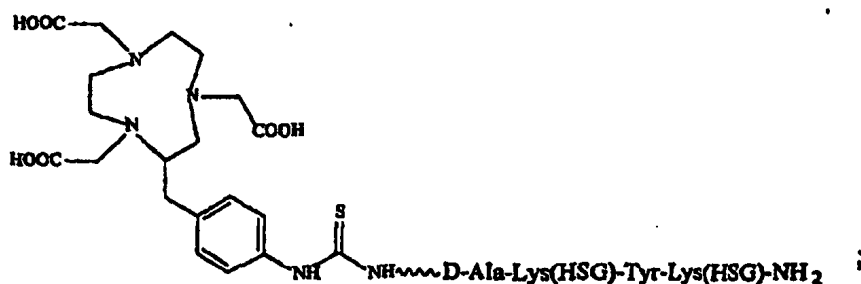
- y
- (v)



La presente invención se refiere también a un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido diana que expresa antígeno-PAM4 y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable, en donde dicho un brazo que se une específicamente a un tejido diana es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo de la presente invención, para su uso en un método para la identificación endoscópica de los tejidos enfermos el antígeno que expresa PAM4, en un sujeto, que comprende: (A) administrar una cantidad efectiva del anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido diana que expresa antígeno-PAM4 y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable en donde dicho un brazo que se une específicamente a un tejido diana es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo; y (B) administrar un conjugado orientable elegido entre el grupo que consiste en:

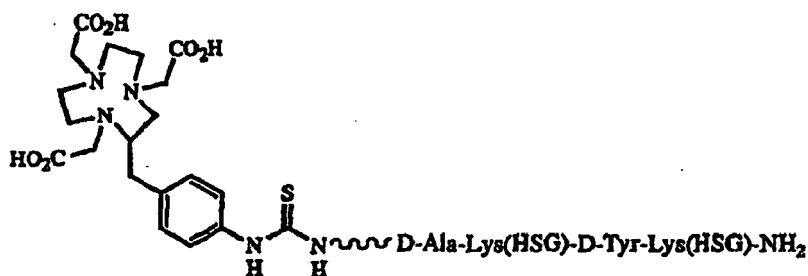
- (i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (iii) Ac-Lys (HSG) D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys) - NH₂;

(iv)



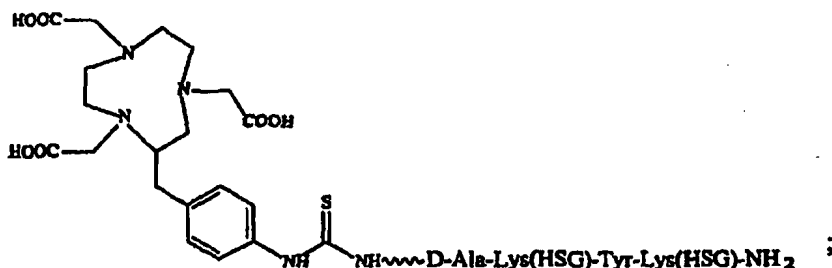
y

(v)



La presente invención se refiere también a un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido diana que expresa antígeno-PAM4 y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable, en donde dicho brazo que se une específicamente a un tejido diana es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo de la presente invención, para su uso en un método para la identificación intravascular de los tejidos enfermos que expresan el antígeno PAM4, en un sujeto, que comprende: (A) administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos un brazo que se une específicamente a un tejido diana que expresa PAM4-antígeno y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable en donde dicho un brazo que se une específicamente a un tejido diana es un anticuerpo hPAM4 o fragmento del mismo; y (B) administrar un conjugado orientable elegido entre el grupo que consiste en:

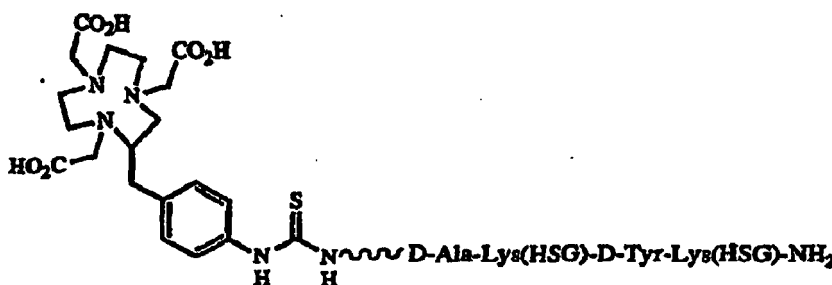
- (i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)- NH₂;
- (iii) Ac-Lys (HSG) D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)- NH₂;
- (iv)



5

y

(v)



10

15

20

25

Otra realización es un anticuerpo biespecífico F(ab)₂ o F(ab')₂ fragmento del mismo, diacuerpo (*diabody*), triacuerpo (*triabody*) o tetracuerpo (*tetrabody*), en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo tiene un primer sitio de unión de anticuerpo de la presente invención que se une específicamente a un antígeno PAM4, y tiene un segundo sitio de unión de anticuerpo que se une específicamente a un hapteno y que permite que el fragmento de anticuerpo se incorpore en el sitio diana, para su uso en un método de detección de lesiones durante un catéter intravascular endoscópico o procedimiento quirúrgico, en donde el método comprende:

(a) inyectar a un sujeto que está sometido a tal procedimiento el anticuerpo biespecífico F(ab)₂ o F(ab')₂, fragmento del mismo, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, en donde dicho anticuerpo biespecífico o fragmento del mismo, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo tiene un primer sitio de unión de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de PAM4, y tiene un segundo sitio de unión de anticuerpo que se une específicamente a un hapteno, y permitir que el fragmento de anticuerpo se incorpore en los sitios diana; (b) opcionalmente borrar fragmentos de anticuerpo no diana usando un agente de aclaramiento anti-idiotipo galactosilado si el fragmento biespecífico no es aclarado o eliminado en gran parte de la circulación dentro de aproximadamente las 24 horas de la inyección e inyectar un hapteno marcado bivalente, que se localiza rápidamente en el sitio diana y es aclarado a través de los riñones; (c) detectar la presencia del hapteno por detección próxima de niveles elevados de marcador incorporado en los sitios diana con medios de detección, dentro de las 48 horas de la primera inyección, y llevar a cabo tal procedimiento, en donde dicha detección se realiza sin el uso de un agente de contraste o agente de substracción.

30

La invención se refiere también a un inmunoconjugado hPAM4 o fragmento del mismo de la presente invención para ser usado en un método para la detección de una lesión próxima, durante un procedimiento operatorio, intravascular o endoscópico, en donde el método comprende: (a) inyectar a un sujeto sometido a ese procedimiento por vía parenteral una cantidad efectiva del inmunoconjugado hPAM4 o fragmento del mismo, (b) llevar a cabo el procedimiento dentro de las 48 horas después de la inyección; (c) explorar el interior del sujeto al que se accede muy próximamente con un medio de detección para detectar la presencia de dicho anticuerpo marcado o fragmento del mismo; y (d) localizar los sitios de incorporación de dicho anticuerpo marcado o fragmento del mismo mediante la detección de niveles elevados de dicho anticuerpo marcado o fragmento del mismo en tales sitios con los medios de detección, se considera también en la presente invención.

35

Breve descripción de las figuras.

La *Figura 1* muestra los genes V clonados y las secuencias de aminoácidos deducidas del PAM4 murino. La Figura 1A muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de PAM4 V_k. La Figura 1B muestra las secuencias de ADN y aminoácidos de PAM4V_H. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las correspondientes secuencias de ADN se dan como códigos de una letra bajo la secuencia de nucleótidos. La numeración de la secuencia de nucleótidos está al lado derecho. Los restos de aminoácidos en las regiones CDR se muestran en negrita y subrayados. La numeración de Kabat de la molécula de Ig se usa para los restos de aminoácidos como se muestra por la numeración encima de los restos del aminoácido. Los restos de aminoácido numerados mediante una letra son los restos de inserción definidos por el esquema de numeración de Kabat. Los restos de inserción tienen los mismos dígitos precedentes del resto anterior. Por ejemplo, los restos 82, 82A, 82B y 82C en la figura 1B se indican como 82, A, B y C, respectivamente.

La *Figura 2* muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de PAM4 quimérico (cPAM4) expresadas en las células Sp2/0. La Figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos de cPAM4V_k. La Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos de cPAM4V_H. Las secuencias se dan como códigos de una letra. Los restos de aminoácido en las regiones CDR se muestran en negrita y subrayados. La numeración de los aminoácidos es la misma que en la Figura 1.

La *Figura 3* muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, PAM4 y hPAM4. La Figura 3A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos V_k del anticuerpo humano Walker con PAM4 y hPAM4. Los puntos indican que los restos de PAM4 son idénticos a los correspondientes restos de los anticuerpos humanos. Regiones enmarcadas representan las regiones CDR. Ambos restos N- y C-terminales (subrayados) de hPAM4 están fijados por los vectores utilizados. Se utiliza el esquema del número de molécula de Ig de Kabat para numerar los restos como en la Fig. 1.

La *Figura 4* muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de PAM4 humanizado (bPAM4) expresadas en las células Sp2/0. Figura 4A muestra las secuencias de ADN y aminoácidos de hPAM4V_k y la Figura 4B muestra las secuencias de ADN y aminoácidos de hPAM4V_H. La numeración de la secuencia de nucleótidos está en el lado derecho. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las correspondientes secuencias de ADN se dan como códigos de una letra. Los restos de aminoácido en las regiones CDR se muestran en negrita y subrayados. El esquema de numeración de la molécula de Ig de Kabat se utiliza para restos de aminoácidos como en la Fig. 1A y la Fig. 1B.

La *Figura 5* muestra la actividad de unión del anticuerpo PAM4 humanizado, hPAM4, en comparación con el PAM4 quimérico, cPAM4. El hPAM4 se muestra mediante rombos y el cPAM4 se muestra en círculos rellenos. Los resultados indican actividad de unión comparable de los anticuerpos hPAM4 y cPAM4 cuando compiten con la unión de ¹²⁵I-cPAM4 a CaPan1 Ag. Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables incluyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo derivado de una especie mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A menos que se especifique otra cosa, "uno" o "un" significa "uno o más". Como se describe el presente texto, el término "anticuerpo PAM4" incluye anticuerpos PAM4 humanizados, humanos y murinos.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, PAM4, como se define en las reivindicaciones, que es útil para el diagnóstico, la detección, el estadiaje y el tratamiento del cáncer de páncreas. Los anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos de la presente invención son humanizados. El anticuerpo PAM4 murino (mPAM4) es un anticuerpo MUC1 desarrollado empleando una mucina de cáncer de páncreas derivada del carcinoma de páncreas humano RIP-1 xenoinjertado como inmunógeno, Gold et al., Int. J. Cancer, 57: 204-210 (1994). El anticuerpo mPAM4 reconoce un único y nuevo epítipo en el antígeno del cáncer de páncreas diana. Estudios de tinción inmunohistológica, tales como los descritos en el Ejemplo 1, han indicado que el MAb PAM4 se une al dominio situado entre el término amino y el comienzo del dominio de repetición de un antígeno MUC1 expresado por células del cáncer de mama, páncreas y otros, con unión al tejido humano normal limitada. Los anticuerpos PAM4 de la presente invención son relativamente específicos para el cáncer de páncreas y por tanto se unen de un modo preferente a las células del cáncer de páncreas. El anticuerpo PAM4 es reactivo con un epítipo diana, que puede ser rápidamente internalizado. Este epítipo se expresa principalmente por antígenos asociados con el cáncer de páncreas y no con pancreatitis focal. Los estudios de localización y terapia utilizando un MAb PAM4 radiomarcado en modelos animales han demostrado orientación al tumor y eficiencia terapéutica.

Los anticuerpos PAM4 de la presente invención se unen al antígeno PAM4, que es el dominio localizado entre el término amino y el comienzo del dominio de repetición de MUC1, un antígeno producido por muchos órganos y tipos de tumores. Un anticuerpo PAM4 preferido de la presente invención se une preferiblemente a las células de cáncer de páncreas. Los estudios con un MAb PAM4, tales como el anticuerpo monoclonal PAM4 en el Ejemplo 2, indican que el anticuerpo muestra varias propiedades importantes, que lo hacen candidato para aplicaciones clínicas de

diagnóstico y terapéuticas. Dado que el antígeno PAM4 proporciona una diana útil para el diagnóstico y la terapia, es deseable obtener un MAb que reconozca un epítipo de un antígeno del cáncer de páncreas que es distinto de los epítipos reconocidos por los anticuerpos no PAM4 (CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, aLe^a y los antígenos de Lewis) descritos en los estudios anteriores.

5 Los anticuerpos adecuados para su uso en combinación o junto con los anticuerpos PAM4 de la presente invención incluyen, por ejemplo, los anticuerpos CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLe^a y anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y), o anticuerpos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno-p específico del colon (CSAp), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, HER2/neu, EGFR, factores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y IL-6, así como productos oncogénicos, y anticuerpos contra sustancias de necrosis tumoral, como se describe en las patentes de Epstein et al., (documentos U. S. Pat. n° 6.071.491, 6.017.514, 5.019.368 y 5.882.626). Tales anticuerpos serían útiles para complementar los métodos actuales de inmunoterapia e inmunodetección con anticuerpo PAM4. En aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos que son agonistas o antagonistas de inmunomoduladores implicados en la función de las células efectoras contra células tumorales podrían también ser
10 útiles en combinación con anticuerpos PAM4 solos o en combinación con otros anticuerpos asociados al tumor, siendo un ejemplo los anticuerpos contra CD40. Todyrk et al., J. Immunol. Methods, 248: 139-147 (2001); Turner et al., J. Immunol, 166: 89-94 (2001). También son utilizables los anticuerpos contra marcadores o productos oncogénicos, o anticuerpos contra factores de angiogénesis, tales como VEGF. Los anticuerpos VEGF se describen en Thorpe et al., documento U.S. Pat. n° 6.342.221, 5.965.132 y 6.004.554.

20 Además, la disponibilidad de otro anticuerpo similar a PAM4 es esencial para el desarrollo de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima doble determinante (ELISA), que es útil para la detección de un antígeno PAM4 en muestras clínicas. Los experimentos con ELISA se describen en los Ejemplos 4 y 7.

La presente invención describe anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que se unen al dominio situado entre el término amino y el comienzo del dominio de repetición de MUC1 y pueden ser utilizados para
25 métodos de diagnóstico y terapéuticos. También preferiblemente, los anticuerpos PAM4 de la presente invención se unen de forma preferencial a las células de cáncer de páncreas. Dado que los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el hospedador humano como una proteína extraña, e inyecciones repetidas pueden conducir a reacciones de hipersensibilidad perjudiciales, la humanización de secuencias PAM4 murinas puede reducir la respuesta inmunitaria adversa que pueden experimentar los pacientes. Para anticuerpos monoclonales con base murina, esto suele denominarse respuesta de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA). Preferiblemente algunos restos humanos en las regiones marco del anticuerpo PAM4 humanizado o fragmentos del mismo son sustituidos por sus contrapartidas murinas. También se prefiere usar una combinación de secuencias marco procedentes de dos anticuerpos humanos diferentes para V_H. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano.

35 También se ha descrito un anticuerpo PAM4 humano. Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido, por ejemplo, a partir de ratones transgénicos que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una sensibilización antigénica. En esta técnica, elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana son introducidos en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones diana de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos y los ratones pueden utilizarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos. Se describen métodos para la obtención de anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos en Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368: 856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994). También puede construirse un anticuerpo totalmente humano por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de presentación de fago, todos los cuales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable de la inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, genes del dominio variable del anticuerpo se clonan en marco un gen de proteína de cubierta, bien sea mayor o menor, de un bacteriófago filamentoso, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula
40 filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también tienen por resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De esta forma, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación del fago puede llevarse a cabo en una variedad de formatos; para su revisión, véase por ejemplo Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3: 5564-571 (1993).

55 Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención se desarrollan preferentemente contra un preparado de mucina crudo procedente de un tumor de páncreas humano. De una manera relacionada, el anticuerpo PAM4 puede obtenerse usando un preparado sustancialmente puro del antígeno PAM4. Una proteína sustancialmente pura es una proteína que está esencialmente libre componentes celulares contaminantes, que están asociados con la proteína en la naturaleza.

60

Definiciones

En la descripción que sigue, se utiliza una serie de términos y se proporcionan las definiciones siguientes para facilitar la comprensión de la presente invención.

5 Un anticuerpo, como se describe el presente texto, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, presente en la naturaleza o formada por procesos recombinantes de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una porción activa inmunológicamente (es decir, de unión específica) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo.

10 Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, sFv y similares. Al margen de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-CD20 se une con un epítipo de CD20. La expresión "fragmento de anticuerpo" incluye también cualquier proteína sintética o construida genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en las regiones variables, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptidos de cadena simple recombinantes en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador de péptido ("proteínas scFv ") y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable.

20 Un anticuerpo desnudo es generalmente un anticuerpo que no está conjugado con un agente terapéutico o de diagnóstico-detección. Sin embargo, también puede ser un fragmento de anticuerpo que no está conjugado con un agente terapéutico o de diagnóstico-detección. Esto es porque la porción Fc de la molécula de anticuerpo proporciona funciones efectoras, tal como la fijación del complemento y ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), que ponen en acción mecanismos que pueden tener como resultado la lisis celular. Sin embargo, es posible que la porción Fc no sea precisa para la función terapéutica, entrando en juego otros mecanismos tales como la apoptosis. Los anticuerpos desnudos incluyen tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, así como proteínas de fusión y ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos.

30 Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables que incluyen las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo derivado de una especie, preferentemente un anticuerpo de roedor, mientras que los dominios constantes de la molécula del anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivarse de los de otras especies, tales como un gato o un perro.

35 Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDRs de un anticuerpo de una especie, por ejemplo un anticuerpo de roedor, son transferidas de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo roedor a dominios variables de cadena ligera y pesada humana. Los dominios constantes de la molécula del anticuerpo son derivados de los de un anticuerpo humano.

40 Un anticuerpo humano es un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos que han sido "diseñados" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una sensibilización antigénica. En esta técnica, se introducen elementos de los loci de la cadena humana ligera y pesada en cepas de ratones derivadas de las líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones diana de los loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden ser utilizados para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Se describen métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos en Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg et al., Nature 368: 856(1994) y Taylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994). Un anticuerpo humano completo puede ser construido también por métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación de fago, todos los cuales son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de éstos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, genes del dominio variable del anticuerpo son clonados en marco en un gen de la proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso y mostraron como anticuerpos funcionales fragmentos en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo tienen también por resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De esta forma, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fago se puede realizar en una diversidad de formatos; para su revisión, véase p. ej. Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3: 5564-571 (1993).

55 También pueden generarse anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro*. Véanse las patentes de EE. UU. n° 5.567.610 y n° 5.229.275.

Un agente terapéutico es una molécula o átomo que se administra separadamente, simultáneamente o secuencialmente con un resto de anticuerpo o conjugada con un resto de anticuerpo, es decir, anticuerpo o

fragmento de anticuerpo, o un subfragmento, y es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fármacos, toxinas, nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos.

5 Un agente de diagnóstico-detección es una molécula o átomo que se administra conjugado con un resto de anticuerpo, es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o subfragmento, y es útil en el diagnóstico de una enfermedad localizando las células que contienen el antígeno. Los agentes de diagnóstico-detección útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, radioisótopos, colorantes (como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (p. ej. iones paramagnéticos) para formación de imágenes de resonancia magnética (MRI). La patente de EE. UU. n° 6.331.175 describe la técnica de MRI y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente de potenciación de MRI. Preferentemente, los agentes de diagnóstico-detección se eligen entre el grupo formado por radioisótopos, agentes potenciadores para su uso en formación de imágenes de resonancia magnética y compuestos fluorescentes. Para cargar un componente de anticuerpos con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacer que reaccione con un reactivo que tiene una larga cola a la cual se une una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Tal cola puede ser un polímero tal como polilisina, un polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tiene grupos colgantes a los que pueden unirse grupos quelantes tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminetetracético (EDTA), ácido dietilentriaminapentacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas, y grupos similares conocidos por ser útiles para este propósito. Los quelatos se acoplan a los anticuerpos usando reacciones químicas estándar. El quelato está normalmente ligado al anticuerpo mediante un grupo, que permite la formación de un enlace con la molécula con pérdida mínima de inmunorreactividad y mínima agregación y/o entrecruzamiento interno. Otros métodos y reactivos, más inusuales, para conjugar quelatos con los anticuerpos se describen en la patente de EE. UU. n° 4.824.659 de Hawthorne, titulada "Antibody Conjugates", expedida el 25 de abril de 1989. Las combinaciones de metal-quelato particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico en el intervalo de energía general de 60 a 4.000 keV, tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br , para formación de imágenes. Los mismos quelatos, cuando se complejan con metales no radioactivos tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para MRI cuando se usan junto con los anticuerpos de la invención. Quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, lo más particularmente con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Tales complejos metal-quelato pueden hacerse muy estables haciendo a la medida el tamaño del anillo para el metal de interés. Otros quelatos de tipo anillo tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para unir nucleidos establemente, tales como ^{223}Ra para RAIT, están comprendidos en la invención.

Un inmunoconjugado es un anticuerpo, proteína de fusión o fragmento del mismo conjugado con al menos un agente terapéutico y/o de diagnóstico-detección. El agente de diagnóstico-detección puede comprender un radionucleido o no-radionucleido, un agente de contraste (tal como para la formación de imágenes de resonancia magnética, tomografía computerizada o ultrasonidos), y el radionucleido puede ser un isótopo emisor de radiaciones gamma, beta, alfa, electrones Auger o positrones.

