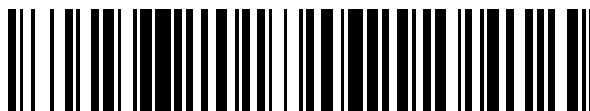


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 126**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2005** **E 05852484 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 1819359**

54 Título: **Inmunoconjugados anti integrina, métodos para su producción y su uso**

30 Prioridad:

09.12.2004 US 634445 P

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

26.06.2015

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

CHEN, QIMING;
TRIKHA, MOHIT;
LUTZ, ROBERT J.;
STEEVES, RITA M. y
AMPHLETT, GODFREY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 539 126 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).

Inmunconjugados anti-integrina, métodos para su producción y su uso**Descripción****5 Campo de la invención**

La invención se refiere a conjugados de anticuerpos específicos contra tumores con compuestos citotóxicos. Los conjugados preferentes contienen compuestos de maitansinoide unidos a un anticuerpo anti-integrina mediante un enlace disulfuro.

10

Antecedentes de la invención

15

20

Se han realizado numerosos intentos para mejorar la eficacia de los medicamentos antineoplásicos conjugando tales fármacos con anticuerpos monoclonales (AcMo) contra antígenos asociados a tumores a fin de elevar la concentración local del fármaco mediante la administración dirigida al tumor. A la inversa, el potencial de los anticuerpos para destruir realmente las células tumorales está limitado a aquellos anticuerpos dirigidos al bloqueo de estímulos proliferativos, tales como los factores de crecimiento EGF y Her-2 mediante el bloqueo de la unión del ligando a los receptores o el bloqueo de la señalización de los receptores (ErbB1 y ErbB2) o aquellos que inducen funciones efectoras (ADCC o CDC). Por lo tanto, se ha buscado un producto que combine la especificidad de un AcMo con el potencial destructor de un veneno metabólico. Los ejemplos de los primeros son el AcMo BR96 conjugado a doxorubicina (Braslowsky, *et al.* Cancer Immunol Immunother 33:367-374, 1991) y la exotoxina de *Pseudomonas* fusionada a fragmentos o anticuerpos contra el factor de crecimiento (Kreiment, *et al.*, Internal Immunopharm 14(3):465-72, 1992).

25

30

Estos intentos se han encontrado con limitaciones imprevistas, tales como el requisito de unas concentraciones intracelulares relativamente altas de la toxina en comparación con el número de sitios de unión externos por célula. Si se estima que el número de antígenos asociados a tumores en la superficie de las células cancerosas es de 10^5 moléculas/célula, los agentes citotóxicos que pueden utilizarse de manera eficaz en estos conjugados deben tener un valor de Cl_{50} de 10^{-10} - 10^{-11} M contra las células cancerosas diana. (Chari, R.V.J. Adv. Drug Delivery Rev. 1998, 31, 89-104). En segundo lugar, el fármaco debe ser liberado tras la unión a la diana y penetrar en la célula o todo el constructo debe ser transportado al interior de la célula y la toxina ser escindida o activada allí de otra manera.

35

Algunos de estos inconvenientes pueden resolverse en mayor o menor medida utilizando un fármaco muy potente conjugado a un anticuerpo de internalización y utilizando un enlace químico que tenga una labilidad potenciada en condiciones intracelulares. Chari *et al.* (Cancer Res 52:127-131, 1992; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 93: 8618-8623, 1996; patente de EE.UU. Nº 5.208.020) desarrollaron conjugados de anticuerpo en los que el anticuerpo está unido a un maitansinoide a través de un enlace disulfuro.

40

45

Los maitansinoides son antifúngicos y antitumorales derivados de plantas. S.M. Kupchan *et al.* informaron por primera vez acerca del aislamiento de tres ansamacrólidos de extractos etanólicos de *Maytenus ovatus* y *Maytenus buchananii* y es el objeto de la patente de EE.UU. Nº 3.896.111, junto con la demostración de sus efectos antileucémicos en modelos murinos en el margen posológico de microgramos/kg. Sin embargo, los maitansinoides tienen una toxicidad inaceptable, provocando neuropatías centrales y periféricas, y efectos secundarios: particularmente náuseas, vómitos, diarrea, elevaciones de las pruebas de función hepática y, con menor frecuencia, debilidad y letargo. Por lo tanto, ha sido un foco de investigación durante algún tiempo encontrar el resto de direccionamiento correcto junto con un proceso químico adecuado para conformar un conjugado de maitansina-anticuerpo con una semivida de degradación aceptable.

50

55

A diferencia de la elevada citotoxicidad del maitansinoide libre, un conjugado de anticuerpo tiene una toxicidad que es varios órdenes de magnitud menor en células negativas para el antígeno en comparación con las células positivas para el antígeno. El enlace mediante unión disulfuro tiene la ventaja de que estos enlaces son escindidos fácilmente en el interior de las células diana por el glutatión intracelular, liberando el fármaco libre altamente tóxico. Este enfoque ha sido aplicado a anticuerpos contra antígenos asociados a tumores, por ejemplo, el conjugado C242-DM1 (Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 93:8618-8623, 1996) y HuN901-DM1 (Chari *et al.*, 2000). Sin embargo, la aplicación de estos conjugados está restringida debido a la expresión limitada de los respectivos antígenos diana.

60

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de mejorar este enfoque utilizando anticuerpos dirigidos contra los antígenos asociados a tumores más altamente expresados, y, opcionalmente, antígenos altamente expresados durante las etapas proliferativa y metastásica de la malignidad, permitiendo así una concentración natural de toxina contra las células más virulentas.

65

Anticuerpos monoclonales anti-integrina

Existen pruebas considerables de que el crecimiento progresivo del tumor depende de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para proporcionar a los tumores nutrientes y oxígeno, para llevar los productos de desecho y actuar como conductos para la metástasis de las células tumorales a sitios distantes (Gastl *et al.*, Onco1.54: 177-184). Estudios recientes han definido adicionalmente las funciones de las integrinas en el proceso de angiogénesis. Durante la angiogénesis, varias integrinas que se expresan en la superficie de las células endoteliales activadas regulan las interacciones de adhesión fundamentales con diversas proteínas ECM para regular eventos biológicos distintos tales como la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Específicamente, las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, estrechamente relacionadas pero distintas, han demostrado mediar vías independientes en el proceso de angiogénesis. Un anticuerpo generado contra $\alpha V\beta 3$ bloqueaba la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento del fibroblasto básico (bFGF), mientras que un anticuerpo específico contra $\alpha V\beta 5$ inhibía la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Eliceiri, *et al.*, J. Clin. Invest. 103:1227-1230 (1999); Friedlander *et al.*, Science 270: 1500-1502 (1995)). Por lo tanto, las integrinas y especialmente las integrinas que contienen la subunidad alfa V, son objetivos terapéuticos razonables para enfermedades que implican angiogénesis tales como la enfermedad del ojo y la enfermedad neoplásica, el remodelado tisular tal como la restenosis, y la proliferación de determinados tipos de células, particularmente carcinomas de células epiteliales y de células escamosas. Se ha descrito CNTO 95, un anticuerpo monoclonal totalmente humano que inhibe las integrinas alfa V (Tripathi, *et al.* Int J. Cancer 110 (3): 326-335 (2004)).

Conjugados de anticuerpo-fármaco

Se han descrito conjugados de agentes de unión celular con la maitansina altamente citotóxica (patentes de EE.UU. N° 5.208.020 y 5.416.064; R.V.J. Chari *et al.*, 1992 Cancer Res. 52:127-131). Se han desarrollado determinados reactivos o reaccionantes tales como ésteres de N-hidroxisuccinimidil (NHS) para la reacción con grupos amino de proteínas para su uso en la formación de conjugados fármaco-proteína. Los reactivos de este tipo han sido descritos en general por Carlsson *et al.* (Biochem J. 173: 723, 1978 y en la patente de EE.UU. N° 4.149.003). En el documento WO2004/016801 se describen reactivos conectores de nitro-piridilo para la conjugación de la maitansina con los AcMo y otras proteínas.

En los procesos anteriormente referenciados, los agentes de unión celular se modifican con un agente bifuncional tal como N-Succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) para introducir un resto disulfuro activo. La reacción con un fármaco citotóxico que contiene tiol proporciona un conjugado en el que el agente de unión celular, tal como un anticuerpo monoclonal, y el fármaco se unen a través de enlaces disulfuro. Se descubrió que la posición hidroxilo C-3 podía modificarse sin pérdida de actividad, de hecho, se descubrió que determinados ésteres tenían una actividad destructora de células potenciada (para una revisión véase Cassady, *et al.* Chem Pharm Bull 52(1): 1-26, 2004). Las patentes de EE.UU. N° 5.208.020 y 5.416.064 instruyen específicamente sobre el uso del éster de maitansol de N-metil-N-(3-metilditiopropanoil)-L-alanina activado. El resto maitansol de esta reacción, y que se libera tras la escisión reductora del enlace disulfuro, se ha denominado DM1 [N^2 -desacetil- N^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, CAS Reg. N° 139504-50-0]. Por lo tanto, todos los conjugados preparados utilizando la forma metilditiolada de DM1 conservan un carbono del metileno no sustituido adyacente al enlace disulfuro en el lado del fármaco del conjugado (Fig. 1).

A fin de potenciar la estabilidad *in vivo* de este enlace disulfuro, es importante proporcionar enlaces disulfuro estéricamente impedidos como se ha indicado anteriormente (Thorpe *et al.* Cancer Research. 47:5924-31,1987). Este objetivo puede alcanzarse utilizando agentes de entrecruzamiento que porten uno o dos sustituyentes metilo en el átomo de carbono adyacente al enlace disulfuro o utilizando fármacos activados portadores de al menos un sustituyente en el átomo de carbono alfa adyacente al sustituyente disulfuro o sulfhidrilo.

Se han descrito conjugados anticuerpo-morfolinodoxorrubicina para la inmunoterapia específica del melanoma humano (Mueller, *et al.* Bioconjugate Chemistry 1 (5):325-330 (1990)). En el documento WO 00/64480 se describe un anticuerpo anti-integrina alfa V que comprende un agente quimioterapéutico citotóxico adicional.