Un vector de expresión es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula hospedadora. Típicamente, la expresión del gen se pone bajo el control de ciertos elementos reguladores, incluyendo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos del tejido y potenciadores. Se dice que tal gen está "operablemente unido a" los elementos reguladores.

Un hospedador recombinante puede ser cualquier célula procariota o eucariota que contiene un vector de clonación o bien un vector de expresión. Este término incluye también las células procariotas o eucariotas, así como animales transgénicos, que han sido modificados genéticamente para que contengan el gen o los genes clonados en el cromosoma o el genoma de la célula o células hospedadoras. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células de mieloma, tales como las células SP2/0 y células NS0, así como las células de ovario de hámster chino (CHO), líneas de células de hibridoma y otras células hospedadoras de mamífero útiles para expresar los anticuerpos. Particularmente útil para expresar mAbs y otras proteínas de fusión, es también una línea de células humanas, PER.C6, descrita en el documento WO 0063403A2, que produce de 2 a 200 veces más proteína recombinante en comparación con las líneas de células de mamífero convencionales, tales como las células CHO, COS, Vero, Hela, BHK y SP2. Los animales transgénicos especiales con un sistema inmunológico modificado son particularmente útiles para la elaboración de anticuerpos totalmente humanos.

Como se usa el presente texto, la expresión proteína de fusión de anticuerpo es una molécula de unión de antígeno producida por vía recombinante en la cual se unen dos o más del mismo o distinto anticuerpo natural, anticuerpo de cadena simple o segmentos de fragmentos de anticuerpo con las mismas o diferentes especificidades. La valencia de la proteína de fusión indica el número total de brazos o sitios de unión que tiene la proteína de fusión para un antígeno o epítopo; esto es, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia de la proteína de fusión de anticuerpo significa que se pueden aprovechar interacciones múltiples en la unión a un antígeno, incrementando así la avidéz de unión con el antígeno. La especificidad indica cuántos antígenos o epítopos es capaz de unir una proteína de la fusión de anticuerpo; es decir, monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos, multiespecíficos. Utilizando estas definiciones, un anticuerpo natural, p. ej. una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión pero es monoespecífica porque se une a un antígeno. Las proteínas de fusión multivalentes

mono-específicas tienen más de un sitio de unión para un epítipo pero sólo se unen con el mismo o diferente epítipo en el mismo antígeno, por ejemplo un díptico con dos sitios de unión reactivos con el mismo antígeno. La proteína de fusión puede comprender una combinación multivalente o multi-específica de componentes del anticuerpo diferentes o copias múltiples del mismo componente del anticuerpo. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un agente terapéutico. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para tales proteínas de fusión se incluyen inmunomoduladores ("proteína de fusión anticuerpo-inmunomodulador") y toxinas ("proteína de fusión anticuerpo-toxina"). Una toxina preferida comprende una ribonucleasa (RNasa), preferiblemente una RNasa recombinante.

Un anticuerpo multi-específico es un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a por lo menos dos dianas que son de estructura diferente, p. ej. dos antígenos diferentes, dos epítopos diferentes en el mismo antígeno, o un hapteno y/o un antígeno o epítipo. Una especificidad sería para un antígeno o epítipo de célula B, célula T, célula mielóide, plasma y mastocitos. Otra especificidad podría ser para un antígeno diferente en el mismo tipo de célula, tal como CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLADR, CD74 y CD22 en células B. Los anticuerpos multivalentes y multi-específicos son construcciones que tienen más de un sitio de unión, y los sitios de unión son de especificidad diferente. Por ejemplo, un díptico, donde un sitio de unión reacciona con un antígeno y el otro con el otro antígeno.

Un anticuerpo bio-específico es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente a dos dianas que son de estructura diferente. Los anticuerpos bio-específicos (bsAb) y fragmentos de anticuerpos bio-específicos (bsFab) tienen al menos un brazo que se une específicamente, por ejemplo, a antígeno o epítipo de una célula B, célula T, células mieloides, de plasma y mastocitos, y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado orientable que lleva un agente terapéutico o de diagnóstico-detección. Pueden producirse una variedad de proteínas de fusión bio-específicas usando ingeniería molecular. En una forma, la proteína de fusión bio-específica es monovalente, consistiendo, por ejemplo, en un scFv con un único sitio de unión para un antígeno y un fragmento Fab con un único sitio de unión para un segundo antígeno. En otra forma, la proteína de fusión bio-específica es divalente, consistente, por ejemplo, en una IgG con un sitio de unión para un antígeno y dos scFv con dos sitios de unión para un segundo antígeno.

Preparación de anticuerpos PAM4 humanos y humanizados.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales para antígenos específicos por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975) y Coligan et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, páginas 2.5.1 - 2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) (en adelante "Coligan"). Brevemente, los MAbs PAM4 pueden obtenerse inyectando ratones con una composición que comprende el antígeno PAM4, verificando la presencia de producción de anticuerpo extrayendo una muestra de suero, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno PAM4, cultivando los clones que producen anticuerpos contra el antígeno PAM4, y aislando los anticuerpos PAM4 de los cultivos de hibridoma. Los anticuerpos PAM4 de la presente invención se unen al antígeno PAM4, un dominio situado entre el término amino y el comienzo del dominio de repetición de MUC 1. Los anticuerpos PAM4 de la presente invención se unen preferiblemente a las células de cáncer de páncreas.

Después del desarrollo inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos pueden ser secuenciados y preparados subsiguientemente mediante técnicas recombinantes. La humanización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos murinos es bien conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanizados son producidos transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad murinas de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina del ratón a un dominio variable humano y después sustituyendo los restos humanos en las regiones marco de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de los anticuerpos monoclonales humanizados soslaya problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas.

Un anticuerpo totalmente humano, es decir PAM4 humano, puede obtenerse de un animal transgénico no humano. Véase, p. ej., Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997); patente de EE.UU. n.º 5.633.425. Por ejemplo, se puede recuperar un anticuerpo humano de un ratón transgénico que posee loci de la inmunoglobulina humana. El sistema inmunitario humoral del ratón es humanizado inactivando los genes endógenos de la inmunoglobulina e introduciendo los loci de la inmunoglobulina humana. Los loci de la inmunoglobulina humana son excesivamente complejos y comprenden un gran número de segmentos discretos que, juntos, ocupan casi el 0,2% del genoma humano. Para asegurarse de que los ratones transgénicos son capaces de producir repertorios adecuados de anticuerpos, deben introducirse grandes porciones de loci de cadena pesada y cadena ligera humanos en el genoma del ratón. Esto se realiza en un proceso por etapas que empieza con la formación de cromosomas artificiales de levadura (YACs) que contienen los loci de la cadena pesada o bien de la ligera de la inmunoglobulina humana en la configuración de la línea germinal. Dado que cada inserto es aproximadamente de 1 Mb de tamaño, la construcción de los YAC requiere la recombinación homóloga de fragmentos solapantes de los loci de la inmunoglobulina. Los dos YACs, uno que contiene los loci de cadena pesada y uno que contiene los loci de cadena ligera, son introducidos separadamente en ratones a través de la fusión de YAC que contienen esferoblastos de levadura con células madre embrionarias de ratón. Los clones de células madre embrionarias son después microinyectados en blastocistos de ratón. Los machos quiméricos resultantes son cribados en relación con su capacidad para transmitir

los YAC a través de su línea germinal y se crían con ratones deficientes en la producción de anticuerpos murinos. La cría de las dos cepas transgénicas, una que contiene los loci humanos de cadena pesada y la otra que contiene los loci humanos de cadena ligera, crea una progenie que produce anticuerpos humanos en respuesta a la inmunización.

5 Las técnicas generales de clonación de dominios variables de la inmunoglobulina murina se describen, por ejemplo, en la publicación de Orlandi et al., Proc. Nat ' l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989). Se describen técnicas para producir MAbs humanizados, por ejemplo, en Carter et al., Proc. Nat ' l Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992), Singer et al., J. Immun. 150: 2844 (1992), Mountain et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10: 1 (1992) y Coligan en las páginas 10.19.1 a 10.19.11.

10 En general, las secuencias V_K (cadena ligera variable) y V_H (cadena pesada variable) para los anticuerpos PAM4 pueden obtenerse por una variedad de procedimientos de clonación molecular, tales como cribado de biblioteca de RT-PCR, 5'-RACE y cADN. Específicamente, los genes de V_H y V_K del MAb PAM4 fueron clonados por amplificación por PCR de las células de hibridoma por RT-PCR y 5'-RACE, respectivamente, y sus secuencias se determinaron mediante secuenciación de ADN. Para confirmar su autenticidad, los genes V_L y V_H clonados pueden ser expresados en cultivo celular como un Ab como se describe en Orlandi et al., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833 (1989)). Basándose en las secuencias de genes V, se puede diseñar entonces un anticuerpo PAM4 humanizado y construirse como se describe en Leung et al. (Mol. Immunol., 32: 1413 (1995)). El cDNA puede ser preparado a partir de cualquier línea de hibridoma o línea de células transfectadas conocidas que produce un anticuerpo PAM4 murino o humanizado por técnicas generales de clonación molecular (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989)). El Ejemplo 7 describe el proceso de humanización utilizado para el MAb hPAM4.

Los anticuerpos pueden ser aislados generalmente de los medios de cultivo de células de la forma siguiente. Se adaptan cultivos de transfectoma a un medio libre de suero. Para la producción de anticuerpo humanizado, las células se cultivan como un cultivo de 500 mL en frascos rotatorios usando HSFM. Los cultivos se centrifugan y el sobrenadante se filtra a través de una membrana de 0,2 μ . El medio filtrado se hace pasar a través de una columna de proteína A (1 x 3 cm) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La resina se lava después con aproximadamente 10 volúmenes de la columna de PBS y el anticuerpo unido a la proteína A es eluido de la columna con tampón de glicina 0,1 M (pH 3,5) que contiene EDTA 10 mM. Se recogen fracciones de 1,0 ml en tubos que contienen 10 μ l de Tris 3 M (pH 8,6) y las concentraciones de proteína se determinan a partir de la absorbancia a 280/260 nm. Las fracciones de pico se agrupan, se dializan frente a PBS, y el anticuerpo se concentra, por ejemplo, con el equipo Centricon 30 (Amicon, Beverly, MA). La concentración de anticuerpo se determina mediante un ELISA, como antes, y su concentración se ajusta a aproximadamente 1 mg/ml con PBS. Se añade convenientemente azida sódica, 0,01% (p/v), a la muestra como conservante.

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados para preparar los anticuerpos PAM4 se discuten en el Ejemplo 7, más adelante. En una realización preferida, un anticuerpo PAM4 humanizado o fragmento de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un MAb PAM4 murino y las regiones marco (FR) de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano y las regiones constantes de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano, en donde las CDRs de la región variable de la cadena ligera del PAM4 humanizado comprende CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SASSSVSSSYLY, CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de STSNLAS, y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de HQWNRYPYT; y las CDRs de la región variable de la cadena pesada del MAb PAM4 humanizado comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SYVLH, CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de YINPYNDGTQYNEKFKG y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de GFGGSYGFAY. También preferiblemente, las FRs de las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo humanizado comprenden al menos un aminoácido sustituido a partir de dichas correspondientes FRs del MAb PAM4 murino.

Los MAbs PAM4 pueden ser aislados y purificados de cultivos de hibridoma mediante una diversidad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa, cromatografía de exclusión de tamaños y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1 a 2.7.12 y páginas 2.9.1 a 2.9.3. Además, véase Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en Methods in Molecular Biology, Vol. 10, páginas 79 a 104 (The Humana Press, Inc. 1992).

Los MAbs PAM4 pueden ser caracterizados por una diversidad de métodos que son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un MAb PAM4 para unirse al antígeno PAM4 puede ser verificada usando un ensayo inmunoenzimático indirecto, análisis de citometría de flujo o análisis Western.

Producción de fragmentos de anticuerpos PAM4.

55 La presente invención contempla el uso de fragmentos de anticuerpos PAM4. Pueden generarse por técnicas conocidas fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos. Los fragmentos de anticuerpo son porciones de unión con el antígeno de un anticuerpo, tales como $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, sFv y similares. Pueden ser producidos fragmentos $F(ab')_2$, por ejemplo, por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y pueden generarse fragmentos Fab' mediante la reducción de puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Estos métodos se

describen, por ejemplo, en Goldenberg, patentes de EE. UU. nº 4.036.945 y nº 4.331.647 y en las referencias contenidas en dichos documentos. Véanse también Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman y col., en Methods of Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967) y Coligan en las páginas 2.8.1 a 2.8.10 y 2.10. a 2.10.4. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de F(ab)₂ (Huse et al., 1989, Science, 246: 1274 - 1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab' monoclonal con la especificidad deseada. La presente invención abarca los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

Una molécula de Fv de cadena simple (scFv) comprende un dominio V_L y un dominio V_H. Los dominios V_L y V_H se asocian para formar un sitio de unión diana. Estos dos dominios están además unidos covalentemente por un enlazador de péptido (L). Una molécula de scFv se representa como V_L-L-V_H si el dominio V_L dominio es la parte N-terminal de la molécula scFv, o bien como V_H-L-V_L si el dominio V_H es la parte N-terminal de la molécula de scFv. Se describen métodos para hacer moléculas de scFv y diseñar enlazadores de péptido adecuados en la patente de EE. UU. nº 4.704.692, patente de EE. UU. nº 4.946.778, Raag R. y M. Whitlow, "Single Chain Fvs". FASEB Vol 9.73-80 (1995) y R.E. Bird y B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions", TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991).

Puede prepararse un fragmento de anticuerpo por hidrólisis proteolítica del anticuerpo de longitud completa o por expresión, en *E. coli* u otro hospedador, del ADN que codifica el fragmento. Un fragmento de anticuerpo puede obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos de longitud completa por métodos convencionales. Por ejemplo, puede ser producido un fragmento de anticuerpo por segmentación (clivaje) enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de aproximadamente 100 Kd representado F(ab')₂. Este fragmento puede seguir siendo segmentado utilizando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la segmentación de los enlaces disulfuro, para producir un fragmento monovalente Fab' de aproximadamente 50Kd. Alternativamente, una segmentación enzimática con papaína produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patente de EE. UU. nº 4.036.945 y 4.331.647 y en las referencias contenidas en dichos documentos. Véanse también Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967) y Coligan en las páginas 2.8.1 a 2.8.10 y 2.10. a 2.10.4.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de complementariedad (CDR). Una CDR es un segmento de la región variable de un anticuerpo que es complementaria en la estructura a la del epítipo al que se une el anticuerpo y es más variable que el resto de la región variable. En consecuencia, una CDR se denomina a veces como región hipervariable. Una región variable comprende tres CDRs. Los péptidos CDR pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para sintetizar la región variable a partir del RNA de células productoras de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), páginas 166 a179 (Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), páginas 137 a 185 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

Pueden usarse también otros métodos para segmentar anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, segmentación más intensa de los fragmentos, u otras técnicas genéticas, químicas o enzimáticas, siempre y cuando los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Producción de proteínas de fusión de anticuerpo PAM4 humanizado y humano.

Las proteínas de fusión de anticuerpo de la presente invención pueden ser preparadas por una diversidad de procedimientos convencionales, que van desde la unión de glutaraldehído, a uniones más específicas entre grupos funcionales. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que comprenden las proteínas de fusión descritas en el presente texto están preferiblemente unidas covalentemente entre sí, directamente o a través de un resto enlazador, a través de uno o más grupos funcionales en el anticuerpo o fragmento, por ejemplo, grupos amino, carboxilo, fenilo, tiol o hidroxilo. Pueden usarse varios enlazadores convencionales además del glutaraldehído, por ejemplo diisocianatos, diisotiocianatos, ésteres de bis(hidroxisuccinimida), carbodiimidas, ésteres de maleimidahidroxisuccinimida y similares.

Un método simple para producir proteínas de fusión de PAM4 humanizado y humano es mezclar los anticuerpos o fragmentos en presencia de glutaraldehído. Los enlaces de base de Schiff iniciales pueden estabilizarse, por ejemplo, mediante la reducción de borohidruro para dar aminas secundarias. Puede usarse un diisotiocianato o una carbodiimida en vez de glutaraldehído como enlazador no específico del sitio. En una realización de la presente invención, una proteína de fusión de anticuerpo comprende un MAb PAM4 humanizado o humano, o fragmento del mismo, en donde el MAb se une al dominio situado entre el término amino y el principio del dominio de repetición del antígeno MUC1. Esta proteína de fusión y fragmentos de la misma se unen preferentemente a las células de cáncer de páncreas. Este MAb monoespecífico monovalente es útil para la orientación directa de un antígeno, en donde el

MAB es fijado a un agente terapéutico, un agente de diagnóstico-detección o una combinación de los mismos, y la proteína es directamente administrada a un paciente en necesidad de la misma.

Las proteínas de fusión de anticuerpo PAM4 y fragmentos del mismo de la presente invención pueden en vez de ello comprender al menos dos MABs PAM4 humanizados o humanos o fragmentos de los mismos, donde al menos dos de los MABs o fragmentos de los mismos se unen a epítomos distintos del antígeno PAM4. Por ejemplo, los MABs pueden producir diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos específicos del antígeno, que son multivalentes pero monoespecíficos para el antígeno PAM4. La asociación no covalente de dos o más moléculas scFv puede formar diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos funcionales. Los diacuerpos monoespecíficos son homodímeros del mismo scFv, donde cada scFv comprende el dominio V_H del anticuerpo elegido seleccionado conectado por un enlazador corto al dominio V_L del mismo anticuerpo. Un diacuerpo es un dímero bivalente formado por la asociación no covalente de dos scFvs, dando dos sitios de unión de Fv. Un triacuerpo es el resultado de la formación de un trímero trivalente de tres scFvs, dando tres sitios de unión, y un tetracuerpo es un tetrámero tetravalente de cuatro scFvs, dando por resultado cuatro sitios de unión. Se han hecho algunos diacuerpos monoespecíficos usando un vector de expresión que contiene una construcción de gen recombinante que comprende V_{H1} -enlazador- V_{L1} . Véanse Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 6444 a 6448 (1993); Atwell et al., Molecular Immunology 33: 1301 a 1302 (1996); Holliger et al., Nature Biotechnology 15: 632 a 631(1997); Helfrich et al., Int. J. Cancer 76: 232 a 239 (1998); Kipriyanov et al., Int. J. Cancer 77: 763 a 772 (1998); Holiger et al., Cancer Research 59: 2909 a 2916(1999)). Se describen métodos de construcción de scFvs en los documentos US 4.946.778 (1990) y US 5.132.405 (1992). Se describen métodos de producción de anticuerpos monoespecíficos multivalentes, basados en scFv en los documentos US 5.837.242 (1998), U.S. 5.844.094 (1998) y WO-98/44001 (1998). La proteína de fusión de anticuerpo monoespecífico polivalente se une a dos o más del mismo tipo de epítomos que pueden situarse en el mismo antígeno o en antígenos separados. El aumento de valencia permite una interacción adicional, mayor afinidad y tiempos de residencia más largos. Estas proteínas de fusión de anticuerpo pueden ser utilizadas en sistemas de orientación directa, donde la proteína de fusión de anticuerpo se conjuga con un agente terapéutico, un agente de diagnóstico-detección o una combinación de éstos, y ser administradas directamente a un paciente en necesidad de ellas.

Una realización preferida de la presente invención es un anticuerpo multivalente y multiespecífico o fragmento del mismo que comprende más de un sitio de unión del antígeno que tiene afinidad hacia un epítomo diana PAM4 y uno o más epítomos adicionales asociados con los antígenos del cáncer de páncreas. Esta proteína de fusión es multiespecífica porque se une al menos a dos epítomos diferentes, que pueden residir en los mismos o en diferentes antígenos. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender más de un sitio de unión al antígeno, el primero con afinidad hacia un epítomo del antígeno PAM4 y el segundo con afinidad hacia otro antígeno diana como TAG-72 o CEA. Otro ejemplo es una proteína de fusión con anticuerpo PAM4 biespecífico que puede comprender un MAB CA19.9 (o fragmento del mismo) y un MAB PAM4 (o fragmento del mismo). Tal proteína de fusión tendrá afinidad hacia CA19.9, así como el dominio situado entre el término amino y el inicio del dominio de repetición de MUC1. También se contempla en la presente invención una proteína de fusión que comprende más de un sitio de unión con el antígeno que tiene afinidad para al menos dos diferentes epítomos del antígeno PAM4.

Las proteínas de fusión de anticuerpo y fragmentos del mismo de la presente invención pueden ser utilizadas en sistemas de orientación directa, donde la proteína de fusión de anticuerpo es conjugada con un agente terapéutico, un agente de diagnóstico-detección o una combinación de los mismos y administrada directamente a un paciente en necesidad de la misma.