En el documento EP-A-0425235 se describen derivados de maitansinoide conjugados a varios anticuerpos monoclonales mediante enlace disulfuro.

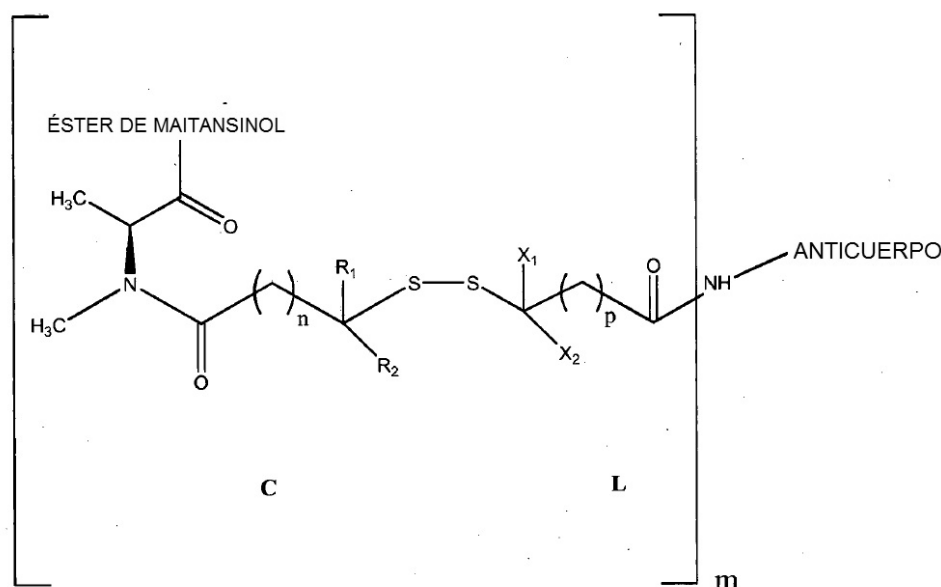
Si bien los problemas de la administración dirigida están claramente reconocidos en la actualidad, la búsqueda de una combinación adecuada de especificidad y afinidad del anticuerpo, química de conjugación y toxina es impredecible. Es el objeto de la presente invención proporcionar conjugados de maitansina-anticuerpo novedosos en los que el anticuerpo se dirija contra los antígenos de superficie celular en número suficiente para suministrar una dosis citocida de un maitansinoide y el conjugado tenga una estabilidad química y biológica apropiada para proporcionar una velocidad de liberación terapéuticamente eficaz cuando se administra a un sujeto.

RESUMEN DE LA INVENCION

Es el objeto de la presente invención proporcionar conjugados de maitansina-anticuerpo novedosos en los que el anticuerpo se dirija contra los antígenos de superficie celular en número suficiente para suministrar una dosis

citocida de un maitansinoide y en los que se sabe que el anticuerpo es internalizado por la célula después de unirse al antígeno diana.

La presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende: un anticuerpo que se une a una subunidad alfaV de un receptor integrina humano heterodimérico conjugado a un agente citotóxico con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una línea celular de cáncer que expresa integrina alfaV, de fórmula:



en la que el anticuerpo es un anticuerpo específico contra la subunidad de integrina alfaV humana, en la que dicho anticuerpo es capaz de ser internalizado por la célula que expresa dicha subunidad alfaV; en la que el maitansinol está esterificado en C-3; R_1 , R_2 , X_1 y X_2 son independientemente H, Me, C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un resto arilo heterocíclico, o un resto heterocicloalquilo; n es 1 - 5; p es 1 - 5; y m es de 1 a 10, y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo.

La invención también proporciona un método de producción de un conjugado de la invención, que comprende las etapas: (a) introducir uno o más grupos tiol libres o protegidos en una molécula de anticuerpo que se une a una subunidad alfaV de un receptor integrina humano heterodimérico; (b) hacer reaccionar la molécula de anticuerpo de la etapa (a) con un compuesto que es un agente citotóxico con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos, teniendo dicho compuesto uno o más grupos tiol o disulfuro; y (c) recuperar el conjugado resultante, en el que el compuesto tóxico es un maitansinoide.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la invención y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un conjugado de la invención para uso en medicina, preferentemente para uso en el tratamiento del cáncer.

La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende la composición de conjugado de la invención y un recipiente, y que comprende adicionalmente un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede utilizarse para tratar una enfermedad caracterizada por células que expresan integrina con subunidad alfaV.

En una forma de realización específica, los conjugados descritos en el presente documento comprenden un enlace disulfuro que se ha diseñado mediante la sustitución de los carbonos de metileno adyacentes para proporcionar una velocidad de liberación terapéuticamente eficaz cuando se administra a un sujeto. En una forma de realización específica, un conjugado de anticuerpo-fármaco comprende: un anticuerpo que se une a la subunidad de integrina alfaV humana conjugada a un agente citotóxico con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una línea celular de cáncer que expresa integrina alfa V. En esta forma de realización, los anticuerpos son específicos para al menos una subunidad alfaV de un receptor integrina heterodimérico, tal como una proteína integrina heterodimérica alfaVbeta1, alfaVbeta3, alfaVbeta5, alfaVbeta6 o alfaVbeta8 o fragmento de la misma. Los conjugados preferentes contienen compuestos de

maitansinoide unidos al anticuerpo mediante un enlace disulfuro y el anticuerpo es capaz de unirse a vitronectina y a fibrinógeno.