Otra realización preferida de la presente invención es un anticuerpo multivalente y multiespecífico y fragmentos del mismo, que comprende más de un sitio de unión del antígeno que tiene afinidad hacia un epítomo de PAM4 diana y al menos un sitio de unión de hapteno que tiene afinidad hacia las moléculas de hapteno. Por ejemplo, una proteína de unión al anticuerpo PAM4 biespecífica puede comprender el MAB 679 (o fragmento del mismo) y el MAB PAM4 (o fragmento del mismo). El anticuerpo monoclonal 679 se une con una elevada afinidad a moléculas que contienen el resto tripéptido histamina succinil glicilo (HSG). Tal proteína de fusión de anticuerpo PAM4 biespecífica puede ser preparada, por ejemplo, mediante la obtención de un fragmento $F(ab')_2$ de 679, tal como se describe arriba. Los puentes disulfuro intercadenas del fragmento $F(ab')_2$ de 679 se reducen suavemente con la cistina, teniendo cuidado para evitar el acoplamiento de cadena ligera-pesada, para formar fragmentos Fab'-SH. El grupo o los grupos SH son activados con un exceso de enlazador de bis-maleimida (1,1'-(metilendi-4,1-fenil)bis-maleimida). El MAB PAM4 se convierte en Fab'-SH y luego se hace reaccionar con el fragmento MR23 Fab'-SH activado para obtener una proteína de fusión de anticuerpo PAM4 biespecífica. Las proteínas de fusión de anticuerpo biespecíficas como ésta pueden ser utilizadas en sistemas de mejora de la afinidad, donde el antígeno diana es pre-orientado con la proteína de fusión y es posteriormente orientado con un agente de diagnóstico o terapéutico que se une con el complejo antígeno-anticuerpo formado por preorientación.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser obtenidos por una diversidad de métodos convencionales, por ejemplo segmentación de disulfuro y reformado de mezclas de IgG entera o, preferiblemente fragmentos $F(ab')_2$, fusiones de más de un hibridoma para formar poliomas que producen anticuerpos que tienen más de una especificidad, y por ingeniería genética. Las proteínas de fusión de anticuerpo biespecífico han sido preparadas por segmentación oxidante de fragmentos Fab' resultantes de la segmentación reductora de diferentes anticuerpos. Esto se lleva a cabo ventajosamente mediante la mezcla de dos fragmentos $F(ab')_2$ diferentes por digestión con pepsina de dos

anticuerpos distintos, segmentación reductora para formar una mezcla de fragmentos Fab', seguido por reformado oxidante de los enlaces disulfuro para producir una mezcla de fragmentos F(ab')₂ que incluye proteínas de fusión de anticuerpo que contiene una porción Fab' específica para cada uno de los epítomos originales. Pueden encontrarse técnicas generales para la elaboración de proteínas de fusión de anticuerpo, por ejemplo, en Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 93: 470 (1961), Hämmerling et al., J. Exp. Med. 128: 1461 (1968), y la patente de EE. UU. n° 4.331.647. Se contempla en la presente invención una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo que comprende por lo menos un primer MAb PAM4 o fragmento del mismo y por lo menos un segundo MAb o fragmento del mismo, distintos de los MAbs PAM4 o fragmentos de los mismos de la presente invención.

Puede lograrse un enlace más selectivo mediante el uso de un enlazador heterobifuncional tal como éster de maleimidahidroxisuccinimida. La reacción del éster con un anticuerpo o fragmento derivatizará grupos amino en el anticuerpo o fragmento, y el derivado entonces puede hacerse reaccionar, por ejemplo, con fragmento Fab de anticuerpo que tiene al menos un grupo sulfhidrilo libres (o, un fragmento mayor o anticuerpo intacto con grupos sulfhidrilo añadidos al mismo, por ejemplo, por el reactivo de Traut). Es menos probable que tal enlazador entrecruce grupos en el mismo anticuerpo y mejora la selectividad del enlace.

Es ventajoso enlazar los anticuerpos o fragmentos en sitios alejados de los sitios de unión del antígeno. Esto puede lograrse, por ejemplo, por unión a grupos sulfhidrilo intercatenarios segmentados, como se indicó anteriormente. Otro método implica hacer reaccionar un anticuerpo que tiene una porción oxidada de hidratos de carbono con otro anticuerpo que tiene al menos una función amina libre. Esto tiene como resultado una unión con una base de Schiff (mime) inicial, que preferiblemente es estabilizada por reducción a una amina secundaria, por ejemplo, por reducción con borohidruro, para formar el compuesto final. Tales enlaces específicos del sitio se describen, para moléculas pequeñas, en la patente de EE. UU. n° 4.671.958, y para adiciones más grandes en la patente de EE. UU. n° 4.699.784.

Una proteína de fusión de anticuerpo PAM4 poliespecífico puede obtenerse mediante la adición de restos de unión de antígeno PAM4 a una proteína de fusión de anticuerpo PAM4 humanizado o humano biespecífico. Por ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo biespecífico puede hacerse reaccionar con 2-iminotiolano para introducir uno o más grupos sulfhidrilo para su uso en el acoplamiento de la proteína de fusión biespecífica a un tercer MAb PAM4 o fragmento, utilizando el procedimiento de activación con bis-maleimida descrito anteriormente. Estas técnicas para la producción de proteínas de fusión de anticuerpo son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 4.925.648.

ScFvs con enlazadores mayores de 12 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, enlazadores de 15 o 18 restos) permiten interaccionar entre los dominios V_H y V_L en la misma cadena y generalmente forman una mezcla de monómeros, dímeros (denominada diacuerpos) y pequeñas cantidades de multímeros de masa más alta (Kortt et al, Eur. J. Biochem. (1994) 221: 151-157). Los ScFvs con enlazadores de 5 o menos restos de aminoácidos, sin embargo, vetan el emparejamiento intramolecular de los dominios V_H y V_L en la misma cadena, forzando el emparejamiento con dominios V_H y V_L en una cadena diferente. Los enlazadores entre 3 y 12 restos forman predominantemente dímeros (Atwell et al., Protein Engineering (1999) 12: 597 a 604). Con enlazadores entre 0 y 2 restos, se forman estructuras oligoméricas trímeras (llamados triacuerpos), tetrámeras (llamadas tetracuerpos) o superiores de scFvs; sin embargo, los patrones exactos de oligomerización parecen depender de la composición, así como de la orientación de los dominios V, además de la longitud del enlazador. Por ejemplo, los scFvs del anticuerpo anti-neuraminidasa NC10 formaron de forma predominante trímeros (orientación V_H a V_L) o tetrámeros (orientación V_L a V_H) con enlazadores de 0-restos (Dolezal et al., Protein Engineering (2000) 13: 565-574). Para scFvs construidos a partir de NC10 con enlazadores de 1 y 2 restos, la orientación V_H a V_L formó predominantemente diacuerpos (Atwell et al., Protein Engineering (1999) 12: 597 a 604); en cambio, la orientación V_L a V_H formó una mezcla de tetrámeros, trímeros, dímeros y multímeros de masa más alta (Dolezal et al., Protein Engineering (2000) 13: 565 a 574). Para scFvs construidos a partir del anticuerpo anti-CD19 HD37 en la orientación V_H a V_L, el enlazador de 0 restos formó exclusivamente trímeros y el enlazador de 1 resto formó exclusivamente tetrámeros (Le Gall et al., FEBS Letters (1999) 453: 164-168).

Vectores de expresión y células hospedadoras.

Un vector de expresión es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula hospedadora. Típicamente, la expresión del gen se pone bajo el control de ciertos elementos reguladores, incluyendo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos del tejido y potenciadores. Se dice que tal gen está "operativamente ligado" a los elementos reguladores. Un promotor es una secuencia de ADN que dirige la transcripción de un gen estructural. Un gen estructural es una secuencia de ADN que se transcribe en el ARN mensajero (ARNm) que después es traducido en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico. Típicamente, un promotor se localiza en la región 5' de un gen, proximal al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En cambio, la tasa de transcripción no está regulada por un agente de inducción si el promotor es un promotor constitutivo. Un potenciador es un elemento regulador de ADN que puede aumentar la eficiencia de la transcripción, al margen de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

Una molécula de ADN aislada es un fragmento de ADN que no está integrado en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, un gen de antígeno PAM4 clonado es un fragmento de ADN que ha sido separado del ADN genómico de una célula de mamífero. Otro ejemplo de molécula de ADN aislado es una molécula de ADN sintetizado químicamente que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. ADN complementario (ADNc) es una molécula de ADN monocatenario que está formada a partir de una plantilla de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, un oligonucleótido sintético complementario a una porción del ARNm se emplea como cebador para la iniciación de la transcripción inversa para generar la primera hebra de ADN. Los expertos en la técnica utilizan también el término "ADNc" para referirse a una molécula de ADN bicatenario que consiste en tal molécula de ADN monocatenario y su cadena de ADN complementaria.

Un vector de clonación es una molécula de ADN, como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora. Los vectores de clonación contienen típicamente uno o unos cuantos sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción en donde pueden ser insertadas secuencias de ADN extrañas de una manera determinable sin perder una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para el uso en la identificación y selección transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina. Un hospedador recombinante puede ser cualquier célula procarionta o eucariota que contiene un vector de clonación o bien un vector de expresión. Este término también incluye aquellas células procariontas o eucariotas que han sido construidas genéticamente para que contengan el gen o los genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula hospedadora. El término expresión se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, expresión implica la transcripción del gen estructural a ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen células hospedadoras microbianas o de mamíferos. Un hospedador preferido es la línea de células humanas, PER.C6, que fue desarrollada para la producción de MAb y otras proteínas de fusión. En consecuencia, una realización preferida de la presente invención es una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN que codifica el MAb PAM4, conjugado, proteína de fusión o fragmentos de los mismos. Las células PER.C6 (documento WO 97/00326) fueron generadas por transfección de células de la retina embrionaria humana primarias, usando un plásmido que contenía las secuencias de codificación E1A y E1B del Ad serotipo 5 (Ad5) (Ad5 nucleótidos 459 a 3510) bajo el control del promotor humano de fosfoglicerato quinasa (PGK). E1A y E1B son proteína 1A y 1B, respectivamente, de activación del gen temprano de adenovirus. Los métodos y composiciones son particularmente útiles para generar la expresión estable de proteínas recombinantes humanas de interés que son modificadas de forma postraducciona, p. ej. por glicosilación. Varias características hacen a PER.C6 particularmente útil como hospedador para la producción de proteínas recombinantes, tal como PER. C6 es una línea de células humanas totalmente caracterizada y fue desarrollada cumpliendo las buenas prácticas de laboratorio. Además, PER.C6 puede desarrollarse como un cultivo de suspensión en medio libre de suero definido desprovisto de cualquier proteína derivada de un origen humano o animal, y su crecimiento es compatible con los frascos rotatorios, frascos removidos, frascos centrifugados y biorreactores con un tiempo de duplicación de aproximadamente 35 horas. Finalmente, la presencia de E1A produce una regulación por exceso de la expresión de genes que están bajo el control del potenciador/promotor de CMV y la presencia de E13 previene la apoptosis dependiente de p53 posiblemente potenciada mediante la sobreexpresión del transgén recombinante. En una realización, la célula es capaz de producir de 2 a 200 veces más proteína recombinante y/o sustancia proteica que las líneas de células de mamífero convencionales.

Uso de anticuerpos PAM4 humanizado y humano para tratamiento y diagnóstico.

Como se define en las realizaciones, un método de diagnóstico o tratamiento de un tumor maligno en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado terapéutico que comprende un MAb PAM4 o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el MAb PAM4 o fragmento del mismo o la proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo está unido a por lo menos un agente de diagnóstico y/o terapéutico, y después es formulado en un excipiente farmacéuticamente adecuado. También se prefiere un método para diagnosticar o tratar el cáncer, que comprende: administrar un anticuerpo multivalente y multiespecífico o fragmento del mismo que comprende uno o más sitios de unión del antígeno hacia un antígeno PAM4 y uno o más sitios de unión de hapteno a un sujeto en necesidad de ello, esperar un tiempo suficiente para que una cantidad del no anticuerpo se elimine del torrente circulatorio del sujeto; y luego administrar al sujeto una molécula portadora que comprende un agente de diagnóstico-detección, un agente terapéutico o una combinación de los mismos, que se une con el sitio de unión del anticuerpo multivalente multiespecífico o fragmento del mismo. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de páncreas. En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo mono-específico multivalente, o fragmento del mismo.

El uso de MAb para diagnóstico *in vitro* es bien conocido. Véase, por ejemplo, Carlsson et al., Bio/Technology 7 (6): 567 (1989). Por ejemplo, pueden utilizarse MAb para detectar la presencia de un antígeno asociado a un tumor en el tejido muestras de biopsia. Los MAb también pueden ser utilizados para medir la cantidad de antígeno asociado a tumor en las muestras clínicas de líquido usando técnicas tales como radioinmunoensayo, ensayo inmunosorbente ligado a una enzima e inmunoensayo de fluorescencia.

Pueden usarse conjugados de MAb's orientados al tumor y toxinas para destruir selectivamente las células cancerosas *in vivo* (Spalding, *Bio/Tecnology* 9 (8): 701 (1991); Goldenberg, *Scientific American Science & Medicine* 1: 64 (1994)). Por ejemplo, estudios terapéuticos en modelos animales experimentales han demostrado la actividad antitumoral de anticuerpos que portan radionucleidos citotóxicos. Véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 5 para una discusión de modelos animales y estudios terapéuticos (Goldenberg et al., *Cancer Res.* 41: 4354 (1981), Cheung et al., *J. Nat'l Cancer Inst.* 77: 739 (1986) y Senekowitsch et al., *J. Nucl. Med.* 30: 531 (1989)).

Los anticuerpos humanizados y completamente humanos y fragmentos de los mismos son adecuados para uso en métodos terapéuticos y en métodos de diagnóstico. En consecuencia, se contempla en la presente invención un método de suministro a una diana de un agente de diagnóstico o terapéutico o una combinación de los mismos, que comprende (i) proporcionar una composición que comprende un anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo conjugado con al menos un agente de diagnóstico y/o terapéutico y (ii) administrar a un sujeto en necesidad del mismo el conjugado de anticuerpo de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos son humanizados. En otra realización, los anticuerpos PAM4 humanizados y fragmentos de la presente invención son utilizados en métodos para el tratamiento de tumores malignos.

También se describe el presente texto un conjugado de diagnóstico o terapéutico dirigido a las células de cáncer, que comprende un componente de anticuerpo que comprende un MAb PAM4 o fragmento del mismo de cualquiera de los anticuerpos de la presente invención, o una proteína de fusión de anticuerpo o fragmento del mismo, en donde el componente del anticuerpo está unido a al menos un agente de diagnóstico o al menos un agente terapéutico. Preferiblemente, el conjugado de diagnóstico es un agente fotoactivo de diagnóstico-detección, un agente detectable por ultrasonidos o un agente de contraste para MRI. También se prefiere que el agente de diagnóstico-detección sea un radionucleido con una energía entre 20 y 4.000 keV.

Como se define en las reivindicaciones, un método para diagnóstico o tratamiento de un tumor maligno comprende administrar una cantidad eficaz para diagnóstico o terapéuticamente de al menos un anticuerpo PAM4 desnudo o fragmento del mismo y/o proteína de fusión PAM4 o fragmento del mismo y opcionalmente formulando el anticuerpo PAM4, la proteína de fusión, o fragmentos del mismo en un excipiente farmacéutico.

Las composiciones para tratamiento contienen al menos un anticuerpo PAM4 humanizado o completamente humano o fragmento del mismo, bien sea solo y sin conjugar, o conjugado o no conjugado y en combinación con otros anticuerpos o fragmentos de los mismos, como otros anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos humanos, agentes terapéuticos o inmunomoduladores. También pueden combinarse anticuerpos desnudos o conjugados contra el mismo o distinto epítipo o antígeno con uno o más de los anticuerpos PAM4 o fragmentos de los mismos de la presente invención.

En consecuencia, la presente invención como se define en las reivindicaciones contempla la administración de anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos, incluyendo proteínas de fusión con PAM4 y fragmentos de los mismos, solos, como un anticuerpo desnudo o fragmento de anticuerpo, o administrado como terapia multimodal. El anticuerpo es un anticuerpo PAM4 humanizado o un fragmento del mismo. Las terapias multimodales de la presente invención incluyen además la inmunoterapia con un anticuerpo PAM4 desnudo suplementado con la administración de otros anticuerpos en forma de anticuerpos desnudos, proteínas de fusión, o como inmunoconjugados. Por ejemplo, un anticuerpo PAM4 humanizado puede combinarse con otro PAM4 humanizado desnudo u otro anticuerpo o un PAM4 humanizado, u otro anticuerpo conjugado con un isótopo, uno o más agentes quimioterapéuticos, citocinas, toxinas o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la presente invención contempla el tratamiento de un anticuerpo PAM4 desnudo o conjugado o fragmentos del mismo antes, en combinación con, o después de otros anticuerpos asociados con el tumor de páncreas, tales como CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, 1a3, anticuerpos aLe^a y otros antígenos de Lewis (p. ej., Le(y)), al igual que anticuerpos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno-p específico del colon (CSAp), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, HER2/neu, EGFR, factores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y IL-6, así como productos de oncogenes y anticuerpos contra sustancias de necrosis tumoral. Estos anticuerpos de tumores sólidos pueden ser desnudos o conjugados, entre otros, con fármacos, toxinas, isótopos, radiación externa o inmunomoduladores. Una proteína de fusión de un anticuerpo PAM4 humanizado o completamente humano y una toxina, también puede ser utilizada en esta invención. Pueden ser construidas muchas combinaciones diferentes de anticuerpos, bien sea como anticuerpos desnudos o bien como parcialmente desnudos y parcialmente conjugados con un agente terapéutico o inmunomodulador. Alternativamente, pueden emplearse diferentes combinaciones de anticuerpos desnudos para su administración en combinación con otros agentes terapéuticos, tal como un fármaco citotóxico o con radiación, administrados consecutivamente, simultáneamente o secuencialmente.

Los anticuerpos monoespecíficos descritos en el presente texto que se unen directamente a agentes de diagnóstico o terapéuticos se dirigen directamente a tumores PAM4 positivos. Las moléculas monoespecíficas se unen selectivamente a los antígenos específicos y, a medida que aumenta el número de sitios de unión de la molécula, aumenta la afinidad para la célula diana y se observa un tiempo de residencia más largo en la localización deseada. Además, las moléculas no unidas a antígeno son eliminadas (aclaramas) del organismo rápidamente y se minimiza la exposición de tejidos normales. Un uso de anticuerpos multiespecíficos es en sistemas AES, donde PAM4 pre-orienta tumores positivos para el subsiguiente suministro específico de agentes diagnósticos o terapéuticos. Los

agentes son portados por péptidos que contienen histamina succinil glicilo (HSG). El anticuerpo monoclonal murino designado 679 (una IgG1, K) se une con alta afinidad a moléculas que contienen el resto de tri-péptido, HSG (Morel et al., Molecular Immunology, 27, 995 a 1000, 1990). El MAb 679 puede formar un anticuerpo biespecífico con hPAM4 que se une con HSG y el antígeno diana. También pueden utilizarse haptenos alternativos. Estos anticuerpos se unen selectivamente a antígenos orientados permitiendo una mayor afinidad y un tiempo de residencia más largo en la localización deseada. Además, los anticuerpos no unidos a antígeno son eliminados del organismo rápidamente y se minimiza la exposición de tejidos normales. Los anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos y conjugados pueden utilizarse para diagnosticar y tratar trastornos de los mamíferos, tales como el cáncer.

El suministro de un agente de diagnóstico o terapéutico a una diana para diagnóstico o tratamiento según la presente invención incluye proporcionar al anticuerpo PAM4 o fragmentos del mismo un agente de diagnóstico o terapéutico y administrarlo a un sujeto en necesidad del mismo con el anticuerpo. El diagnóstico requiere además la etapa de detectar las proteínas unidas con técnicas conocidas.

En el contexto de esta solicitud, los términos "diagnóstico" o "detección" pueden utilizarse indistintamente. Aunque el diagnóstico se refiere generalmente a la definición de estado histológico específico de un tejido, la detección reconoce y localiza un tejido, lesión u organismo que contiene un antígeno particular.

La administración de los anticuerpos y sus fragmentos de la presente invención con agentes diagnósticos o terapéuticos puede ser efectuada en un mamífero mediante inyección intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurar, intratecal, perfusión a través de un catéter regional o inyección intralesional directa. Cuando se administra el anticuerpo mediante inyección, la administración puede ser por infusión continua o mediante uno o varios bolos.

El anticuerpo con el agente de diagnóstico o terapéutico puede ser proporcionado en forma de kit para uso terapéutico o diagnóstico humano o en mamíferos en un vehículo para inyección farmacéuticamente aceptable, preferiblemente solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH y concentración fisiológicos. Preferiblemente el preparado será estéril, especialmente si está destinado para su uso en seres humanos. Los componentes opcionales de tales kits incluyen estabilizadores, tampones, reactivos de marcaje, radioisótopos, compuestos paramagnéticos, segundo anticuerpo para aclaramiento potenciado, y jeringas, columnas, viales y similares convencionales.

Terapia de anticuerpo desnudo.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo PAM4 desnudo humanizado y totalmente humano, o fragmentos del mismo, o proteínas de fusión de PAM4 o fragmentos del mismo, puede ser formulada en un excipiente farmacéuticamente aceptable. La eficacia de los anticuerpos PAM4 desnudos humanizados y plenamente humanos y sus fragmentos puede ser también potenciada suplementando estos anticuerpos desnudos con uno o más de otros anticuerpos desnudos, con uno o más inmunoconjugados de anticuerpos PAM4 humanizados y completamente humanos, conjugados con uno o más agentes terapéuticos, incluyendo fármacos, toxinas, inmunomoduladores, hormonas, oligonucleótidos, antagonistas de hormonas, enzimas, inhibidores de enzimas, radionucleidos terapéuticos, un inhibidor de la angiogénesis, etc., administrados simultáneamente o secuencialmente o de acuerdo con un régimen de dosificación prescrito, con los anticuerpos PAM4 o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos desnudos que pueden suplementar los anticuerpos PAM4 desnudos y fragmentos de los mismos pueden ser dirigidos contra el mismo tipo de tumor o bien contra las células inmunomoduladoras (por ejemplo, células CD40⁺) que pueden ser reclutadas para mejorar los efectos antitumorales de los anticuerpos desnudos de elección.

Inmunoconjugados de PAM4.