Los conjugados de anticuerpo pueden representarse mediante la fórmula



en la que A es un anticuerpo específico contra la subunidad de integrina alfaV humana, en la que dicho anticuerpo es capaz de ser internalizado por la célula que expresa dicha subunidad alfaV; C es una citotoxina con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos; y L es un grupo de unión que une el anticuerpo y la citotoxina, y que comprende adicionalmente un enlace escindible por los componentes del entorno intracelular; y m representa el número medio de moléculas de citotoxina unidas al anticuerpo y es un número entero de 1-10, específicamente de 3-4. La citotoxina puede estar seleccionada del grupo que consiste en maitansinoides, calicheamicinas, epotilonas, discodermolida, eleuterobinas, dolastatinas, criptoficinas, camptotecinas, rizoxina (CAS reg. N° 90996546), o derivados de taxano y cualquier otro compuesto que presente una mitad de la inhibición máxima (CI_{50} o GI_{50}) sobre el crecimiento de las células tumorales a 10^{-9} M o menos.

El conjugado de anticuerpo anti-integrina alfaV-maitansinoide que se describe en el presente documento comprende cualquier molécula que contiene una proteína o péptido que comprende un anticuerpo que compite por la unión a la subunidad alfa-V de un receptor integrina humano heterodimérico con el anticuerpo monoclonal CNTO 95. En una forma de realización, el anticuerpo comprende al menos una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma derivada del anticuerpo denominado CNTO 95, en combinación con una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de las mismas, que puede incorporarse en el anticuerpo con la CDR. El anticuerpo CNTO 95 que se describe en el presente documento es un anticuerpo anti-alfaV humana derivado de la inmunización de un ratón transgénico que contiene genes para la expresión de inmunoglobulinas humanas. Por lo tanto, en una forma de realización, la invención se refiere a anticuerpos que contienen al menos una región CDR o región variable derivada del anticuerpo CNTO 95. En una forma de realización preferente, el anticuerpo es CNTO 95.

El conjugado de anticuerpo-maitansinoide que se describe en el presente documento puede comprender un éster de maitansinol que es liberado tras la escisión de un enlace que une la citotoxina C, al conector L, por los componentes del entorno intracelular. En una forma de realización, el maitansinoide se esterifica en C-3, C-14, C-15 o C-20 con un aminoácido acilado en el que el grupo acilo porta un grupo sulfhidrilo protegido, en el que el átomo de carbono del grupo acilo adyacente al grupo sulfhidrilo protegido tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocicloalquilo, heterocíclico aromático, o H; y en el que el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos dos átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre. El maitansinoide puede ser un éster de 3-maitansinol y el grupo aminoácido acilado porta 0, 1 ó 2 grupos metilo en el átomo de carbono adyacente al sulfhidrilo protegido. El maitansinol esterificado puede seleccionarse de entre N^2 -desacetil- N^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1, CAS Reg N° 139504-50-0), N^2 -desacetil- N^2 -(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3) y N^2 -desacetil- N^2 -(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

En el presente documento se describen compuestos de conjugado de anticuerpo anti-integrina-maitansinoide útiles para el tratamiento de enfermedades proliferativas humanas debidas a la proliferación anormal y caracterizadas por la neovascularización. Los compuestos pueden utilizarse en un método de tratamiento del cáncer, incluido de mama, colon, rectal, de pulmón, próstata, riñón, hígado, páncreas, esófago, estómago, endometrio, ovario, cuello uterino o huesos. Los compuestos pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en la prevención o el tratamiento de cánceres primarios o la prevención o el tratamiento de la enfermedad metastásica.

Otro método se refiere al uso combinado de compuestos de conjugados de anticuerpo anti-integrina-maitansinoide con agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento del cáncer. Los conjugados pueden contener compuestos de maitansinoide unidos al anticuerpo mediante un enlace disulfuro, y los agentes quimioterapéuticos preferentes son doxorubicina, un taxano, una camptotecina, una podofilotoxina, un análogo de nucleósido o un análogo de pirimidina.

El conjugado de anticuerpo-maitansinoide puede prepararse en un proceso por el cual el anticuerpo se hace reaccionar con un reactivo conector químico biespecífico, tal como un N-succinimidil-(2-piridiltio)alcanoato, y posteriormente se hace reaccionar con un maitansinoide activado previamente con lo que se da el intercambio de disulfuro para producir un enlace disulfuro impedido entre el anticuerpo y el maitansinoide.

El conjugado de anticuerpo-maitansinoide puede prepararse utilizando un éster de maitansinol en el que el resto acilo porta un grupo sulfhidrilo protegido. El maitansinoide puede esterificarse en C-3, C-14, C-15 o C-20 con un aminoácido acilado en el que el grupo acilo porta un grupo sulfhidrilo protegido, en el que el átomo de carbono del grupo acilo adyacente al grupo sulfhidrilo protegido tiene uno o dos sustituyentes, estando dichos sustituyentes seleccionados de entre: CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o

alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un resto arilo heterocíclico, un resto heterocicloalquilo, o H; y en el que el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos dos átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre. El maitansinoide puede ser un éster de 3-maitansinol y el grupo aminoácido acilado porta 0, 1 ó 2 grupos metilo en el átomo de carbono adyacente al sulfhidrido protegido. En una forma de realización preferente, el maitansinol esterificado está seleccionado de entre N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1, CAS Reg N° 139504-50-0), N²-desacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3) y N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4). El conjugado de anticuerpo anti-integrina alfaV-maitansinoide puede prepararse mediante esencialmente una sola etapa que consiste en hacer reaccionar un maitansinoide portador de un éster reactivo con un anticuerpo anti-integrina no activado químicamente con antelación. El éster reactivo del maitansinoide puede ser un éster de N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo o 3-carboxi-4-nitrofenilo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la estructura química de las amidas de maitansina tioladas, estando indicadas las especies preferentes DM1, DM3 y DM4.

La **Figura 2** muestra las estructuras químicas y sus siglas químicas de los reactivos conectores bifuncionales preferentes de la invención.

La **Figura 3** es un esquema que muestra el método sintético de preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide de la invención.

La **Figura 4** es un gráfico que muestra el volumen del cambio a lo largo del tiempo de un tumor de melanoma humano en ratones desnudos y el efecto de administrar CNTO 95. Se inocularon a los ratones, por vía subcutánea, células A375.S2 (3×10^6) y se inició la dosificación con CNTO 95 o el control tres días más tarde. Se trató a los ratones con CNTO 95 o vehículo tres veces por semana a una dosis de 10 mg/kg i.p. Cada punto de datos es el volumen tumoral medio de 10 animales portadores de tumores ($\pm$ EEM). El CNTO 95 administrado tres veces por semana inhibió significativamente el crecimiento de los tumores en comparación con los animales tratados con un control el día 26 ($P = 0,0005$).

La **Figura 5** es un gráfico que muestra el volumen del cambio a lo largo del tiempo de un tumor de melanoma humano en ratas desnudas y el efecto de administrar CNTO 95. Se inocularon a las ratas por vía subcutánea células A375.S2 (3×10^6), y se inició el tratamiento con CNTO 95 o el control tres días más tarde. Se trató a las ratas con CNTO 95 o vehículo una vez por semana a una dosis de 10 mg/kg i.v. Cada punto de datos es el volumen tumoral medio de 9 animales portadores de tumores ($\pm$ EEM).

La **Figura 6** es un gráfico que muestra el crecimiento de células de melanoma humano A375.S2 a lo largo del tiempo en ratones desnudos. Los volúmenes tumorales se expresan como media $\pm$ EEM ($n = 9$ ó 10). Las flechas indican las inyecciones de fármaco por vía intravenosa. El asterisco indica que se sacrificó a un animal no respondedor ya que su volumen tumoral era superior a 1.500 mm^3 .

La **Figura 7** es un gráfico que muestra el crecimiento de células de melanoma humano A375.S2 en ratas desnudas atímicas. El día 14, cuando los volúmenes tumorales medios alcanzaron 250 mm^3 , los animales se agruparon al azar y se les administró la primera dosis. Todos los animales se sacrificaron el día 35. Los volúmenes tumorales se expresaron como media $\pm$ EEM ($n = 9$ ó 10). Las flechas indican los días de la administración del fármaco por vía intravenosa.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal total a lo largo del tiempo en ratones portadores de tumores a los que se inyectaron el día 7 después de la implantación del tumor y nuevamente cada 7 días X5, 3 mg/kg, 6 mg/kg ó 10 mg/kg de CNTO 364; el día 7 y 14, 25 mg/kg de CNTO364 o F105-DM1, y el día 7, 14 y 35, 15 mg/kg de CNTO364.

La **Figura 9** es un gráfico que muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en los mismos animales que en la Fig. 8.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra los volúmenes tumorales individuales para todos los animales en los grupos que se han descrito en la Fig. 8.

La **Figura 11** es un gráfico de peso corporal medio $\pm$ EEM ($n = 6$) a lo largo del tiempo para las ratas desnudas portadoras de tumores de carcinoma pulmonar humano A549 subcutáneo y tratadas con CNTO 364 a 15 mg/kg o con tratamientos de control. Las flechas indican los instantes de las inyecciones de fármaco por vía intravenosa.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra el crecimiento de tumores de carcinoma pulmonar humano A549 en ratas hembra atímicas. El tratamiento con CNTO 364 (15 mg/kg) produjo la regresión de los tumores de carcinoma pulmonar humano A549 establecidos en las ratas hembra atímicas.

La **Figura 13** es un diagrama de dispersión que muestra los pesos tumorales individuales al finalizar el estudio del crecimiento de tumores de carcinoma pulmonar humano A549 en ratas hembra atímicas tratadas con 15 mg/kg de CNTO364 o sustancias de control. Las líneas horizontales indican la mediana de cada grupo de estudio.