La presente invención contempla también el uso de anticuerpos PAM4 humanizados y fragmentos de los mismos conjugados con al menos un agente terapéutico y/o de diagnóstico-detección para la terapia o el diagnóstico. Para la inmunoterapia, el objetivo es suministrar dosis citotóxicas de radioactividad, toxina o fármaco a las células diana, minimizando al mismo tiempo la exposición a tejidos no diana. Los anticuerpos PAM4 de la presente invención pueden utilizarse para diagnosticar y tratar los tumores de páncreas.

Cualquiera de los anticuerpos, proteínas de fusión de anticuerpo y fragmentos de la presente invención puede ser conjugado con uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico-detección. Generalmente, un agente terapéutico o de diagnóstico-detección está unido a cada anticuerpo, proteína de fusión o fragmento del mismo pero más de un agente terapéutico y/o agente de diagnóstico-detección puede unirse al mismo anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Si la región Fc está ausente (por ejemplo cuando el anticuerpo usado como componente de anticuerpo del inmunoconjugado es un fragmento de anticuerpo), es posible introducir un resto carbohidrato en la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); Hansen et al., patente de EE. UU. n° 5.443.953 (1995), Leung et al., patente de EE. UU. n° 6.254.868. El resto carbohidrato construido se utiliza para fijar el agente terapéutico o de diagnóstico-detección.

Los métodos para conjugar péptidos con componentes de anticuerpos mediante un carbohidrato del anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46: 1101(1990); y Shih et al., patente de EE. UU. nº 5.057.313. El método general implica hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidado con un polímero portador que tiene al menos una función amina libre y que está cargado con una diversidad de péptidos. Esta reacción da lugar a un enlace de base de Schiff inicial (imina), que puede ser estabilizado por la reducción para dar una amina secundaria para formar el conjugado final.

Las proteínas de fusión de anticuerpo y fragmentos del mismo de la presente invención comprenden dos o más anticuerpos o fragmentos de los mismos y cada uno de los anticuerpos que componen esta proteína de fusión puede contener al menos un agente terapéutico y/o un agente de diagnóstico-detección. Por ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo puede comprender un anticuerpo (dos sitios de unión de antígeno) y un fragmento de anticuerpo, dos fragmentos de anticuerpo o dos anticuerpos. La proteína de fusión de anticuerpo puede después ser conjugada con al menos un agente de diagnóstico-detección y/o terapéutico.

En consecuencia, uno o más de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la proteína de fusión de anticuerpo pueden tener unido más de un agente terapéutico o de diagnóstico-detección. Además, los agentes terapéuticos no necesitan ser iguales, sino que pueden ser agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, se puede agregar un fármaco y un radioisótopo a la misma proteína de fusión. En particular, una IgG puede ser radiomarcada con ¹³¹I y agregada a un fármaco. El ¹³¹I puede ser incorporado en la tirosina de la IgG y el fármaco agregado al grupo amino epsilon de las lisinas de la IgG. Ambos agentes terapéuticos y de diagnóstico-detección también pueden agregarse a grupos SH reducidos y a las cadenas laterales de hidratos de carbono.

Una amplia diversidad de reactivos diagnósticos y terapéuticos puede ser administrada simultáneamente o secuencialmente, o ventajosamente conjugada con los anticuerpos de la invención, por ejemplo, fármacos, toxinas, oligonucleótidos, inmunomoduladores, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, inhibidores de enzima, radionucleidos terapéuticos, un inhibidor de la angiogénesis, etc. Los agentes terapéuticos citados aquí son aquellos agentes que también son útiles para la administración por separado con el anticuerpo desnudo como se describió anteriormente. Los agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como alcaloides de la vinca, antraciclinas, gemcitabina, epidofilotoxinas, taxanos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, SN-38, inhibidores de COX-2, antimetabólicos, antiangiogénicos y apoptóticos, en particular doxorubicina, metotrexato, taxol, CPT-11, camptotecanos y otros de estas y otras clases de agentes anticancerosos y similares. Otros fármacos quimioterapéuticos para el cáncer útiles para administrar simultáneamente o secuencialmente, o para la preparación de inmunoconjugados y proteínas de fusión de anticuerpo, incluyen mostazas nitrogenadas, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos del ácido fólico, inhibidores de COX-2, análogos de la pirimidina, análogos de la purina, complejos de coordinación de platino, hormonas y similares. Agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co. 1995) y en Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7ª Ed. (Mac-Millan Publishing Co. 1985), así como en ediciones revisadas de estas publicaciones. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como fármacos experimentales, son conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, los anticuerpos PAM4 humanizado y fragmentos de los mismos de la presente invención están conjugados con gemcitabina. En otra realización, la gemcitabina se da antes, después o al mismo tiempo que un anticuerpo PAM4 humanizado desnudo o conjugado o fragmento del mismo de la presente invención. Preferiblemente, el anticuerpo PAM4 humanizado conjugado o fragmento de anticuerpo es conjugado con un radionucleido.

Una toxina puede ser de origen animal, vegetal o microbiano. Una toxina, tal como la exotoxina de *Pseudomonas*, puede también ser complejada con, o formar la porción de agente terapéutico de, un inmunoconjugado de los anticuerpos PAM4 y hPAM4 de la presente invención. Otras toxinas empleadas adecuadamente en la preparación de tales conjugados u otras proteínas de fusión, incluyen ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmesí, gelonina, toxina differina, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47: 641 (1986), y Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44: 43 (1994). Otras toxinas adecuadas para su uso en la presente invención son conocidas por los expertos en la técnica y se describen en la patente de EE. UU. nº 6.077.499.

Un inmunomodulador, como una citocina, puede ser también conjugado con, o formar la porción de agente terapéutico del inmunoconjugado de PAM4 y hPAM4 o puede ser administrado con, pero no conjugado con él, el anticuerpo PAM4 humanizado o humano o fragmento del mismo, o la proteína de fusión PAM4 o fragmento del mismo de la presente invención. La proteína de fusión de PAM4 o fragmento del mismo puede componerse de uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a diferentes antígenos. Por ejemplo, la proteína de fusión puede unirse al antígeno PAM4 así como a factores o células inmunomoduladoras. Alternativamente, los sujetos pueden recibir un anticuerpo PAM4 desnudo, la proteína de fusión, o fragmento del mismo y una citocina administrada por separado, que puede ser administrada antes, al mismo tiempo o después de la administración de los anticuerpos PAM4 desnudos. Como se utiliza el presente texto, el término "inmunomodulador" incluye las citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, tales como factor de necrosis tumoral (TNF) y factores hematopoyéticos, tales como las interleucinas (por ejemplo, Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12

y IL-18, IL-21), factores estimuladores de colonias (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)), interferones (p. ej. interferones α , β y γ , el factor de crecimiento de células madre designado "factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina. Los ejemplos de restos de inmunomodulador adecuados incluyen IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, interferón- γ , TNF- α y similares.

Alternativamente, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención pueden ser marcados de forma detectable enlazando el anticuerpo a una enzima. Cuando el conjugado de anticuerpo-enzima se incubaba en presencia del sustrato apropiado, el resto de enzima reacciona con el sustrato para producir un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, visuales o fluorométricos. Los ejemplos de enzimas que se pueden utilizar para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

Un agente terapéutico o de diagnóstico-detección puede ser añadido en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido por medio de la formación de enlaces disulfuro. Como alternativa, estos agentes pueden añadirse al componente de anticuerpo mediante un reticulante heterobifuncional, tal como *N*-succinil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer 56: 244(1994). Las técnicas generales para tal conjugación son bien conocidas en este campo. Véanse, por ejemplo, Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications", Birch et al. (eds.), páginas 187 a 230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), páginas 60 a 84 (Cambridge University Press 1995). Alternativamente, el agente terapéutico o de diagnóstico-detección puede ser conjugado mediante un resto de carbohidrato en la región Fc del anticuerpo. El grupo carbohidrato puede utilizarse para aumentar la carga del mismo agente que está unido a un grupo tiol, o el resto de carbohidrato puede ser usado para unir un péptido diferente.

En los métodos de la invención, la construcción orientable puede comprender uno o más isótopos radiactivos útiles para detectar el tejido enfermo. Los radionucleidos terapéuticos particularmente útiles incluyen, pero no se limitan a ellos, ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{154}Gd , ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr y otros emisores de radiaciones gamma, beta o de positrones, preferiblemente con una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 4.000 keV, más preferiblemente en el intervalo de 25 a 4.000 keV, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 25 a 1.000 keV y aún más preferiblemente en el intervalo de 70 a 700 keV. Las energías de desintegración totales de los radionucleidos emisores de positrones útiles son preferiblemente < 2.000 keV, más preferiblemente inferiores 1.000keV y lo más preferiblemente < 700 keV. Los radionucleidos útiles como agentes de diagnóstico-detección utilizando la detección de rayos gamma incluyen, pero no se limitan a ellos: ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{75}Se , ^{97}Ru , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{169}Yb , ^{197}Hg y ^{201}Tl . Las energías de desintegración de radionucleidos emisores de rayos gamma útiles son preferiblemente 20 a 2000 keV, más preferiblemente 60 a 600 keV y lo más preferiblemente 100 a 300 keV.

En los métodos de la invención, la construcción orientable puede comprender uno o más isótopos radiactivos útiles para tratar el tejido enfermo. Entre los radionucleidos terapéuticos particularmente útiles se incluyen, pero sin limitarse a ellos, ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au y ^{211}Pb . El radionucleido terapéutico tiene preferiblemente una energía de desintegración en el intervalo de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100 a 2.500 keV para un emisor beta y 4.000 a 6.000 keV para un emisor alfa. Las energías de desintegración máximas de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente 20 a 5.000 keV, más preferiblemente 100 a 4.000 y lo más preferiblemente 500 a 2.500 keV. También se prefieren los radionucleidos que se desintegran sustancialmente con partículas emisoras de electrones Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m y Ir-192. Las energías de desintegración de nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente < 1.000 keV, más preferiblemente < 100 keV y lo más preferiblemente < 70 keV. También se prefieren los radionucleidos que se desintegran sustancialmente con generación de partículas alfa. Estos radionucleidos incluyen, pero sin limitarse a ellos: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 y Fm-255. Las energías de desintegración de radionucleidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente 2.000 a 10.000, más preferiblemente 3.000 a 8.000 keV y lo más preferentemente 4.000 a 7.000 keV.

Por ejemplo, el ^{67}Cu , considerado uno de los radioisótopos más prometedores para radioinmunoterapia debido a su vida mitad de 61,5 horas y abundante suministro de partículas beta y rayos gamma, puede ser conjugado con un anticuerpo PAM4 usando el agente quelante ácido p-bromoacetamido-bencil-tetraetilaminatetraacético (TETA). Chase, *supra*. Alternativamente, el ^{90}Y , que emite una partícula beta energética, puede acoplarse a un anticuerpo PAM4, proteína de fusión o fragmento, utilizando ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA).

Entre los radioisótopos potenciales adicionales se incluyen ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , y similares.

5 En otra realización, puede usarse un radiosensibilizador en combinación con un anticuerpo PAM4 desnudo o conjugado o fragmento de anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, el radiosensibilizador puede usarse en combinación con un anticuerpo PAM4 marcado o fragmento de anticuerpo. La adición del radiosensibilizador puede producir una mayor eficacia en comparación con el tratamiento con el anticuerpo radiomarcado o fragmento de anticuerpo solos. Los radiosensibilizadores se describen en D.M. Goldenberg (ed.), *Cancer Therapie with Radiolabeled Antibodies*, CRC Press (1995).

10 El anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo, o la proteína de fusión de PAM4 o fragmento del mismo de la presente invención que tiene un portador cargado con sumando de boro para terapia de activación de neutrones térmicos será normalmente efectuado de manera similar. Sin embargo, será ventajoso esperar hasta que el inmunocombinado PAM4 no orientado sea aclarado o eliminado antes de que se haya realizado la irradiación con neutrones. El aclaramiento puede acelerarse usando un anticuerpo que se une al anticuerpo PAM4. Véase la patente de EE. UU. n° 4.624.846 para obtener una descripción de este principio general. Por ejemplo, sumandos de boro tales como los carboranos, pueden ser fijados a anticuerpos PAM4. Pueden prepararse carboranos con funciones carboxilo en cadenas laterales colgantes, como es bien sabido en la técnica. La fijación de los carboranos a un portador, tal como aminodextrano, puede lograrse mediante la activación de los grupos carboxilo de los carboranos y la condensación con aminas en el portador. El conjugado intermedio se conjuga después con el anticuerpo PAM4. Después de la administración del conjugado de anticuerpo PAM4, se activa un sumando de boro mediante la irradiación por neutrones térmicos y se convierte en átomos radioactivos que se desintegran mediante emisión α para producir efectos altamente tóxicos, de corto alcance.

Además, la presente invención incluye métodos de diagnóstico de cáncer en un sujeto. El diagnóstico puede realizarse mediante la administración de una cantidad efectiva para diagnóstico de un conjugado de diagnóstico, formulado en un excipiente y la detección de dicho marcador. Los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos pueden conjugarse con el agente de diagnóstico-detección o administrarse sin conjugar al agente de diagnóstico-detección, pero antes, al mismo tiempo o después de la administración del agente de diagnóstico-detección. Los agentes radiactivos que pueden ser usados como agentes de diagnóstico-detección se discutieron anteriormente. Un agente de diagnóstico-detección no radiactivo adecuado es un agente de contraste adecuado para resonancia magnética, rayos X, tomografía computerizada o ultrasonidos. Los agentes para formación magnética de imágenes incluyen, por ejemplo, metales no radiactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, complejados con combinaciones de metal-quelato que incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos monometilo y ciclohexilo, cuando se usa junto con el anticuerpo de la invención. Véase el documento U.S. Serial No. 09/921.290 presentado el 10 de octubre de 2001.

35 Los agentes de contraste, tales como los agentes de contraste para MRI, contemplados en la presente invención incluyen, por ejemplo, iones de gadolinio, iones de lantano, iones de disprosio, iones de hierro, iones de manganeso u otro marcador comparable, agentes de contraste de CT, y agentes de contraste de ultrasonidos son adecuados para ser usados en la presente invención.

40 Los iones paramagnéticos adecuados para la presente invención incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), siendo particularmente preferido el gadolinio.

Los iones útiles en otros contextos, tales como la obtención de imágenes por rayos X, incluyen, pero sin limitarse a ellos, lantano (III), oro (III), plomo (II) y especialmente bismuto (III). Los marcadores fluorescentes incluyen rodamina, fluoresceína y renografina. La rodamina y la fluoresceína están frecuentemente unidos mediante un intermedio de isotiocianato.

45 Los metales también son útiles en agentes de diagnóstico-detección, incluyendo aquellos que se usan para las técnicas de resonancia magnética. Estos metales incluyen, pero sin limitarse a ellos: gadolinio, manganeso, hierro, cromo, cobre, cobalto, níquel, disprosio, renio, europio, terbio, holmio y neodimio. Para cargar un componente de anticuerpos con metales radioactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tiene una larga cola a la que se fijan múltiples grupos quelantes para la unión de los iones. Tal cola puede ser un polímero tal como polilisina, polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tiene grupos colgantes a los que pueden unirse grupos quelantes tales como, p. ej., ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido dietilentiainopentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se sabe que son útiles para este propósito. Los quelatos son acoplados al anticuerpo PAM4, proteína de fusión o fragmentos de éstos usando procesos químicos estándar. El quelato es normalmente enlazado al anticuerpo mediante un grupo que permite la formación de un enlace a la molécula con una pérdida mínima de inmunoreactividad, mínima agregación y/o reticulación interna. Otros métodos y reactivos más inusuales para conjugar quelatos a anticuerpos se describen en la patente de EE. UU. n° 4.824.659 de Hawthorne, que lleva por título "Antibody Conjugates", expedida el 25 de abril de 1989. Las combinaciones metal-quelato particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico en el

intervalo de energía general de 20 a 2.000 keV. Los mismos quelatos, cuando se complejan con metales no radiactivos tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para MRI, cuando se usan junto con los anticuerpos de la presente invención. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se usan con una diversidad de metales y radiometales, lo más particularmente con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Tales complejos de metal-quelato pueden hacerse muy estables ajustando a medida el tamaño del anillo para el metal que interesa. Otros quelatos de tipo anillo como los poliéteres macrocíclicos, que son interesantes para unir nucleidos establemente, tales como ²²³Ra para RAIT, están comprendidos en la invención.

Los materiales radiopacos y de contraste se utilizan para potenciar los rayos X y la tomografía computerizada, e incluyen compuestos de yodo, compuestos de bario, compuestos de galio, compuestos de talio, etc. Los compuestos específicos incluyen bario, diatrizoato, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida, iohexol, iopamidol, ácido iopanoico, ácido ioprocémico, ácido iosefámico, ácido iosérico, iosulamida, meglumina, ácido iosemético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxáglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro de talio.

Los anticuerpos, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden también ser marcados con compuestos fluorescentes. La presencia de un MAb marcado fluorescentemente se determina exponiendo el anticuerpo a una luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos marcados fluorescentemente incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Los anticuerpos marcados fluorescentemente son particularmente útiles para el análisis de citometría de flujo.

Alternativamente, los anticuerpos, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos de esta invención pueden ser marcados detectablemente acoplando el anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del MAb etiquetado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de la quimioluminiscencia que surge en el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de anacridinio y un éster oxalato.

Del mismo modo, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar los anticuerpos y fragmentos de éstos de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcaje incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

En consecuencia, como se define en las reivindicaciones, se describe un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende realizar un ensayo de diagnóstico in vitro en una muestra de un sujeto (fluidos, tejidos o células) con una composición que comprende un MAb PAM4 desnudo o fragmento del mismo o una proteína de fusión de anticuerpo desnudo o fragmento del mismo. Puede usarse la inmunohistoquímica para detectar la presencia de PAM4 en una célula o tejido. Preferiblemente, el tumor maligno que se está diagnosticando es un cáncer. Más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de páncreas.

Además, puede ser conjugado un quelante como DTPA, DOTA, TETA o NOTA, o un péptido adecuado, al cual puede conjugarse un marcador detectable, tal como una molécula fluorescente, o un agente citotóxico tal como un metal pesado o un radionucleido. Por ejemplo, puede obtenerse un inmunoconjugado terapéuticamente útil conjugando un agente o colorante fotoactivo con una proteína de fusión de anticuerpo. Composiciones fluorescentes, tales como fluorocromo, y otros cromógenos o colorantes, tales como porfirinas sensibles a la luz visible, se han usado para detectar y tratar las lesiones dirigiendo la luz adecuada a la lesión. En terapia, esto se ha denominado fotorradiación, fototerapia o terapia fotodinámica (Jori et al (eds.), *Photodynamic therapy of Tumors and other Diseases* (Libreria Progetto 1985), van den Bergh, *Chem. Britain* 22: 430 (1986)). Además, los anticuerpos monoclonales han sido acoplados con colorantes fotoactivados para lograr la fototerapia. Mew et al., *J. Immunol.* 130:1473 (1983); *idem.*, *Cancer Res.* 45: 4380 (1985); Oseroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8744 (1986); *idem.*, *Photochem. Photobiol.* 46: 83 (1987); Hasan et al., *Prog. Clin. Biol. Res.* 288: 471 (1989); Tatsuta et al., *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989); Pelegrin et al., *Cancer* 67: 2529 (1991). Sin embargo, estos estudios anteriores no incluyen el uso de aplicaciones de terapia endoscópica, especialmente con el uso de fragmentos o subfragmentos de anticuerpos. Así pues, la presente invención contempla el uso terapéutico de inmunoconjugados que comprenden agentes fotoactivos o colorantes.

Con fines terapéuticos, los anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos de la presente invención son administrados a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se dice que un anticuerpo es administrado en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia tiene como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

Un agente de diagnóstico-detección es una molécula o átomo, que se puede administrar conjugada con un resto de anticuerpo, es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o subfragmento, proteína de fusión y sus fragmentos, y es útil en el diagnóstico-detección de una enfermedad localizando las células que contienen el antígeno asociado a

la enfermedad. Los agentes de diagnóstico-detección útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, radioisótopos, colorantes (como con el complejo biotina-estreptavidina), materiales radiopacos (por ejemplo, compuestos de bario, yodo, galio y talio y similares), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (por ejemplo, los iones paramagnéticos) para formación de imágenes de resonancia magnética (MRI). La patente de EE. UU. n° 6.331.175 describe la técnica de MRI y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente de potenciación de MRI. Preferiblemente, los agentes de diagnóstico-detección se eligen entre el grupo que consiste en radioisótopos para formación de imágenes nucleares, detección endoscópica e intravascular, agentes potenciadores para uso en imágenes de resonancia magnética o en ultrasonografía, agentes radiopacos y de contraste para rayos X y tomografía computerizada, y compuestos fluorescentes para fluoroscopia, incluyendo fluoroscopia endoscópica. Los agentes fluorescentes y radiactivos conjugados con anticuerpos o usados en métodos de pre-orientación biespecíficos, son particularmente útiles para detección endoscópica, intraoperatoria o intravascular de los tejidos diana asociados con tejidos enfermos o racimos de células, tales como tumores malignos, como se describe en Goldenberg, patente de EE. UU. n° 5.716.595 y 6.096.289 y el documento de solicitud U.S. Application Serial n° 09/348.818, en particular con emisores gamma, beta y de positrones. Pueden utilizarse aplicaciones endoscópicas cuando se extiende a una estructura que permite un endoscopio, tal como el colon. Los radionucleidos útiles para tomografía de emisión de positrones incluyen, pero sin limitarse a ellos: F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, I-110, I-120 de I-124. Las energías de desintegración total de los radionucleidos emisores de positrones útiles son preferiblemente < 2.000 keV, más preferiblemente inferiores a 1.000 keV y lo más preferiblemente < 700 keV. Los radionucleidos útiles como agentes de diagnóstico-detección que utilizan detección de rayos gamma incluyen, pero sin limitarse a ellos: Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197 y Tl-201. Las energías de desintegración de radionucleidos emisores de rayos gamma útiles son preferiblemente 20 a 2000 keV, más preferiblemente 60 a 600 keV, y lo más preferiblemente 100 a 300 keV.