Las **Figuras 14A y B** son gráficos que muestran el cambio en el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratas portadoras de células de tumor de colon humano HT29 y tratadas con CNTO 364 (CNTO95-SPP-DM1), CNTO 365 (CNTO95-SSNPB-DM4) y CNTO 366 (CNTO95-SSNPP-DM4). **A.** Control con PBS y anticuerpo irrelevante, F105, conjugado a las maitansinas tioladas utilizando el mismo proceso y reactivos, e inyectados los días 7 y 21, a 10 mg/kg. **B.** Control con PBS y los anticuerpos conjugados descritos inyectados a 20 mg/kg los días 7 y 21, excepto el grupo CNTO365 que recibió una única inyección el día 7.

Las **Figuras 15A y B** son gráficos que muestran el cambio medio en el peso corporal en ratas portadoras de tumores HT29 como se ha descrito en la Fig. 14.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Definiciones

A fin de que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, se definen primero determinados términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

La expresión "integrina alfaV", "integrina con subunidad alfaV" e "integrina que contiene la subunidad alfaV" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a las subunidades glicoproteicas transmembrana alfaV de un heterodímero de integrina funcional e incluyen todas las variantes, isoformas y homólogos de especie de alfaV. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden presentar, en determinados casos, una reacción cruzada con alfaV de especies distintas de la humana, u otras proteínas que están estructuralmente relacionadas con la alfaV humana (por ejemplo, los homólogos de alfaV humana). En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para la alfaV humana y no presentar reactividad cruzada entre especies o de otro tipo.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o una cadena única del mismo. Por lo tanto, el anticuerpo incluye cualquier molécula que contiene péptido o proteína que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero no limitada a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región marco (FR), o cualquier porción de las mismas, o al menos una porción de una proteína de unión, que puede incorporarse en un anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo podría ser murino, humano, humanizado o quimérico.

El "fragmento de unión al antígeno" o porción del mismo, incluye anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión al antígeno que se unen a una subunidad alfa-V de mamífero. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb en el que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite generarlos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidos como Fv monocatenarios (scFv)). Se entiende que tales anticuerpos monocatenarios también quedan abarcados dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Tales fragmentos pueden producirse mediante técnicas de recombinación, de síntesis o de escisión enzimática, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento.

El término "epítipo" se refiere a un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales

específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Las expresiones "epítopo conformacional nativo" o "epítopo proteico nativo" se utilizan indistintamente en el presente documento, e incluyen epítopos proteicos resultantes del plegamiento conformacional de la molécula integrina que surge cuando los aminoácidos de diferentes porciones de la secuencia lineal de la molécula integrina se juntan mucho en el espacio tridimensional. Tales epítopos conformacionales se distribuyen en el lado extracelular de la membrana plasmática.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de o que tienen una gran coincidencia con las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_H1, C_H2, C_H3), bisagra, (V_L, V_H)) es sustancialmente similar a la de un anticuerpo de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos se han clasificado en agrupaciones en base a sus similitudes de secuencia de aminoácidos, véase por ejemplo, <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>. Por lo tanto, utilizando una búsqueda de similitud de secuencia, puede elegirse como molde un anticuerpo con una secuencia lineal similar, para crear "anticuerpos humanizados".

La "humanización" (también llamada Remodelado o injerto de CDR) es en la actualidad una técnica bien establecida para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) a partir de fuentes xerógenas (comúnmente roedores) y para mejorar las funciones efectoras (ADCC, activación del complemento, unión a C1q). El AcMo manipulado se diseña utilizando las técnicas de biología molecular, sin embargo, el simple injerto de CDR de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de roedores en los marcos humanos suele dar como resultado la pérdida de la afinidad de unión y/o especificidad del AcMo original. A fin de humanizar un anticuerpo, el diseño del anticuerpo humanizado incluye variaciones tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos en los residuos de las CDR, y la retro-sustitución de residuos del AcMo de roedor en las regiones marco humanas (retromutaciones). Las posiciones pueden distinguirse o identificarse comparando la secuencia para el análisis estructural o analizando un modelo de homología de la estructura 3D de las regiones variables. El proceso de maduración de afinidad ha utilizado más recientemente genotecas de fagos para variar los aminoácidos en las posiciones elegidas. Del mismo modo, se han utilizado muchos enfoques para elegir los marcos humanos más apropiados en los que injertar las CDR de roedor. A medida que aumentan los conjuntos de datos de los parámetros conocidos para las estructuras de anticuerpos, también lo hace la sofisticación y el perfeccionamiento de estas técnicas. Pueden utilizarse las secuencias consenso o de línea germinal de un único anticuerpo o fragmentos de las secuencias de la región estructural dentro de cada región variable de la cadena ligera o pesada de varios AcMo humanos diferentes. Otro enfoque para la humanización es modificar únicamente los residuos superficiales de la secuencia de roedor con los residuos más comunes que se encuentran en los AcMo humanos y se ha denominado "acondicionamiento de la superficie" o "recubrimiento". Se describen secuencias de Ig humana conocidas, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.kabatdatabase.com/top.html; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.appliedbiosystems.com; www.biodesign.com; antibody.bath.ac.uk; <http://www.unizh.ch/~antibody/>; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983).