Diagnóstico *In Vitro*.

La presente invención contempla el uso de anticuerpos PAM4, incluyendo proteínas de fusión de PAM4 y fragmentos de los mismos, para cribar muestras biológicas *in vitro* con el fin de detectar la presencia del antígeno PAM4. En tales inmunoensayos, el anticuerpo PAM4, la proteína de fusión o fragmento del mismo pueden utilizarse en la fase líquida o unidos a un portador en fase sólida, como se describe más adelante. El anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo es humanizado. La proteína de fusión de PAM4 se compone de un anticuerpo PAM4 humanizado.

Un ejemplo de un método de cribado para determinar si una muestra biológica contiene el antígeno de PAM4 es el radioinmunoensayo (RIA). Por ejemplo, en una forma de RIA, la sustancia sometida al ensayo se mezcla con antígeno PAM4 MAb en presencia de antígeno PAM4 radiomarcado. En este método, la concentración de la sustancia de ensayo será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno PAM4 radiomarcado unido al MAb y se relaciona directamente con la cantidad de antígeno PAM4 marcado libre. Otros métodos de detección adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica.

Alternativamente, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* en los cuales un anticuerpo PAM4, proteína de fusión o fragmento del mismo se une a un portador en fase sólida. Por ejemplo, pueden fijarse MAbs a un polímero, tal como aminodextrano, con el fin de unir el MAb a un soporte insoluble tal como una esfera recubierta de polímero, una placa o un tubo.

Otros ensayos *in vitro* adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. La concentraciones específicas de anticuerpo PAM4 marcado detectablemente y de antígeno PAM4, la temperatura y el tiempo de incubación, así como otras condiciones del ensayo, pueden variar dependiendo de varios factores entre los que se incluyen la concentración del antígeno PAM4 en la muestra, la naturaleza de la muestra y similares. La actividad de unión de una muestra de anticuerpo PAM4 puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán establecer las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación, empleando experimentación rutinaria.

Otros pasos tales como lavado, agitación, filtración y similares pueden añadirse a los ensayos habituales necesarios para la situación en particular.

La presencia del antígeno PAM4 en una muestra biológica puede ser determinada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a un enzima (ELISA). En el ELISA competitivo directo, un preparado del antígeno puro o semipuro se une a un soporte sólido que es insoluble en el extracto fluido o celular que se está ensayando y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado detectablemente para permitir la detección y/o cuantificación del complejo binario formado entre el antígeno de la fase sólida y el anticuerpo marcado.

En cambio, un ELISA "de doble determinante", también conocido como "ELISA de dos sitios" o "ensayo sandwich", requiere pequeñas cantidades de antígeno y el ensayo no requiere purificación intensa del antígeno. Así pues, el ELISA de doble determinante es preferible al ELISA competitivo directo para la detección de un antígeno en una muestra clínica. Véase, por ejemplo, el uso del ELISA de doble determinante para la cuantificación de la

oncoproteína *c-myc* en muestras de biopsia. Field et al., *Oncogene* 4: 1463 (1989); Spandidos et al., *AntiCancer Res.* 9: 821 (1989).

5 En un ELISA de doble determinante, una cantidad de MAb o fragmento de anticuerpo sin marcar ("anticuerpo de captura") se une a un soporte sólido, la muestra de ensayo se pone en contacto con el anticuerpo de captura, y se
 10 agrega una cantidad de anticuerpo soluble (o fragmento de anticuerpo) marcado detectablemente para permitir la detección y cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo de captura, el antígeno y el anticuerpo marcado. Un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similar. En el presente contexto, un fragmento de anticuerpo es una porción de un MAb PAM4 que se une a un epítipo del antígeno PAM4. La expresión "fragmento de anticuerpo" incluye también cualquier proteína sintética o preparada por ingeniería genética que actúa igual que un anticuerpo por unión a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de la cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y moléculas de polipéptido recombinante de cadena simple en donde las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador de péptido. Una proteína de fusión de anticuerpo es una molécula de unión del antígeno producida por vía recombinante en donde se unen dos o más del mismo o diferentes segmentos del anticuerpo de cadena simple o fragmento de anticuerpo con las mismas o diferentes especificidades. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo conjugado con un agente de diagnóstico-detección y/o terapéutico. El término anticuerpo PAM4 incluye anticuerpos humanizados, humanos y murinos, fragmentos de anticuerpo, inmunocombinados y fragmentos de los mismos y proteínas de fusión de anticuerpo y fragmentos de los mismos.

Los métodos para realizar un ELISA de doble determinante son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Field *et al.*, *supra*, Spandidos *et al.*, *supra*, y Moore et al., "Twin-site ELISAs for oncoproteins fos and myc using the AMPAK System", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 273 a 281 (The Humana Press, Inc. 1992).

25 En el ELISA de doble determinante, el anticuerpo soluble o fragmento de anticuerpo debe unirse a un epítipo de PAM4 que es distinto del epítipo reconocido por el anticuerpo de captura. El ELISA de doble determinante puede realizarse para comprobar si el antígeno PAM4 está presente en una muestra de biopsia. Alternativamente, el ensayo puede realizarse para cuantificar la cantidad de antígeno PAM4 que está presente en una muestra clínica de fluido corporal. El análisis cuantitativo puede ser realizarse incluyendo diluciones de antígeno PAM4 purificado.

30 Los Mabs PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos de la presente invención son también adecuados para la preparación de un kit de ensayo. Tal kit puede comprender un medio portador que está compartimentado para recibir en estrecho confinamiento uno o más contenedores tales como frascos, tubos y similares, comprendiendo cada uno de dichos contenedores los elementos del inmunoensayo por separado.

35 Por ejemplo, puede haber un contenedor que contiene el anticuerpo inmovilizado sobre un soporte de fase sólida, y otro contenedor adicional que contiene anticuerpos marcados detectablemente en solución. Otros contenedores pueden contener soluciones estándar que comprenden diluciones en serie de antígeno PAM4. Las soluciones estándar de antígeno PAM4 pueden usarse para preparar una curva patrón con la concentración de antígeno PAM4 representada en abscisas y la señal de detección en ordenadas. Los resultados obtenidos de una muestra que contiene el antígeno PAM4 pueden ser interpolados de tal representación gráfica para dar la concentración del antígeno PAM4 en la muestra biológica.

40 Los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden utilizarse también para detectar la presencia del antígeno PAM4 en secciones de tejido preparadas a partir de una muestra histológica. Tal detección *in situ* puede ser utilizada para determinar la presencia del antígeno PAM4 y determinar la distribución del antígeno PAM4 en el tejido examinado. La detección *in situ* puede conseguirse aplicando un anticuerpo PAM4 marcado detectablemente a secciones de tejido congelado. Los estudios indican que el antígeno PAM4 se conserva en secciones embebidas en parafina. Las técnicas generales de detección *in situ* son conocidas por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application", en *Mammalian Development: a practical Approach* 113-38 Monk (ed.) (IRL Press 1987), y Coligan en las páginas 5.8.1 a 5.8.8.

50 Los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos pueden ser marcados detectablemente con cualquier resto marcador apropiado, por ejemplo un radioisótopo, una enzima, un marcador fluorescente, un colorante, un cromógeno, un marcador quimioluminiscente, marcadores bioluminescentes o un marcador paramagnético. Los métodos de preparación y detección de tales anticuerpos PAM4 marcados detectablemente son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen con más detalle a continuación.

55 El resto marcador puede ser un radioisótopo que es detectado por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía. En una realización preferida, el conjugado de diagnóstico es un isótopo emisor de radiaciones gamma, beta o de positrones. Un resto marcador en la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula que generará una señal bajo unas condiciones predeterminadas. Los ejemplos de restos marcadores incluyen radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y marcadores paramagnéticos. Como se usa en el presente texto, un agente de

5 diagnóstico o terapéutico es una molécula o átomo que se conjuga con un resto de anticuerpo para producir un conjugado que es útil para diagnóstico y terapia. Los ejemplos de agentes de diagnóstico o terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, oligonucleótidos, inmunomoduladores, citocinas, hormonas, antagonistas de hormonas, enzimas, inhibidores de enzimas, isótopos, otros anticuerpos, quelantes, colorantes, cromógenos, compuestos de boro y restos marcadores.

10 En una realización se describe un oligonucleótido, tal como una molécula antisentido que inhibe la expresión de bcl-2 en la patente de EE. UU. n° 5.734.033 (Reed), que puede ser conjugado con, o formar la porción de agente terapéutico de un inmunocombinado o proteína de fusión de anticuerpo de la presente invención. Alternativamente, el oligonucleótido se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente con un anticuerpo PAM4 desnudo o conjugado o fragmento de anticuerpo de la presente invención. En una realización preferida, los oligonucleótidos son un oligonucleótido antisentido que preferiblemente se dirige contra un oncogén o un producto oncogénico de un tumor maligno de células B, como bcl-2.

15 Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de restos de marcadores a anticuerpos PAM4 puede lograrse usando las técnicas estándar conocidas en este campo. La metodología típica en este sentido se describe en Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70: 1 (1976), Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81: 1 (1977), Shih et al., Int'l J. Cancer (1990) 46: 1101.

Los métodos de detección *in vitro* e *in situ* antes descritos pueden utilizarse para ayudar en el diagnóstico o el estadiaje de una condición patológica. Por ejemplo, tales métodos pueden utilizarse para detectar tumores que expresan el antígeno PAM4, tal como el cáncer de páncreas.

20 Diagnóstico *In Vivo*.

25 La presente invención contempla también el uso de anticuerpos PAM4 para diagnóstico *in vivo* como se define en las reivindicaciones. El método de diagnóstico por imágenes con MABs radiomarcados es bien conocido. En la técnica de la inmunoescintigrafía, por ejemplo, los anticuerpos son marcados con un radioisótopo emisor de radiación gamma e introducidos en un paciente. Se usa una cámara gamma para detectar la localización y la distribución de radioisótopos emisores de radiación gamma. Véase, por ejemplo, Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro et al (eds.), págs. 624 a 652 (Mack Publishing Co., 1990) y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies" en Biotechnology and Pharmacy 227 a 49, Pezzuto et al (eds.) (Chapman & Hall 1993).

30 Para el diagnóstico por imágenes, pueden unirse radioisótopos al anticuerpo PAM4 directamente, o indirectamente usando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios útiles incluyen quelantes tales como el ácido etilendiaminetetraacético y el ácido dietilentriaminapentacético. Por ejemplo, véase Shih *et al.*, *supra* y patente de EE. UU. n° 5.057.313.

35 La dosis de radiación suministrada al paciente se mantiene a un nivel tan bajo como sea posible por la elección de isótopo para la mejor combinación de vida mitad mínima, mínima retención en el cuerpo y mínima cantidad de isótopo que permita la detección y medición exacta. Los ejemplos de radioisótopos que se pueden unir al anticuerpo PAM4 y son apropiados para el diagnóstico por imagen incluyen ^{99m}Tc y ^{111}In .

40 Los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos pueden también ser marcados con diversos iones paramagnéticos y una variedad de agentes de contraste radiológico para los propósitos de diagnóstico *in vivo*. Los agentes de contraste que son especialmente útiles para imágenes de resonancia magnética comprenden iones de gadolinio, manganeso, disprosio, lantano o hierro. Los agentes adicionales incluyen cromo, cobre, cobalto, níquel, renio, europio, terbio, holmio o neodimio. Los anticuerpos PAM4 y fragmentos de los mismos pueden ser también conjugados con agentes de contraste-potenciación de ultrasonidos. Por ejemplo, el agente de contraste de ultrasonido es un liposoma que comprende una IgG de PAM4 humanizado o fragmento de la misma. También 45 preferiblemente, el agente de contraste de ultrasonido es un liposoma que se llena de gas.

50 En una realización preferida, puede ser conjugado un anticuerpo biespecífico con un agente de contraste. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico puede comprender más de un agente de potenciación de la imagen para su uso en imágenes por ultrasonido. En una realización preferida, el agente de contraste es un liposoma. Preferiblemente, el liposoma comprende un DTPA-péptido bivalente unido covalentemente a la superficie exterior del liposoma. También se prefiere que el liposoma esté lleno de gas.

Excipiente farmacéuticamente adecuado.

55 Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción de un anticuerpo PAM4 en una aplicación terapéutica. También pueden prepararse preparados de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber el anticuerpo PAM4, la proteína de fusión y fragmentos de éstos. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli (etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. Sherwood et al., Bio/Technology 10: 1446 (1992). La tasa de liberación de un anticuerpo PAM4, proteína de fusión y fragmento del mismo de tal matriz

depende del peso molecular del anticuerpo PAM4, proteína de fusión y fragmento del mismo, la cantidad de anticuerpo PAM4 dentro de la matriz, y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Otras formas de dosificación sólida se describen en Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990) y ediciones revisadas los mismos.

5

Los anticuerpos PAM4 humanizados y humanos y fragmentos de los mismos para ser suministrados a un sujeto pueden consistir en el anticuerpo, inmunoconjugado, proteína de fusión o fragmentos de los mismos solos, o pueden comprender uno o más excipientes adecuados farmacéuticamente, uno o más ingredientes adicionales o alguna combinación de estos.

10 El inmunoconjugado, anticuerpo desnudo y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden ser formulados de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones útiles farmacéuticamente, con lo que el inmunoconjugado o el anticuerpo desnudo se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones revisadas.

15

El inmunoconjugado o anticuerpo desnudo de la presente invención puede ser formulado para administración por vía intravenosa, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en ampollas o en envases multidosis, con un conservante incorporado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

20

El inmunoconjugado, anticuerpo desnudo y fragmentos de los mismos pueden también ser administrados a un mamífero por vía subcutánea o incluso por otras vías parenterales. En una realización preferida, el anticuerpo PAM4 o fragmento del mismo es administrado en una dosis de 20 a 2000 mg de proteína por dosis. Además, la administración puede ser por infusión continua o por bolos simples o múltiples. En general, la dosificación de un inmunoconjugado, proteína de fusión o anticuerpo desnudo administrados para los seres humanos puede variar dependiendo de factores tales como la edad del paciente, el peso, la altura, sexo, estado general y antecedentes médicos. Típicamente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de inmunoconjugado, proteína de fusión de anticuerpo o anticuerpo desnudo que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 20 mg/kg como una infusión intravenosa única, aunque también puede administrarse una dosis mayor o menor como dicten las circunstancias. Esta dosificación puede repetirse según se necesite, por ejemplo una vez por semana durante cuatro a diez semanas, preferiblemente una vez por semana durante ocho semanas y más preferiblemente una vez por semana durante cuatro semanas. También puede ser administrado con menos frecuencia, como cada dos semanas durante varios meses. La dosis puede administrarse a través de varias rutas parenterales, con los ajustes necesarios de dosis y programación.

25

30

35

Los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden ser formulados de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo que los anticuerpos PAM4, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos se combinan en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "portador farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (1990).

40

45 Con fines terapéuticos, el inmunoconjugado o anticuerpo desnudo se administra a un mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva. Un sujeto adecuado para la presente invención es normalmente un ser humano, aunque también se contempla un sujeto animal no humano. Se dice que un preparado de anticuerpo es administrado en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia tiene como resultado un cambio detectable en la fisiología de un mamífero receptor.

50

Ejemplos

Los ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones de la actual invención y no deben utilizarse, en modo alguno, para limitar el alcance de las reivindicaciones.

55

Los siguientes ejemplos discuten estudios experimentales empleando MAb PAM4 y el cáncer de páncreas humano CaPan1. El cáncer de páncreas humano CaPan1 se transporta como xenoinjerto en ambos sitios subcutáneo y ortotópico. El MAb y agente han dado por resultado un tiempo de supervivencia significativamente mejorado. Se ha demostrado que altas concentraciones de anticuerpo monoclonal PAM4 se dirigen a modelos tumorales humanos xenoinjertados para alcanzar a la mayoría de los tumores de páncreas dentro de un grupo inicial de pacientes. El

empleo de un inmunoensayo *in vitro* para cuantificar el antígeno reactivo con PAM4 en la sangre de los pacientes parece prometedor en su capacidad para distinguir el cáncer de páncreas de la pancreatitis, así como otros grupos de enfermedades y normales.

5 Estudios clínicos con MAb PAM4 han demostrado que la mayoría de las lesiones fueron dirigidas en pacientes y que no hay ninguna indicación de absorción en los tejidos normales. La dosimetría indicó que era posible suministrar de 10 a 20 cGy/mCi a los tumores, con una relación de dosis de tumor a médula ósea roja de 3:1 a 10:1. Estos datos sugieren que PAM4 puede ser útil para el desarrollo de un experimento en fase-I para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Ejemplo 1 - Estudios de tinción inmunohistoquímica.

10 La inmunohistoquímica en tejidos adultos normales ha demostrado que el epítipo reactivo de PAM4 estaba restringido al tracto gastrointestinal donde la tinción era débil, pero definitivamente positiva (Tabla 1). El tejido de páncreas normal, incluyendo los conductos, ductules, acinos y las células del islote, era negativo para la tinción. Un inmunoensayo enzimático basado en PAM4 con homogenados tisulares como antígenos apoyó generalmente los datos inmunohistológicos (Tabla 2). El epítipo de PAM4 estaba ausente del páncreas normal y otros tejidos no
15 gastrointestinales. En los tejidos neoplásicos, el PAM4 era reactivo en veintiuno de veinticinco (85%) de los cánceres de páncreas (Tabla 3). La reactividad de PAM4 parecía correlacionarse con el estadio de la diferenciación tumoral. Por ejemplo, veinte de veintinueve tumores de páncreas bien y moderadamente diferenciados eran positivos, mientras que sólo uno de cuatro tumores escasamente diferenciado eran positivos. En general, los tumores escasamente diferenciados representan menos del 10% de todos los cánceres de páncreas.

20 Estos estudios han mostrado que la reactividad de PAM4 y la distribución del tejido (normal y cáncer) son distintas a la indicada por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3 y los antígenos de Lewis. Junto con los estudios de bloqueo cruzado realizados con algunos de estos MABs, los datos sugieren que el MAb PAM4 reconoce un epítipo único y nuevo. En comparación con CA19.9, DUPAN2 y aLe^b, el PAM4 parece ser más restringido en su distribución de los
25 tejidos y es reactivo con un porcentaje más alto de tumores de páncreas. Además, da una mayor intensidad total de reacción a las concentraciones equivalentes y es reactivo con un mayor porcentaje de células dentro de los tumores. Finalmente, se encontró que el PAM4 es tan sólo débilmente reactivo con tres de doce muestras de pancreatitis crónica, mientras que CA19.9 y DUPAN2 eran fuertemente reactivas con las doce muestras. Aunque se reconoce que la especificidad es dependiente del tipo de ensayo empleado y la gama y número de tejidos examinados, la capacidad de PAM4 para distinguir entre el tejido pancreático normal y neoplásico, su capacidad para reaccionar
30 con un gran porcentaje de las muestras de cáncer, así como la elevada intensidad de las reacciones, fueron razones importantes para continuar con los estudios de desarrollo de aplicación clínica.

Tabla 1 - Tinción con inmunoperoxidasa de tejidos adultos normales con MAb PAM4.

Tejido	Reacción de tinción
Páncreas (22) ^a	
Ductos	--
Acinos	--
Islotes	--
Glándula submaxilar (2)	--
Esófago (2)	--
Estómago (3)	+ células secretoras de mucosidad
Duodeno (3)	+ células calciformes
Yeyuno (3)	+ células calciformes
Íleon (3)	+ células calciformes
Colon (5)	+ células calciformes
Hígado (3)	--
Vesícula biliar (2)	--
Bronquio (3)	--
Pulmón (3)	--
Corazón (3)	--
Bazo (3)	--
Riñón (3)	--
Vejiga (3)	--
Próstata (2)	--
Testículos (2)	--
Útero (2)	--
Ovario (2)	--
a - () número de muestras individuales examinadas	

ES 2 524 767 T3

Tabla 2 - Reactividad del anticuerpo monoclonal PAM4 con homogenados de tejido adulto normal mediante EIA

Tejido	µg/g de tejido ^a
Páncreas	6,4
Esófago	8,1
Estómago	61,3
Duodeno	44,7
Yeyuno	60,6
Colon	74,5
Hígado	0,0
Vesícula biliar	5,6
Corazón	3,7
Bazo	3,4
Riñón	6,6
Vejiga	4,9
Tiroides	3,5
Suprarrenales	1,3
Ureter	2,6
Testículo	3,9
Tumor de páncreas CaPan1	569
a – los valores son medias de dos muestras de autopsia	

Tabla 3 - Reactividad inmunohistoquímica de varios anticuerpos monoclonales tumores de páncreas

	Diferenciación	PAM4	CA19.9	aLe ^a	DUPAN2
1	W	+++	-	-	+++
2	M	++	+++	+++	+
3	M	+	-	+	+
4	M	+++	+++	+++	+
5	M	++	+	-	-
6	M	+	ND	ND	ND
7	M	+++	+++	+++	+++
8	M	+	-	-	+++
9	M	++	+	++	-
10	M	++	++	++	+++
11	M	++	+++	+++	+
12	M	++	+	+	+++
13	M	+	+++	+++	+
14	M	++	+	+	++
15	M	+++	+	+	++
16	M	+	+	++	-
17	M	-	+	+	-
18	M	++	++	++	++
19	M	+++	+	+++	++
20	M	+	-	-	-
21	M	+++	+++	+	++
22	P	+	+	+	+++
23	P	-	-	-	-
24	P	-	-	-	-
25	P	-	-	+	-
TOTAL		21/25	17/24	18/24	16/24
-: negativo; +: se tiñe 5 a 20% de tejido; ++: se tiñe 21 a 50% de tejido; +++: se tiñe > 50% de tejido; W, M, P: diferenciación buena, moderada o escasa; *: tejido metastásico; ND: no hecho					

Tabla 4 - Tinción con inmunoperoxidasa de tejidos neoplásicos con MAb PAM4

Tejido	µg/g de tejido ^a
Páncreas	21/25
Colon	10/26
Estómago	1/5
Pulmón	1/15
Mama	0/30
Ovario	0/10
Próstata	0/4
Hígado	0/10
Riñón	0/4

Ejemplo 2 – Biodistribución in vivo y orientación al tumor de PAM4 radiomarcado.

Se realizaron estudios iniciales de biodistribución de PAM4 en una serie de cuatro tumores distintos de páncreas humanos xenoinjertados cubriendo la gama de diferenciación esperada. Cada una de las cuatro líneas tumorales empleadas, AsPcl, BxPc3, Hs766T y CaPan1, mostraron concentraciones de ¹³¹I-PAM4 dentro de los tumores (intervalo: 21 - 48% ID/g al tercer día) que eran significativamente más altas ($p < 0,01 - 0,001$) que el anticuerpo Ag8 coincidente con el isotipo, no específico administrado al mismo tiempo, (margen: 3,6% - 9,3% ID/g al tercer día). Los datos de biodistribución se utilizaron para estimar las dosis de radiación potencial para el tumor de 12.230, 10.684, 6.835 y 15.843 cGy/mCi de dosis inyectada de AsPcl, BxPc3, Hs766T y CaPan1, respectivamente. Con una dosis máxima tolerada real (DMT) de 0,7 mCi, PAM4 podía proporcionar una dosis rad sustancial a cada uno de los modelos de tumor xenoinjertados. En cada línea tumoral los niveles en sangre de PAM4 radiomarcado fueron significativamente inferiores ($p < 0,01 - 0,001$) que el Ag8 no específico. Las dosis de radiación potencial a la sangre a partir de PAM4 fueron 1,4 - 4,4 veces más bajas que a partir de Ag8. Cuando las dosis de radiación al tumor a partir de PAM4 se normalizaron en relación con las dosis en sangre a partir de PAM4, los tumores recibieron dosis que fueron 2,2; 3,3; 3,4; y 13,1 veces mayores que la sangre, respectivamente. Es importante que las dosis de radiación potencial a tejidos no tumorales eran mínimas.

La biodistribución de PAM4 fue comparada con un anticuerpo anti-CEA, MN14, utilizando el modelo tumoral CaPan1. La concentración de PAM4 dentro del tumor era mucho mayor que el MN14 en momentos tempranos, dando relaciones tumor:sangre en el día tres de $12,7 \pm 2,3$ para PAM4 en comparación con $2,7 \pm 1,9$ para MN14. Aunque la absorción de PAM4 dentro del tumor era significativamente superior a la de MN14 en momentos tempranos (día uno - $p < 0,001$; día tres - $p < 0,01$), los análisis de dosimetría indicaron una dosis al tumor solamente 3,2 veces mayor de PAM4 en comparación con MN14 durante el período de estudio de catorce días. Esto era debido a un rápido aclaramiento de PAM4 del tumor, de forma que en momentos más tardíos estaban presentes dentro de los tumores concentraciones similares de los dos anticuerpos. También se observó un aclaramiento rápido de PAM4 a partir del tumor en los modelos tumorales BxPc3 y Hs766T pero no en AsPc1. Estas observaciones fueron diferentes de las publicadas para otros anticuerpos anti-mucina, como por ejemplo G9 y B72.3 en el cáncer colorrectal, donde cada uno mostró tiempos de retención más largos en comparación con el anticuerpo MN14. Los resultados de estudios sobre el metabolismo de PAM4, indican que tras la unión inicial a la célula tumoral, el anticuerpo se libera rápidamente, siendo posiblemente catabolizado o perdido como un complejo antígeno: anticuerpo. Esto podría haber tenido implicaciones desfavorables para el uso del anticuerpo en pacientes excepto que el aclaramiento de la sangre también es muy rápido. Estos datos sugieren que el ¹³¹I puede no ser la elección de isótopo apropiada para aplicaciones terapéuticas. Un isótopo de vida corta, tal como ⁹⁰Y o ¹⁸⁸Re, que puede ser administrado frecuentemente, puede probar que es un reactivo más eficaz.

El PAM4 no mostró ninguna evidencia de orientación a los tejidos normales, excepto en el modelo tumoral CaPan1, donde se observó una absorción esplénica pequeña pero estadísticamente significativa (en el intervalo de 3,1 - 7,5 % ID/g en el tercer día). Este tipo de orientación esplénica ha sido observado en la aplicación clínica de los anticuerpos anti-mucina B72.3 y CC49. Es importante que estos estudios indicaron también que la orientación esplénica no afectaba a la absorción por el tumor del anticuerpo ni interfería con la interpretación de los escáneres nucleares. Estos estudios sugirieron que la orientación esplénica no era debida a la reactividad cruzada de los antígenos en el bazo, ni a la unión por receptores Fc, sino más bien a una o más de las siguientes posibilidades: orientación directa del antígeno atrapado en el bazo, o absorción indirecta de complejos antígeno:anticuerpo bien sea formados en la sangre o bien liberados desde el sitio del tumor. Esto último requeriría la presencia de complejos inmunitarios en la sangre; sin embargo, éstos no se observaron cuando las muestras fueron examinadas al cabo de un tiempo tan corto como a los cinco minutos y tan largo como a los siete días mediante filtración en gel (HPLC, columna GF-250); el anticuerpo radiomarcado eluyó como material nativo. La explicación anterior parece más probable a la vista del hecho de que el tumor CaPan1 produjo grandes cantidades de antígeno reactivo a PAM4, 100 a 1000 veces más altas que las de las otras líneas de células tumorales examinadas. La falta de orientación esplénica por PAM4 en estas otras líneas tumorales sugiere que este fenómeno estaba relacionado con la excesiva producción del antígeno. En todo caso, la orientación esplénica puede superarse aumentando la dosis de proteína a 10 µg desde la dosis de 2 µg originales. Una mayor cantidad de antígeno atrapado en el bazo presumiblemente fue complejada con PAM4 no marcado en vez de anticuerpos radiactivos. El aumento la dosis de proteína no tuvo

efectos adversos sobre la orientación de PAM4 a los tejidos tumorales o no tumorales. De hecho, un aumento de la dosis de proteína a 100 µg produjo más del doble de la concentración de PAM4 radiomarcado dentro del tumor CaPan1.

Ejemplo 3 - Desarrollo del modelo de tumor de páncreas ortotópico en ratones atímicos desnudos.

5 Con el fin de obtener un mayor parecido con la presentación clínica del cáncer de páncreas en un modelo animal, los solicitantes desarrollaron un modelo ortotópico mediante la inyección de células tumorales directamente en la cabeza del páncreas. Los tumores CaPan1 ortotópicos crecieron progresivamente sin síntomas evidentes hasta el desarrollo de ascitis y la muerte entre las diez y las catorce semanas. A las tres a cuatro semanas después de la implantación, los animales desarrollaron un tumor palpable de aproximadamente 0,2 g. Dentro de las ocho semanas de crecimiento, se observaron tumores primarios de aproximadamente 1,2 g junto con metástasis en el hígado y el bazo (1 – 3 tumores metastásicos por animal; cada tumor < 0,1 g). A las diez a catorce semanas las siembras del diafragma con desarrollo de ascitis eran evidentes. La formación de ascitis, e ictericia ocasional, eran generalmente los primeros indicios evidentes de crecimiento del tumor. La ascitis es una acumulación de líquido en la cavidad abdominal y la ictericia es una coloración amarillenta de la piel y ojos debida a excesivos pigmentos biliares en la sangre. En este tiempo los tumores eran más bien grandes, de 1 a 2 g, y como mucho los animales tenían solamente tres a cuatro semanas hasta que ocurrió la muerte.

El ¹³¹I- PAM4 administrado a animales que llevan tumores ortotópicos de cuatro semanas de edad (aproximadamente 0,2 g) mostró orientación específica al tumor primario con índices de localización de 7,9 ± 3,0 en el día uno aumentando a 22,8 ± 15,3 al día catorce. No se acusó ninguna evidencia de orientación específica a otros tejidos. En un caso en el que se observaron metástasis del tumor en el hígado y el bazo, ambas metástasis fueron señaladas como diana y tenían altas concentraciones de anticuerpo radiomarcado. Además, aproximadamente la mitad de los animales desarrollaron un tumor subcutáneo en el sitio de la incisión. No se acusaron diferencias significativas en la orientación de los tumores ortotópicos y subcutáneos dentro de un mismo animal, y no se observaron diferencias significativas en la orientación del tumor ortotópico tanto si el animal tenía un tumor subcutáneo como si no. Las dosis estimadas de radiación a partir de PAM4 fueron 6,704 y 1,655 cGy/mCi para el tumor primario y la sangre, respectivamente.

Ejemplo 4 - Desarrollo de un inmunoensayo enzimático para la cuantificación del antígeno tumoral en circulación.

Los autores de la presente invención han desarrollado un ensayo inmunoenzimático empleando PAM4 como reactivo de captura con una IgG purificada no marcada, derivada de policlonal de conejo anti- mucina pancreática, seguido por IgG anti-conejo de burro marcada con peroxidasa como reactivo de detección. A través del uso de este ensayo se obtuvieron los resultados que siguen.

Dentro del margen de antígeno detectado por el ensayo, se obtuvieron valores del coeficiente de variación inferiores al 10 %. Los sueros de veinticinco individuos sanos fueron examinados y mostraron una media ± S.D. de 4,0 ± 3,1 unidades. Se estableció entonces un valor de corte o *cut-off* para la respuesta positiva en la media + 2 S.D. = 10,2 unidades. De un total de treinta y siete pacientes con cáncer de páncreas, treinta y dos o el 86% fueron positivos por este ensayo, mientras que sólo tres de trece pacientes con pancreatitis dieron positivo. El antígeno PAM4 se elevó en el 55% (18/33) de los pacientes con cáncer colorrectal, un número aproximadamente similar al 40% de las muestras de cáncer colorrectal reactivas con PAM4 por inmunohistoquímica. Entre otros cánceres, el antígeno PAM4 fue positivo en cuatro de diez y seis cánceres de ovario, y cinco de veinte pacientes de cáncer de mama, todos los cuales tenían la enfermedad extendida. También, como puede observarse en la Tabla 5 que sigue, el valor de la mediana para el cáncer de páncreas (84,5 unidades) es del orden de diez veces mayor que para todos los otros grupos de cáncer (excepto el cáncer biliar) aunque la inmensa mayoría de estos casos eran carga tumoral grande en fase tardía de estadiaje.

Tabla 5 – Reactividad de PAM4 con sueros.

	n	Unidades/ml				
		Media	SD	Mediana	Intervalo	% Positivos ^a
Normal	25	4,0	3,1	4,7	0,0 - 9,4	0%
Pancreatitis	13	14,6	20,3	6,8	0,4 - 66,7	23%
CA pancreático	37	317,5	427,1	84,5	0,9 - 1000	86%
CA biliar	8	155,4	343,8	37,8	6,6 - 1000	63%
CA hepatoma	30	7,9	8,0	6,4	0,0 - 32,8	30%
CA colorrectal	33	50,0	171,6	11,8	3,4 - 1000	55%
CA de pulmón	38	25,8	44,6	9,3	0,0 - 196,0	39%
CA de mama	20	11,1	18,5	5,8	0,0 - 83,3	25%
CA de ovario	16	68,9	248,4	5,5	0,0 - 1000	25%
Linfoma no-Hodgkin	14	6,6	3,1	7,5	2,2 - 12,8	14%

^aValor de corte 10,2 unidades/ml (media ± 2 S.D.)

Además de estos resultados, se llevó a cabo un estudio preliminar en el modelo ortotópico para examinar el uso potencial de este ensayo de PAM4 en el manejo. A las dos semanas después de la implantación del tumor CaPan1 ortotópico (masa tumoral estimada de 0,15 g), ninguno de los animales tenía antígeno detectable en la sangre. A las cuatro semanas (masa tumoral estimada de 0,2 g) uno de cinco animales tenía un nivel de antígeno detectable, (72 unidades), y a las seis semanas (volumen estimado del tumor de 0,4 g) cuatro de cinco tenían antígeno cuantificable (intervalo: 98 - 6080 unidades). Un factor limitante importante en términos de la determinación del momento más temprano en el cual pudo detectarse antígeno en el suero fue la limitada cantidad de sangre que podía obtenerse, de forma que pudiesen hacerse extracciones repetidas. Así pues, los sueros fueron diluidos 1:10 antes del ensayo.

Ejemplo 5 - Radioinmunoterapia experimental del cáncer de páncreas.

Se llevaron a cabo estudios iniciales acerca del uso de ^{131}I -PAM4 para terapia con el tumor CaPan1, que fue desarrollado como xenoinjerto subcutáneo en ratones atímicos. A los animales que tenían un tumor de 0,25 g se les administraron 350 mCi de ^{131}I -PAM4 en un experimento que también comparó los efectos terapéuticos de una dosis similar de Ag8 no específico. La MTD para administración de ^{131}I -PAM4 a los animales que tenían tumores de 1 cm³ es 700 mCi. A las semanas cinco y seis, los animales tratados con PAM4 mostraron una drástica regresión del tumor, e incluso a la semana veintisiete cinco de los ocho se mantuvieron libres de tumor. Los animales no tratados, así como los tratados con Ag8, mostraron una progresión rápida del crecimiento del tumor aunque se observó una diferencia significativa entre estos dos grupos de control. A las siete semanas, los tumores del grupo no tratado habían crecido 20,0 ± 14,6 veces a partir del momento inicial mientras que los tumores tratados con ^{131}I -Ag8 habían crecido solamente 4,9 ± 1,8 veces. En este momento, los tumores PAM4 habían revertido a 0,1 ± 0,1 veces su tamaño original, una diferencia significativa de los animales tanto no tratados ($p < 0,001$) como tratados con Ag8 ($p < 0,01$) no específico.

Aunque los tumores CaPan1 eran sensibles al tratamiento con ^{131}I -PAM4, el resultado, es decir, la regresión o el progreso del tumor, depende de muchos factores entre los que se incluye el tamaño inicial del tumor. Así, grupos de animales que tienen cargas de tumor CaPan1 de 0,25 g, 0,5 g, 1,0 g o 2,0 g fueron tratados con una dosis única de 350 µCi de ^{131}I -PAM4. La mayoría de los animales que tienen tumores de un tamaño inicial de 0,25 g y 0,5 g (nueve de diez animales de cada grupo) mostraron regresión del tumor o inhibición de crecimiento durante al menos dieciséis semanas después del tratamiento. En el grupo de tumor de 1,0 g cinco de siete no mostraron crecimiento del tumor durante el periodo de 16 semanas y en el grupo de tumor de 2,0 g seis de nueve no mostraron crecimiento del tumor durante un periodo de seis semanas antes de que ocurriese la progresión. Aunque una dosis única de 350 µCi no fue tan efectiva contra los tumores más grandes, una sola dosis muy bien puede no ser el régimen apropiado; estudios de toxicidad indican la capacidad para dar ciclos múltiples de radioinmunoterapia. A los animales que tienen tumores CaPan1 de 1,0 g de promedio, se les administró bien sea una dosis única de 350 µCi de ^{131}I -PAM4, dos dosis administradas a tiempo cero y a las cuatro semanas, o se dejaron sin tratar. El grupo no tratado tuvo un tiempo medio de supervivencia de 3,7 ± 1,0 semanas (la supervivencia se define como tiempo para que el tumor alcance los 5 cm³). Los animales murieron tan pronto como a las tres semanas, no sobreviviendo ningún animal pasadas las seis semanas. Una dosis única de 350 µCi de ^{131}I -PAM4 produjo un aumento significativo en el tiempo de supervivencia a 18,8 ± 4,2 semanas ($p < 0,0001$). El intervalo de muertes de animales se extendió de las semanas trece a veinticinco. Ninguno de los animales estaba vivo al final del periodo de estudio de veintiséis semanas.

Se observó un aumento significativo del tiempo de supervivencia para el grupo de dos dosis en comparación con el grupo de dosis única. La mitad de los animales estaban vivos en la semana veintiseis con tamaños de tumor de 1,0 a 2,8 cm³ y una tasa de crecimiento medio del tumor de 1,6 ± 0,7 veces el tamaño del tumor inicial. Para aquellos animales que no sobrevivieron a las veintiseis semanas, el tiempo medio de supervivencia (17,7 ± 5,3 semanas) fue similar al del grupo de dosis única.

Estudios de terapia con PAM4 han utilizado también el modelo de tumor ortotópico. Grupos de animales que tienen tumores ortotópicos de cuatro semanas (peso estimado del tumor 0,25 g) o bien se dejaron sin tratar o fueron tratados con una dosis única de 350 µCi de ^{131}I -PAM4 o 350 µCi de ^{131}I -Ag8 no específico. Los animales no tratados tenían una tasa de mortalidad del 50% a la semana diez sin supervivientes a la semana quince. Los animales a los que se administró ^{131}I -Ag8 no específico a las cuatro semanas de crecimiento del tumor, mostraron una tasa de mortalidad del 50% en la semana siete sin ningún superviviente en la semana catorce. Aunque estadísticamente (análisis del rango logarítmico o *log rank*) no había diferencias entre estos dos grupos, es posible que la toxicidad de radiación se hubiese presentado en aproximadamente la mitad de los animales tratados con Ag8. Sin embargo, el PAM4 radiomarcado proporcionó una ventaja de supervivencia significativa ($p < 0,001$) en comparación con los animales no tratados o tratados con Ag8, con un 70% de supervivencia a las 16 semanas, al final del experimento. En este tiempo los animales supervivientes fueron sacrificados para determinar el tamaño del tumor. Todos los animales tenían el tumor con un peso promedio de 1,2 g, así como una o dos pequeñas metástasis (< 0,1 g) evidentes en cuatro de los siete animales. A las dieciséis semanas de crecimiento, estos tumores eran más representativos de un tumor de ocho semanas.

Ejemplo 6 - Modalidad combinada de quimioterapia con Gemzar y radioinmunoterapia con ^{131}I -PAM4.

Se realizaron estudios iniciales en el uso combinado de gemcitabina (gemzar) y radioinmunoterapia con ^{131}I -PAM4 en disposición de tablero de ajedrez; una dosis única de Gemzar (0, 100, 200, 500 mg/kg) frente a una dosis única

de ^{131}I -PAM4 ([MTD = 700 μCi] 100%, 75%, 50%, 0% de la MTD). Se encontró que la MTD combinada era 500 mg/kg de Gemzar con 350 μCi de ^{131}I -PAM4 (50% de la MTD). La toxicidad medida por la pérdida de peso corporal, fue al máximo considerado como no tóxico; esto es el 20% de pérdida de peso corporal. Aunque el protocolo de tratamiento combinado fue significativamente más efectivo que el gemzar solo, el tratamiento no fue más efectivo que la radioinmunoterapia sola. Los siguientes estudios se llevaron a cabo a una dosis baja de gemzar y radioinmunoterapia para examinar si se observaba un verdadero efecto terapéutico sinérgico. A los animales con tumores de aproximadamente 1 cm^3 (aproximadamente 5% del peso corporal) se les administró gemzar, 100 mg/kg en los días cero, tres, seis, nueve y doce, dándose 100 μCi de ^{131}I -PAM4 en el día cero. Se observó un efecto terapéutico con una regresión estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (dos de los cinco tumores menores que 0,1 cm^3) y/o inhibición del crecimiento de los tumores en comparación con gemzar solo. Como nota adicional, no se observó toxicidad en términos de peso corporal. El protocolo de tratamiento de combinación puede, si es necesario, suministrarse en ciclos varios, comenzando el segundo ciclo de tratamiento en la semana cuatro como se hizo con los estudios de radioinmunoterapia sola descritos anteriormente.

Ejemplo 7 - Mab PAM4 humanizado.

Una realización preferida de esta invención utiliza el anticuerpo monoclonal, MAb hPAM4, que es una IgG humanizada de PAM4 murino desarrollada de una mucina de cáncer de páncreas. La humanización de las secuencias de PAM4 murinas se utiliza para reducir la respuesta del anticuerpo anti-ratón humano que experimentan los pacientes. Para producir el PAM4 humanizado, las regiones determinantes de complementariedad murinas (CDR) se transfieren de las cadenas variables (V) pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a un dominio V humano, seguido por el reemplazo de algunos restos humanos en las regiones marco con sus contrapartidas murinas. Los anticuerpos monoclonales humanizados de acuerdo con esta invención son adecuados para su uso en métodos *in vitro* e *in vivo* de diagnóstico y terapéuticos.

La comparación de las secuencias de la región marco (FR) y variable (V) del MAb PAM4 murino (Figura 1A y 1B) con anticuerpos humanos registrados en la base de datos Kabat demostró que las FRs de PAM4 V_K y V_H mostraban el más alto grado de homología de secuencias con la de los anticuerpos humanos Walker V_K y Wil2 V_H , respectivamente. Por tanto, las FRs Walker V_K y Wil2 V_H fueron seleccionadas como los marcos humanos en los cuales fueron injertadas las CDRs murinas para PAM4 V_K y V_H , respectivamente (Figura 3). La secuencia de FR4 del anticuerpo humano, NEWM, sin embargo, fue usada para reemplazar la secuencia Wil2 FR4 para la humanización de la cadena pesada de PAM4. Unos pocos restos de aminoácidos en FRs PAM4 que flanquean las CDRs putativas se mantuvieron en hPAM4 basándose en la consideración de que estos restos tienen más impacto en la unión del Ag que otros restos de FR. Estos restos son 21M, 47W, 59P, 60A, 85S, 87F y 100G de V_K y 27Y, 30P, 38K, 49I, 66K, 67A y 69L de V_H . Las secuencias de ADN y de aminoácidos de hPAM4 V_K V_H se muestran en las Figuras 3A y 3B, respectivamente.