Los "anticuerpos quiméricos" son aquellos anticuerpos que conservan dominios distintos, normalmente el dominio variable, de una especie y, lo demás, de otra especie; por ejemplo quimeras ratón-humano.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada. Sin embargo, generalmente, las secuencias codificantes del anticuerpo se clonan y se insertan en una célula hospedadora o una línea celular de producción.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie de una célula de este tipo. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal como se utiliza en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, las líneas CHO o una línea celular derivada de mieloma de ratón SP/0.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos o humanizados que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implica corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN.

Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a αV está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de αV). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de αV humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especie de αV). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o material celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Por lo general, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Abreviaturas

Ac	anticuerpos, policlonal o monoclonal
αV	subunidad alfa V de integrina
$\beta 3$	subunidad beta 3 de integrina
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos básico
HUVEC	células endoteliales de vena umbilical humana
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina G
AcMo	anticuerpo monoclonal
NPB	= N-succinimidil-5-nitro-(2-piridilditio)butirato
SMCC	= succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato
SMNP	= N-succinimidil 4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato
SMPT	= 4-succinimidiloxycarbonil-(2-piridilditio)tolueno
SPDB	= N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirato
SPDP	= N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato
SPP	= N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato
SP	= N-succinimidil-4-(2-piridil)
SS	= sulfosuccinimidilo
SSNPP	= sulfosuccinimidil-N-succinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato
VEGF	= factor de crecimiento del endotelio vascular

2. Composiciones

A. CONJUGADOS DE ANTICUERPO DE LA INVENCION

Los conjugados de anticuerpo descritos en el presente documento están representados por la Fórmula



en la que A es un anticuerpo específico contra la subunidad de integrina αV humana, en el que dicho anticuerpo es capaz de ser internalizado por la célula que expresa dicha subunidad αV ; C es una citotoxina con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos; y L es el grupo de unión que se une al anticuerpo y la citotoxina y que comprende adicionalmente un enlace escindible por los componentes del entorno intracelular; y m representa el número medio de moléculas de citotoxina unidas al anticuerpo y es un número entero de 1-5, preferentemente 3-4. La citotoxina puede estar seleccionada del grupo que consiste en maitansinoides, calicheamicinas, epotilonas, discodermolida, eleuterobinas, dolastatinas, criptoficinas, camptotecinas, rizoxina (CAS reg. N° 90996546), o derivados de taxano y cualquier otro compuesto que presente una mitad de la inhibición máxima (CI_{50} o GI_{50}) sobre el crecimiento de las células tumorales a 10^{-9} M o menos.

Los conectores que comprenden enlaces escindibles intracelularmente incluyen enlaces lábiles frente a los ácidos tales como enlaces cis-aconitilo, ésteres, enlaces hidrazona sensibles al ácido, conectores peptídicos degradables por lisosomas, conectores escindibles por hidrolasa, conectores específicos de peptidasa o proteasa, y conectores disulfuro (sulfhidrilo) (para una revisión, véase Dyba, M., *et al.* 2004 *Curr Pharm Design* 10:2311-2334). Al ser capaz de escisión más rápida o selectiva en condiciones intracelulares frente a las condiciones que predominan, por ejemplo, en la circulación, el conector confiere especificidad y seguridad adicionales a la farmacodinámica global del conjugado. Los enlaces disulfuro son particularmente preferentes debido al potencial de reducción favorable dentro de los compartimentos celulares así como la activación de enzimas redox inducibles (Saito, G. *et al.* *Adv Drug Delivery Rev* 2003 55:199-215). En una forma de realización, la unión se da entre un átomo de azufre presente en la molécula de anticuerpo, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de cisteína, y otro átomo de azufre presente en el compuesto tóxico. En otra forma de realización, el resto de unión consiste en uno o más átomos o grupos químicos.

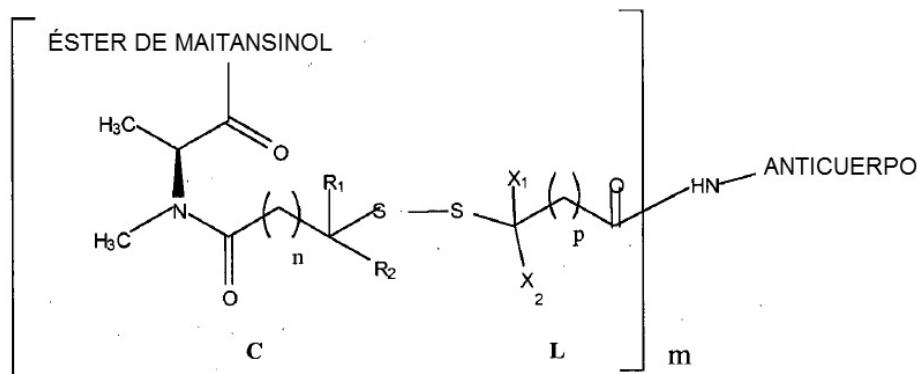
Otra consideración importante en la unión química de una molécula biológica, tal como una proteína recombinante, a un compuesto químico es que la química de derivatización puede producir, y en la mayoría de los casos lo hará, una nueva entidad molecular que puede tener propiedades biológicas hasta ahora desconocidas. Por lo tanto, debe entenderse que los productos de escisión fisiológica deben diseñarse para producir los derivados deseados con actividad biológica. Los maitansinoides de la invención que incluyen DM1, DM3, DM4 y otros que se muestran y se describen en la Fig. 1, conservan la actividad biológica.