Una estrategia modificada como se describe en Leung et al. (Leung et al., 1994) fue usada para construir los genes diseñados V_K y V_H para hPAM4 usando una combinación de síntesis de oligonucleótidos largos y PCR como se ilustra en la Figura 4. Para la construcción del dominio hPAM4 V_H , se sintetizaron dos oligonucleótidos largos, hPAM4VHA (173-mero) y hPAM4VHB (173-mero) en un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystem).

hPAM4VHA representa nt 17 a 189 del dominio hPAM4 V_H .

**5'- AGTCTGGGGC TGAGGTGAAG AAGCCTGGGG CCTCAGTGAA
GGTCTCCTGC GAGGCTTCTG GATACACATT CCCTAGCTAT GTTTTGCAC T
GGGTGAAGCA GGCCCTGGA CAAGGGCTTG AGTGGATTGG ATATATTAAT
CCTTACAATG ATGGTACTCA GTACAATGAG AAG-3'**

hPAM4VHB representa la cadena negativa del dominio V_H hPAM4 complementario a nt 169 a 341.

**5'- AGGGTTCCCT GGCCCCAGTA AGCAAATCCG TAGCTACCAC
CGAAGCCTCT TGCACAGTAA TACACGGCCG TGTCGTCAGA TCTCAGCCTG
CTCAGCTCCA TGTAGGCTGT GTTGATGGAC GTGTCCCTGG TCAGTGTGGC
CTTGCCCTTG AACTTCTCAT TGTACTGAGT ACC-3'**

Las secuencias 3'-terminales (21 restos de nt) de hPAM4VHA y VHB son complementarias entre sí. Bajo condiciones de PCR definidas, los extremos 3' de hPAM4VHA y VHB se hibridan para formar un ADN corto bicatenario flanqueado por el resto de los oligonucleótidos largos. Cada extremo hibridado sirve como cebador para la transcripción del ADN de cadena simple, de lo que resulta un ADN bicatenario compuesto por el nt 17 a 341 de hPAM4 V_H . Este ADN se amplificó más en presencia de dos oligonucleótidos cortos, hPAM4VHBACK y hPAM4VHFOR para formar el hPAM4 V_H de longitud completa. Las partes subrayadas son sitios de restricción para subclonar, como se muestra en la Figura 4B.

ES 2 524 767 T3

hPAM4VHBACK 5'-CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG GTG A-3'
hPAM4VHFOR 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA-3'

Una cantidad mínima de hPAM4VHA y VHB (determinada empíricamente) fue amplificada en presencia de 10 µL de tampón 10x PCR (KCL 500 mM, Tris100 mM, tampón HCl, pH 8,3, MgCl₂ 15 mM), 2 µmol de hPAM4VHBACK y hPAM4VKFOR y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). Esta mezcla de reacción fue sometida a tres ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consisten en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 45 °C durante 1 minuto y polimerización a 72 °C durante 1,5 minutos. Este procedimiento fue seguido por 27 ciclos de reacción PCR que consiste en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 1 minuto y polimerización a 72 °C durante 1 minuto. El producto amplificado por PCR bicatenario para hPAM4 VH fue purificado en gel, se sometió a digestión por restricción con sitios de restricción PstI y BstEII y se clonó en los sitios de restricción PstI/BstEII complementarios del vector *staging* de la cadena pesada, VHpBS2, en donde la secuencia de VH fue totalmente ensamblada con la secuencia de ADN que codifica el codón de iniciación de la traducción y un péptido señal de secreción en marco ligado en el extremo 5' y una secuencia de intrón en el extremo 3'. VHpBS2 es un vector *staging* modificado de VHpBS (Leung et al., *Hybridoma*, 13: 469 (1994)), en el que se introdujo un sitio de restricción XhoI a diez y seis bases aguas arriba del codón de iniciación de la traducción para facilitar la siguiente etapa de subclonación. El gen de VH ensamblado fue subclonado como un fragmento de restricción XhoI-BamHI en el vector de expresión, pdHL2, que contiene las casetas de expresión tanto para las cadenas pesadas como las ligeras de IgG humana bajo el control del potenciador de IgH y promotor MT1, así como un gen *dhr* de ratón como marcador para la selección y la amplificación (Figura 4B). Dado que la región de cadena pesada de pdHL2 carece de un sitio de la restricción BamHI, esta ligación requiere el uso de un enlazador para proporcionar un puente entre el sitio BamHI de la cadena variable y el sitio HindIII presente en el vector pdHL2. Los vectores de expresión resultantes fueron designados como hPAM4VHpdHL2.

Para la construcción del ADN de longitud completa de la secuencia V_K humanizada, se sintetizaron hPAM4VKA (157-mero) y hPAM4VKB (156-mero) como se describió anteriormente. hPAM4VKA y VKB fueron amplificados por dos oligonucleótidos cortos PAM4VKBACK y hPAM4VKFOR como se describió anteriormente.

El hPAM4VKA representa los nt 16 a 172 del dominio V_K de hPAM4.

5'-CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAG
TCACCATGAC CTGCAGTGCC AGCTCAAGTG TAAGTTCCAG CTA CTTGTAC
TGGTACCAAC AGAAACCAGG GAAAGCCCC AACTCTGGA TTTATAGCAC
ATCCAACCTG GCTTCTG-3'

El hPAM4VKB representa la cadena negativa del dominio V_K de hPAM4 complementario a nt 153 a 308.

5'-GTCCCCCCTC CGAACGTGTA CGGGTACCTA TTCCACTGAT
GGCAGAAATA AGAGGCAGAA TCTTCAGGTT GCAGACTGCT GATGGTGAGA
GTGAAGICTG TCCCAGATCC ACTGCCACTG AAGCGAGCAG GGA CTTCCAGA
AGCCAGGTTG GATGTG-3'

Las secuencias 3'-terminales (20 restos de nt) de hPAM4VKA y VKB son complementarias entre sí. Bajo condiciones de PCR definidas, los extremos 3' de hPAM4VKA y VKB se hibridan para formar un ADN bicatenario corto flanqueado por el resto de los oligonucleótidos largos. Cada extremo hibridado sirve como cebador para la transcripción del ADN monocatenario, resultando un ADN bicatenario compuesto por el nt 16 a 308 de hPAM4 V_K. Este ADN se amplificó más en presencia de dos oligonucleótidos cortos, hPAM4VKBACK y hPAM4VKFOR, para formar el hPAM4 V_K de longitud completa. Las porciones subrayadas son sitios de restricción para la subclonación como se describe a continuación.

hPAM4VKBACK 5'-GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG-3'
hPAM4VKFOR 5'- TTA GAT CTC CAG TCG TGT CCC CCC TCC GAA CGT-3'

Los productos de la PCR purificados en gel para V_K de hPAM4 fueron sometidos a digestión por restricción con PvuII y BglII y clonados en los sitios complementarios PvuII/BclI del vector *staging* de la cadena ligera, VKpBR2. El VKpBR2 es un vector *staging* modificado de VKpBR (Leung et al., *Hybridoma*, 13: 469 (1994)), en el cual fue introducido un sitio de restricción XbaI a diez y seis bases aguas arriba del codón de iniciación de la traducción. Los genes V_K ensamblados fueron subclonados como fragmentos de restricción XbaI-BamHI en el vector de expresión que contiene la secuencia de VH, hPAM4VHpdHL2. Los vectores de expresión resultantes fueron designados como hPAM4pdHL2.

Aproximadamente 30 µg de hPAM4pdHL2 fueron linealizados por digestión con Sall y transfectados en células Sp2/0-Agl4 por electroporación a 450 V y 25 µF. Las células transfectadas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y se incubaron en un incubador de cultivo de células con CO₂ durante dos días, y luego se seleccionaron en relación con la resistencia de MTX. Las colonias supervivientes de la selección emergieron en dos a tres semanas y fueron

cribadas en cuanto a la secreción de anticuerpo humano por el ensayo ELISA. De forma breve, los sobrenadantes (~100 μ l) de las colonias supervivientes fueron agregados a los pocillos de una microplaca de ELISA previamente recubierta con Ab específico para el fragmento IgG F(ab')₂ anti-humano de cabra. La placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas no unidas fueron eliminadas lavando tres veces con tampón de lavado (PBS que contiene Tween-20 al 0,05%). Se añadió a los pocillos Ab específico para el fragmento IgG F(ab')₂ anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de incubación durante una hora, se añadió a los pocillos una solución de sustrato (100 μ L/pocillo) que contiene dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) 4 mM y 0,04% de H₂O₂ en PBS tras el lavado. Se permitió que se desarrollase el color en la oscuridad durante 30 minutos y la reacción se detuvo por la adición de 50 μ L de solución de H₂SO₄ 4 N. La IgG humana unida se midió leyendo la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA. Los clones de las células positivas fueron expandidos y el hPAM4 se purificó del sobrenadante del cultivo celular por cromatografía de afinidad en una columna de Proteína A.

La actividad de unión de Ag de hPAM4 fue confirmada por el ensayo ELISA en placa de microtítulo recubierta de extractos de células de cáncer de páncreas. Se desarrolló un ensayo de unión competitiva ELISA usando placas cubiertas con antígeno-PAM4 para evaluar la afinidad de unión de Ag de hPAM4 en comparación con la de un PAM4 quimérico compuesto de dominios V murino y C humano C. Cantidades constantes del cPAM4 conjugado con HRP mezcladas con concentraciones variables de cPAM4 o hPAM4 fueron añadidas a los pocillos recubiertos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 a 2 h. La cantidad de cPAM4 conjugado con HRP unido al Ag CaPan1 fue revelada mediante la lectura de la absorbancia a 490 nm después de la adición de una solución de sustrato que contiene dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) 4 mM y 0,04% de H₂O₂. Como muestran los ensayos de competencia en la Figura 4, los anticuerpos hPAM4 y cPAM4 exhibieron actividades de unión similares.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen células hospedadoras microbianas o de mamífero. Un hospedador preferido es la línea celular humana, PER.C6, que fue desarrollada para la producción de MAbs y otras proteínas de fusión. En consecuencia, una realización preferida de la presente invención es una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN que codifica un MAb PAM4, conjugado, proteína de fusión o fragmentos de los mismos. Las células PER.C6 (documento WO 97/00326) fueron generadas por transfección de células de la retina embrionaria humana primarias, utilizando un plásmido que contenía las secuencias codificadoras E1A y E1B del serotipo Ad 5 (Ad5) (Ad5 nucleótidos 459 a 3510) bajo control del promotor fosfoglicerato cinasa humano (PGK). E1A y E1B son respectivamente proteína 1A y 1B de activación del gen temprano de adenovirus. Los métodos y composiciones son particularmente útiles para generar expresión estable de proteínas recombinantes humanas de interés que son modificadas postraduccionalmente, p. ej. mediante glicosilación. Varias características hacen a PER.C6 particularmente útiles como hospedador para la producción de proteínas recombinantes, tal como PER.C6 es una línea celular humana completamente caracterizada y fue desarrollada de acuerdo con buenas prácticas de laboratorio. Además, PER.C6 puede ser desarrollado como cultivo en suspensión en un medio libre de suero definido desprovisto de cualquier proteína de origen humano o animal y su desarrollo es compatible con botellas rotatorias, frascos agitadores, frascos de centrifugación y biorreactores con tiempos de duplicación de aproximadamente 35 horas. Finalmente, la presencia de E1A causa una regulación por exceso de la expresión de genes que están bajo el control del potenciador/promotor CMV y la presencia de E1B previene la apoptosis dependiente de p53 posiblemente potenciada a través de la sobreexpresión del transgén recombinante. En una realización, la célula es capaz de producir de 2 a 200 veces más proteína recombinante y/o sustancia proteica que las líneas de células de mamífero convencionales. Otra célula preferida es la célula Sp210-Ag14.

Ejemplo 8 - Terapia de un paciente con carcinoma de páncreas inoperable.

A un varón de 56 años de edad con adenocarcinoma de páncreas extendido, inoperable, pérdida de peso sustancial (30 libras de peso o más), letargo y debilidad, se le administra anticuerpo humanizado radiomarcado ⁹⁰Y-PAM4 en una dosis de 30 mCi de ⁹⁰Y y 50 mg de proteína de anticuerpo en una infusión i.v. de dos horas. Cinco días después, se administra al paciente un ciclo de quimioterapia de gemcitabina estándar. Si pocos meses después no hay ninguna evidencia de efectos secundarios de la terapia, se repite el régimen terapéutico. Durante un examen de seguimiento unas semanas más tarde, está previsto que el paciente parezca más activo y se reduzca la pérdida de peso. Se espera que el escáner de TC del páncreas sugiera una enfermedad estable o una ligera reducción de la masa tumoral. Un examen repetido unos meses más tarde debe mostrar, por tomografía computerizada, una reducción sustancial de la masa del tumor, y por lo tanto el paciente puede ser considerado para la resección de la masa del tumor de páncreas.

Ejemplo 9. Preorientación con PAM4 x 734 biespecífico y haptenos de péptido marcados con ^{99m}Tc o ¹¹¹In.

Para la obtención de imágenes del cáncer de páncreas usando un planteamiento de preorientación los autores de la presente invención prepararon un anticuerpo F(ab')₂ biespecífico (bsMAb) que consta de un Fab' de PAM4 quimérica (cPAM4) y un Fab' de 734 murino (m734). El anticuerpo m734 reconoce un complejo In-DTPA. Este bsMAb fue marcado con ¹²⁵I e inyectado (7 μ Ci; 15 μ g) en ratones desnudos atímicos que llevan un xenoinjerto de cáncer de páncreas humano (CaPan1). Un bsMAb F(ab')₂ no orientado hecho de rituximab quimérico (anticuerpo monoclonal anti-CD20) y m734, fue marcado con ¹³¹I y co-inyectado como control. En varios momentos (4, 24, 36, 48 y 72 horas después de la inyección) los ratones fueron sometidos a autopsia, se extirparon los tejidos y se hizo recuento para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g). Hubo una captación de tumor significativamente mayor de bsPAM4 en cada momento en comparación con los bsRituximab de control (p < 0,032 o

mejor). La experiencia pasada con este tipo de sistema de preorientación había sugerido que era necesario un nivel en sangre de menos del 1% ID/g para obtener buenas relaciones de tumor:no tumor. A las 36 horas después de la administración de bsPAM4 había $1,10 \pm 0,40\%$ de ID/g en la sangre, que cayó hasta $0,56 \pm 0,08\%$ de ID/g a las 48 horas de la inyección. La absorción del tumor en estos dos momentos fue $6,43 \pm 1,50\%$ de ID/g y $5,37 \pm 2,38\%$ de ID/g, respectivamente. Estos valores fueron significativamente más altos que el bsRituximab de control que tenía $0,65 \pm 0,33\%$ de ID/g y $0,47 \pm 0,19\%$ de ID/g en el tumor a las 36 y 48 horas, respectivamente ($p < 0,018$ y $p < 0,0098$). Las velocidades de aclaramiento de la sangre, sin embargo, eran muy similares y no eran significativamente distintas.

Basándose en estos datos, se realizó un experimento de pre-orientación en ratones que tienen un tumor CaPan1 en los que se inyectaron haptenos de péptido radiomarcados 40 horas después de la administración de bsMAb. Se utilizaron dos péptidos, IMP-192 y IMP-156, cada uno de los cuales contenía DTPA divalente para el reconocimiento por el MAb 734, pero uno tiene un grupo adicional específico para unir ^{99m}Tc establemente (IMP-192). A los ratones

que tienen tumor (volumen del tumor $\sim 0,30 \text{ cm}^3$) se les administró ^{125}I -bsPAM4 ($6 \mu\text{Ci}$; $15 \mu\text{g}$) seguido 40 horas más

tarde por un hapteno-péptido radiomarcado ($34,5 \mu\text{Ci}$; $1,5 \times 10^{-11}$ moles; bsMAb:péptido = 10:1). Un grupo de ratones recibió IMP192 marcado con ^{99m}Tc mientras que un segundo grupo de ratones recibió ^{111}In marcado con IMP156. Los controles para orientación no específica incluyeron dos grupos que recibieron ^{125}I -bsRituximab antes de la administración de péptido radiomarcado y otros dos grupos que recibieron péptidos marcados con ^{111}In o ^{99m}Tc solamente.

Los ratones fueron sacrificados a las 3 y a las 24 horas después de la administración de los péptidos y se determinó el % de ID/g para el tumor y diversos tejidos. En concordancia con los resultados anteriores, había bsPAM4 significativamente mayor en los tumores en comparación con el control no orientado bsRituximab, $8,2 \pm 3,4\%$ y $0,3 \pm 0,08\%$ de ID/g, respectivamente ($p < 0,0001$). Esto se tradujo en una absorción del tumor significativamente grande de ^{111}In -IMP156 ($20,2 \pm 5,5\%$ de ID/g frente a $0,9 \pm 0,1\%$ de ID/g, $p < 0,0001$). También hubo una absorción por el tumor de ^{99m}Tc -IMP192 en los ratones pre-orientados con bsPAM4 significativamente mayor que en los pre-orientados con bsRituximab ($16,8 \pm 4,8\%$ de ID/g frente a $1,1 \pm 0,2\%$ de ID/g, $p < 0,0005$). La absorción por el tumor de cada péptido, cuando se administra solo, fue significativamente menor en los ratones que recibieron bsPAM4 ($0,2 \pm 0,05\%$ de ID/g y $0,1 \pm 0,03\%$ de ID/g para ^{99m}Tc -IMP192 y ^{111}In -IMP156, $p < 0,0004$ y $p < 0,0001$, respectivamente).

Como con el tiempo de 3 horas, hubo significativamente más bsPAM4 en los tumores a las 24 horas después de la inyección de péptido (64 horas después de la administración de bsMAb) que bsRituximab ($6,4 \pm 2,2\%$ de ID/g frente a $0,2 \pm 0,09\%$ de ID/g, respectivamente; $p < 0,0001$). En este momento hubo $11,1 \pm 3,5\%$ de ID/g de ^{111}In -IMP156 y $12,9 \pm 4,2\%$ de ID/g de ^{99m}Tc -IMP192 en los tumores de los ratones pre-orientados con bsPAM4 frente a $0,5 \pm 0,2\%$ de ID/g y $0,4 \pm 0,03\%$ de ID/g en los tumores pre-orientados con bsRIT ($p < 0,0008$ y $p < 0,0002$, respectivamente). En los ratones que recibieron solo péptido, hubo significativamente menos ^{99m}Tc -IMP192 en los tumores ($0,06 \pm 0,02\%$ de ID/g, $p < 0,0007$) y ^{111}In -IMP156 ($0,09 \pm 0,02\%$ de ID/g, $p < 0,0002$) en comparación con los péptidos preorientados con bsPAM4.

Tabla 6. Relaciones tumor:no tumor en los tejidos en valores del tiempo iniciales.

Tejido	Pre-orientado con ^{111}In -péptido (3 horas)		Pre-orientado con ^{99m}Tc -péptido (3 horas)		F(ab') ₂ ^{125}I -bsPAM4 (4 horas)	
	Media	(\pm STD)	Media	(\pm STD)	Media	(\pm STD)
Tumor	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Hígado	36,7	11,74	16,66	7,19	2,34	0,61
Bazo	33,40	20,62	14,62	9,12	2,15	0,74
Riñón	7,79	2,81	8,13	3,33	1,10	0,20
Pulmón	44,55	12,99	15,75	5,85	1,58	0,37
Sangre	36,47	8,28	9,93	5,21	0,47	0,11
Médula	123,24	40,00	--	--	--	--
Médula blanca	378,00	124,57	--	--	--	--
Páncreas	155,55	30,07	73,29	32,85	4,65	1,23
Peso del tumor (g) (\pm STD)	0,189	(0,070)	0,174	(0,050)	0,179	(0,139)

La tabla anterior presenta las relaciones tumor:no tumor (T:NT) de varios tejidos para estos grupos, cada uno en un momento temprano después de la administración de producto radiomarcado. Es importante indicar que 4 horas después de la administración de bsPAM4 x m734 F(ab)₂, la relación tumor:sangre fue menor que 2:1. Sin embargo, a las 3 horas después de la administración, el ^{111}In -IMP156 y ^{99m}Tc -IMP192 preorientados tenían relaciones

5 tumor:no tumor significativamente mayores para todos los tejidos examinados y en particular las relaciones tumor:sangre eran igual a 36:1 y 9:1, ($p < 0,001$ y $p < 0,011$, respectivamente). Cuando se examinaron las relaciones tumor:sangre al tiempo de 24 horas, ^{111}In -IMP156 y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP192 preorientados tuvieron valores significativamente más altos, 274:1 y 80:1, respectivamente, frente a 4:1 para ^{125}I -bsPAM4 solo ($p < 0,0002$). Estos datos sugieren fuertemente la capacidad para utilizar este enfoque de bsPAM4 preorientado con vida media corta, radioisótopos de alta energía que después suministrarían altas dosis de radiación al tumor con dosis mínima de radiación a los tejidos no tumorales.

10 Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer varias modificaciones y variaciones en los productos, composiciones, métodos y procesos de esta invención. Así pues, se entiende que la presente invención cubre tales modificaciones y variaciones, siempre y cuando estén en el alcance de las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo monoclonal PAM4 murino (MAb) y las secuencias de una región marco (FR) y de una región constante de un anticuerpo humano, en donde las CDRs de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos SASSVSSSYLY, CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos STSNLAS, y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos HQWNRYPYT; y las CDRs de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que comprenden CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos SYVLH, CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos YINPYNDGTQYNEKFKG y CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos GFGGSYGFAY.
2. El anticuerpo humanizado o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en donde las FRs de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de dicho anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprenden al menos un aminoácido sustituido a partir de las correspondientes FRs de un MAb PAM4 murino, elegido entre el grupo formado por los restos de aminoácidos 5, 27, 30, 38, 48, 66, 67 y 69 de la región variable de la cadena pesada murina de la Fig. 1B y los restos de aminoácidos 21, 47, 59, 60, 85, 87 y 100 de la Fig. 1A.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos PAM4hV_H de la Fig. 4B y la secuencia de aminoácidos PAM4hV_K de la figura 4A.
4. Un conjugado que comprende un componente de anticuerpo que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho componente de dicho anticuerpo está unido por lo menos a un agente de diagnóstico y/o terapéutico.
5. El conjugado según la reivindicación 4, en donde dicho agente de diagnóstico se elige entre el grupo formado por un radionucleido, un agente de contraste y un agente de diagnóstico fotoactivo y en donde el conjugado se dirige a células cancerosas.
6. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de diagnóstico es un radionucleido.
7. El conjugado según la reivindicación 6, en donde dicho radionucleido tiene una energía entre 20 y 4.000 keV.
8. El conjugado según la reivindicación 6, en donde dicho radionucleido es un isótopo emisor de radiaciones alfa, gamma, beta o positrones.
9. El conjugado según la reivindicación 8, en donde dicho radionucleido es un isótopo emisor de radiación alfa, en donde dicho radionucleido tiene una energía de desintegración de 2.000 a 10.000 keV, preferiblemente de 3.000 a 8.000 keV y más preferiblemente de 4.000 a 7.000 keV.
10. El conjugado según la reivindicación 6, en donde dicho radionucleido se elige entre el grupo consistente en ¹¹⁰In, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F, ⁵²Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ^{94m}Tc, ⁹⁴Tc, ^{99m}Tc, ¹²⁰I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd, ³²P, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸Re, ⁵¹Mn, ^{52m}Mn, ⁵⁵Co, ⁷²As, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ^{82m}Rb y ⁸³Sr.
11. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de diagnóstico es un agente de contraste radiológico.
12. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de contraste es un ion paramagnético.
13. El conjugado según la reivindicación 12, en donde dicho ion paramagnético es un metal que comprende cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III).
14. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de contraste es un metal que comprende lantano (III), oro (III), plomo (II), y bismuto (III).
15. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de contraste es un agente potenciador de ultrasonido.
16. El conjugado según la reivindicación 15, en donde dicho agente de potenciación del ultrasonido es un liposoma.
17. El conjugado según la reivindicación 16, en donde dicho liposoma está lleno de gas.

18. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de contraste es un material radiopaco elegido entre el grupo que comprende compuestos de yodo, compuestos de bario, compuestos de galio y compuestos de talio.
- 5 19. El conjugado según la reivindicación 18, en donde dicho material radiopaco se elige entre el grupo que comprende diatrizoato de bario, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida meglumina, ácido iosemético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxáglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro de talio.
- 10 20. El conjugado según la reivindicación 5, en donde dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico fotoactivo.
21. El conjugado según la reivindicación 20, en donde dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto marcado fluorescente del grupo que comprende isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, allofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.
- 15 22. El conjugado según la reivindicación 20, en donde dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto de marcaje quimioluminiscente elegido entre el grupo formado por luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster oxalato.
23. El conjugado según la reivindicación 20, en donde dicho agente de diagnóstico fotoactivo es un compuesto bioluminiscente elegido entre el grupo formado por luciferina, luciferasa y aequorina.
- 20 24. El conjugado según la reivindicación 5, para su uso intraoperatorio, endoscópico o intravascular en el diagnóstico de tumores.
25. El conjugado según la reivindicación 4, en donde dicho agente terapéutico se elige entre el grupo que consiste en un radionucleído, un inmunomodulador, una hormona, un antagonista de hormona, un oligonucleótido, una enzima, un inhibidor de la enzima, un agente terapéutico fotoactivo, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis y una combinación de los mismos.
- 25 26. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.
27. El conjugado según la reivindicación 26, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido contra un oncogén.
28. El conjugado según la reivindicación 27, en donde dicho oncogén es bcl-2 o p53.
29. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho agente terapéutico es un agente citotóxico.
- 30 30. El conjugado según la reivindicación 29, en donde dicho agente citotóxico es un fármaco o una toxina.
31. El conjugado según la reivindicación 30, en donde dicho fármaco posee la propiedad farmacéutica elegida entre el grupo que consiste en antimetabólico, alquilante, antimetabolito, antiangiogénico, apoptótico, agentes alcaloides y antibióticos y combinaciones de las mismas.
- 35 32. El conjugado según la reivindicación 30, en donde dicho fármaco se elige entre el grupo que consiste en mostazas nitrogenadas, gemcitabina, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas, triazinas, análogos del ácido fólico, antraciclina, taxanos, SN-38, inhibidores COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antibióticos, enzimas, inhibidores de enzimas, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, alcaloides de la vinca, ureas sustituidas, derivados de metil hidrazina, supresores adrenocorticales, antagonistas de hormonas, endostatina, taxoles, camptotecinas, doxorubicinas y sus análogos, antimetabolitos, agentes alquilantes, antimetabólicos, agentes antiangiogénicos apoptóticos, metotrexato, CPT-11 y una combinación de los mismos.
- 40 33. El conjugado según la reivindicación 30, en donde dicha toxina se deriva de una fuente elegida entre el grupo formado por un animal, una planta y una fuente microbiana.
- 45 34. El conjugado según la reivindicación 30, en donde dicha toxina es elegida entre el grupo formado por ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A *estafilocócica*, proteína antiviral de la hierba carmín, gelonina, toxina de la difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.
35. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho agente terapéutico es un inmunomodulador.
- 50 36. El conjugado según la reivindicación 35, en donde dicho inmunomodulador se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfotóxina, un factor hematopoyético, un factor estimulador de colonias (CSF), un interferón (IFN), un factor de crecimiento de células madre, eritropoyetina, trombotopoyetina y una combinación de los mismos.

37. El conjugado según la reivindicación 36, en donde dicha linfotóxina es el factor de necrosis tumoral (TNF), dicho factor hematopoyético es una interleucina (IL), dicho factor estimulador de colonias es el factor estimulador de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), dicho interferón es interferón α , β o γ y dicho factor de crecimiento de células madre es el factor S 1.
- 5 38. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde dicho inmunomodulador comprende IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, interferón- γ , TNF- α o una combinación de los mismos.
39. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho agente terapéutico es un radionucleido.
40. El conjugado según la reivindicación 39, en donde dicho radionucleido tiene una energía entre 60 y 700 keV.
- 10 41. El conjugado según la reivindicación 39, en donde dicho radionucleido se elige entre el grupo que consiste en ^{32}P , ^{33}P , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{61}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{155}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{223}Ra y ^{225}Ac y combinaciones de los mismos.
42. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho agente terapéutico es un agente terapéutico fotoactivo.
- 15 43. El conjugado según la reivindicación 42, en donde dicho agente fotoactivo se elige entre el grupo que consiste en cromógenos y colorantes.
44. El conjugado según la reivindicación 25, en donde dicho agente terapéutico es una enzima.
45. El conjugado según la reivindicación 44, en donde dicha enzima se elige entre el grupo que comprende malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.
- 20 46. Un anticuerpo multivalente, multiespecífico compuesto por al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 47. El anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 46, que comprende además un agente de diagnóstico o terapéutico.
48. Una proteína de fusión de anticuerpo que comprende al menos dos anticuerpos o fragmentos de los mismos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
49. Una proteína de fusión de anticuerpo que comprende al menos un primer anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un segundo MAb o fragmento del mismo en donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo no es un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 50. La proteína de fusión de anticuerpo según la reivindicación 49, en donde el segundo MAb se une a un antígeno asociado a un carcinoma.
- 35 51. La proteína de fusión de anticuerpo según la reivindicación 50, en donde dicho segundo MAb se une a un antígeno de cáncer de páncreas.
52. La proteína de fusión de anticuerpo según la reivindicación 50, en donde dicho segundo MAb se elige entre el grupo formado por CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA, aLe^a, anticuerpos definidos por el antígeno de Lewis Le(y), CSAP, MUC2, MUC3, MUC4, TAG-72, EGFR, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tenascina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-6, CD40, factores de angiogénesis, VEGF, productos de oncogenes y HER2/neu.
- 40 53. La proteína de fusión de anticuerpo según la reivindicación 48, en donde dicha proteína de fusión comprende además al menos un agente de diagnóstico o terapéutico.
54. La proteína de fusión de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 53, en donde dicha proteína de fusión de anticuerpo comprende al menos dos anticuerpos monoclonales según las reivindicaciones 1 a 3.
- 45 55. Una secuencia de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un MAb o un fragmento del mismo elegido entre el grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, que es un anticuerpo monoclonal; y

(b) una proteína de fusión de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 52 y 54.

56. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN según la reivindicación 55.

5 57. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ADN según la reivindicación 55.

58. El uso de un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un anticuerpo multivalente multiespecífico según la reivindicación 46, un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 45 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 54, en la preparación de un agente para el tratamiento o diagnóstico de cáncer.

10 59. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo multivalente multiespecífico según la reivindicación 46, el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 45 o la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 54, para su uso en un método para el suministro de un agente de diagnóstico o terapéutico o una combinación de los mismos, a una diana.

15 60. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo multiespecífico multivalente según la reivindicación 46, el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 45 o la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 54, para su uso en un método para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer.

20 61. El uso según la reivindicación 58 y el anticuerpo o fragmento del mismo, el anticuerpo multiespecífico multivalente, el conjugado y la proteína de fusión según la reivindicación 60, en la que el cáncer es cáncer de páncreas.

62. Un método de diagnóstico de un tumor maligno en un sujeto, que comprende realizar un análisis diagnóstico *in vitro* en una muestra de dicho sujeto con una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

63. El método según la reivindicación 62, en donde el tumor maligno es cáncer de páncreas.

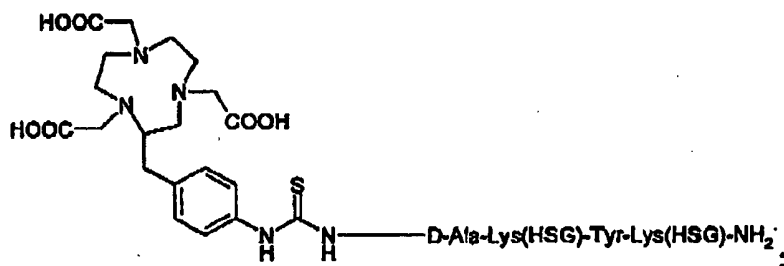
25 64. El uso de una proteína de fusión de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 54, en donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo se une específicamente a un conjugado orientable; y un conjugado orientable en la fabricación de un preparado para ser usado en identificar intraoperatoriamente el cáncer de páncreas y en donde el conjugado orientable se elige entre el grupo que consiste en

(i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

30 (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

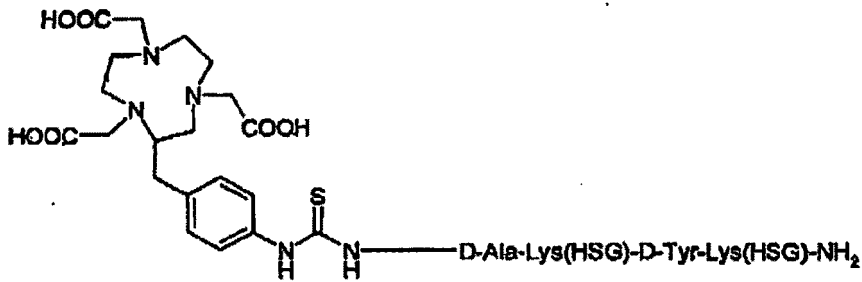
(iii) Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂

(iv)



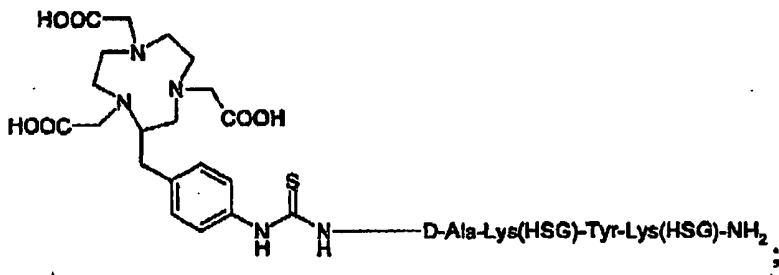
y

35 (v)



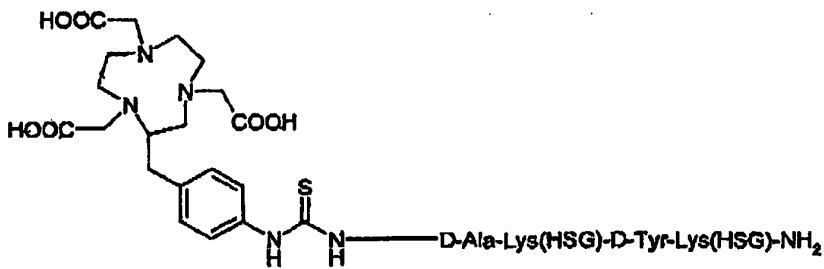
65. La proteína de fusión de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 54, en donde dicho segundo MAb o fragmento del mismo se une específicamente a un conjugado orientable; y un conjugado orientable para su uso en la fabricación de un preparado para ser usado en identificar intraoperatoriamente el cáncer de páncreas, o para ser usado para identificar intraoperatoriamente el cáncer de páncreas, y en donde el conjugado orientable se elige entre el grupo que consiste en:

- (i) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂
- (ii) DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂
- 10 (iv)



y

- (v)



15

66. La proteína de fusión de anticuerpo y el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 64 y 65, en donde el método de identificación es detección endoscópica.

PAM4 V_k

1 G A T A T T G T G A T G A C C C A G T C T C C A G C A A T C A T G T C T G C A T C T C C T G G G A G A A G G T C A C C A T G A C C T G C A G T G C C A G C T C A A G T G T A A G T 90
 10 20 27 A
 D I V M T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S
 CDR1

30 T C C A G C T A C T T G T A C T G G T A C C A G C A G A G C C A G G A T C C T C C C C A A A C T C T G G A T T T A T A G C A C A T C C A A C C T G G C T T C T G G A G T C C C T 180
 40 50
 S S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P
 CDR2

60 G C T C G C T C A G T G G C A G T G G G T C T G G G A C C T T T A C T C T C A C A A T C A G C A G C A T G G A G S C T G A A G A T G C T G C T T A T T T C T G C C A T 270
 70 80
 A R F S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A S Y F C H

90 C A G T G G A T A G G T A C C C G T A C A C G T T C G G A G G G G G A C C A A G C T G G A A A T A A A A 324
 100 107
 Q W N R Y P Y T F G G G T K L E I K
 CDR3

Figura 1A. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de VK PAM4 murino

PAM4 V_H

GAGGTTGAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCCT 90
 1 10 20 30
 E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F P

AGCTATGTTTGCACTGGTGAAGCAGAAAGCCCTGGCAGGGCCCTGAGTGGATTGGATATATAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTAC 180
 40 50 52 A
S Y V L H W V K Q K P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T Q Y
 CDR1 CDR2

AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGCCACACTGACTTCAGACAAATCGTCCAGCACAGCCCTACATGGAGCTCAGCCCGCTGACCTCTGAGGAC 270
 60 70 80 82 A B C
N E K F K G A T L T S D K S S T A Y M E L S R L T S E D

TCTGGGTCTATTACTGTGCAAGAGGCTTCGGTGGTAGCTACGGATTGCTTACTGGGGCCCAAGGGACTCTGATCACCTGTCTCTGCA 357
 90 100 A B 110 113
S A V Y Y C A R G F G G S Y G F A Y W G Q G T L I T V S A
 CDR3

Figura 1B. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de V_H PAM4 murino

Figura 2A. **cPAM4V_K**

1 DIQLTQSPA20IMSASPEKVTMTCSASSSVSSSYLYWYQ30PKLWIY40
50 **STSNLASGVPARFSGSGT**70**SYSLTISSMEAE**80**DAASYFCHQWNRYPYTFG**90
100 108
 GGTKLEIKR

Figura 2B . **cPAM4V_H**

1 QVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFPPSYVLHWVKQ30KPKGGGLEWIGY40
50 52 A 60 70 80 82 A B C 90
INPYNDGTQYNEKFKGKATLTS70**DKSSSTAYMELSR**80**LTSEDSAVYYCARGF**90
100 A B 110 113
GGSYGFAYWGQGLITVSS
100 108 113
 CDR3

	1	10	20	27 A	30	
Walker V _K	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTITC	RASQ	-SISNYLS	WYQQK	
PAM4 V _K	••V•••••	AIM•••P•EK•M•••	S••SSVS•S••Y•••••			
hPAM4 V _K	•••L•••••	••••••••••M•••	S••SSVS•S••Y•••••			
	40	50	60	70		
Walker V _K	PGKAPKLLIY	AASSLQ	GVTSRFSGSGTDF	LTISLQ		
PAM4 V _K	••SS•••W••	ST•N•A•	••PA•••••	••SYS••••ME		
hPAM4 V _K	•••••••W••	ST•N•A•	••PA•••••	••••••••••		
	80	90	100	108		
Walker V _K	PEDSATYYC	QSYSTLIT	FGQGRLEIK-			
PAM4 V _K	A•A•S•F•	H•WNRYPY•	••G•K••••-			
hPAM4 V _K	•••••S•F•	H•WNRYPY•	••G•••••• <u>R</u>			

Figura 3A. Secuencias de aminoácidos de V_K de Walker, V_K de PAM4 y V_K de PAM4 humanizado

PvuII
 1 GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTSTAAGT 90
 10 20 27 A
 D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V T M T C S A S S S V S
 CDR1
 30 TCCAGCTACTTGTACTGATACCAACAGAAACCCAGGAAAGCCCAACTCTGGATTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT 180
 40 50
 S S Y L Y W, Y Q Q K P G K A P K L W I Y S T S N L A S G V P
 CDR2
 60 GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCCAACCTGAAGATTCTGCCCTCTTATTCTGCCAT 270
 70 80
 A R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D S A S Y F C H
 BglII/BclI
 90 CAGTGGAAATAGGTACCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACACGACTGGAGATCRAACGA 327
 100 108
 Q W N R Y P Y T F G G G T R L E I K R
 CDR3

Figura 4A. Secuencias de nucleótidos de V_K de hPAM4

PstI
 CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCCTCCTGCGAGGCTTCTGGATACACATTCCT 90
 1 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G A S V K V S C E A S G Y T F P 30
 20
 AGCTATGTTTGCACCTGGTGAAGCAGGCCCCCTGGACAAGGCTTGAGTGGATTGGATAATTAATCCCTTACAATGATGGTACTCAGTAC 180
 40 50 52 A
S Y V L H W V K Q A P G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T Q Y
 CDR1 CDR2
 AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCAGGGACCGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC 270
 60 70 80 82 A B C
N E K F K G A T L T R D T S I N T A Y M E L S R L R S D D
 BstEII
 ACGGCCGTATTACTGTGCAAGAGGCTTCGGGTGTAGCTACGGATTGCTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCCGCTCCTCA 357
 90 100 A B 110 103
T A V Y Y C A R G F G C S Y G F A Y W G Q G T L V T V S S
 CDR3

Figura 4B. Secuencia de nucleótidos de VH hPAM4

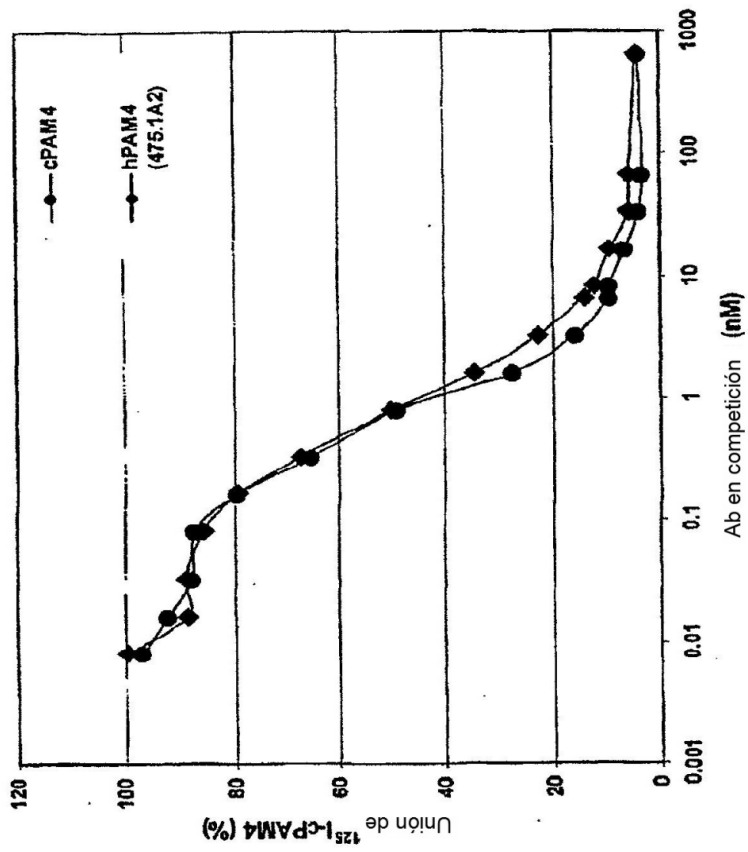


Figura 5. Actividad de unión de PAM4 humanizado y PAM4 quimérico