Los conjugados de anticuerpo anti-integrina alfaV-maitansinoide se preparan mediante unión química de un anticuerpo anti-alfaV a una molécula de maitansinoide sin que disminuya significativamente la actividad biológica del anticuerpo y proporcionando un maitansinoide, que cuando se libera en condiciones fisiológicas, conserva su potencial citotóxico. Los ejemplos de maitansinoides adecuados son ésteres de maitansinol y análogos de maitansinol, incluidos pero no limitados a aquellos con un anillo aromático modificado y aquellos con modificaciones en C-19, C-20, o C-14, o C-15, o C-4,5 desoxi. Resultan preferentes los ésteres de maitansinol C-3. Los maitansinoides particularmente preferentes son derivados de ésteres de N-metil-alanina de maitansinol (N²-desacetil-maitansina). Los conjugados particularmente preferentes comprenden un enlace disulfuro, que cuando se escinde por reducción, libera un correspondiente maitansinoide portador de un tiol libre. Los maitansinoides que contienen tiol del tipo preferente se muestra en la Fig. 1: N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1, CAS Reg N° 139504-50-0), N²-desacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3) y N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

Los conjugados de las moléculas de anticuerpo de la invención y el compuesto tóxico pueden formarse utilizando cualquiera de las técnicas actualmente conocidas o que se desarrollen más adelante. Por ejemplo, el compuesto citotóxico puede modificarse para producir un grupo amino libre y a continuación unirse a la molécula de anticuerpo mediante un conector lábil frente a los ácidos o un conector fotolábil. El compuesto tóxico puede condensarse con un péptido y posteriormente unirse a una molécula de anticuerpo para producir un conector lábil frente a las peptidasas. El compuesto tóxico puede tratarse para producir un grupo hidroxilo primario, que puede succinilarse y unirse a una molécula de anticuerpo para producir un conjugado que puede ser escindido por las esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre.

A fin de crear el enlace disulfuro entre el anticuerpo A y la citotoxina C, preferentemente, se trata el compuesto tóxico para crear un grupo tiol libre o protegido, y a continuación, uno o muchos compuestos tóxicos que contienen disulfuro o tiol se unen covalentemente a la molécula de anticuerpo a través de enlace(s) disulfuro. El enlace disulfuro no tiene por qué formarse directamente con un tiol libre del anticuerpo, pero puede formarse por derivatización de cualquier grupo reactivo dentro del anticuerpo para introducir un sitio de intercambio de disulfuro, por ejemplo, como mediante acoplamiento de un conector bifuncional a grupos amina libres en el anticuerpo. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo pueden modificarse con reactivos de entrecruzamiento tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-succinimidil-oxicarbonil- α -metil α -(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-butirato (SDPB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-5-(2-piridilditio)pentanoato, 2-iminotiolano (IT) o anhídrido acetilsuccínico mediante métodos conocidos.

Los conjugados de anticuerpo anti-integrina alfaV-citotoxina de la invención están por lo tanto representados por la fórmula II, en la que el maitansinol está esterificado en C-3, y el anticuerpo es un anticuerpo contra la subunidad de integrina alfaV; R₁, R₂, X₁ y X₂ son independientemente H, Me, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un resto arilo heterocíclico, o un resto heterocicloalquilo; n es 1 - 5; y m es 1 a 10.



II

En una forma de realización preferente, el resto conector es un 4-tiopentanoato derivado de SPP, o 4-tiopentanoato. La molécula de anticuerpo que contiene grupos tioles libres o protegidos así derivada, se hace reaccionar a continuación con un compuesto tóxico que contiene disulfuro o tior para producir los conjugados. Los conjugados pueden purificarse mediante HPLC o mediante filtración en gel.

B. ANTICUERPOS DE LA INVENCION ANTI-SUBUNIDAD ALFA-V

Además de unirse a alfaV, los anticuerpos humanos o fragmentos de unión al antígeno o porciones de los mismos como los descritos anteriormente pueden seleccionarse por su conservación de otras propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como:

- 1) unirse a células vivas que expresan alfaV humana;
- 2) evitar que las células vivas se unan a las proteínas de la matriz;
- 3) unirse a alfaV humana con una K_D de 10^{-8} M o menos (por ejemplo, 10^{-9} M o 10^{-10} M o menos);
- 4) presentar unión independiente de calcio a alfaV;
- 5) unirse a un epítipo único en alfaV o pertenecer a un grupo de complementación único de anticuerpos que se unen a alfaV;
- 6) inhibir la angiogénesis *in vitro* o *in vivo*; o
- 7) reducir la masa tumoral o prevenir el crecimiento tumoral *in vivo*.

En otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-alfa V humana de la invención, CNTO 95, se utilizan para crear anticuerpos anti-alfa V humana estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a alfaV. Más específicamente, pueden combinarse una o más regiones CDR de CNTO 95 de manera recombinante con CDR y regiones marco humanas conocidas para crear anticuerpos anti-alfa V humana modificados por recombinación adicionales de la invención.

En una forma de realización preferente, el anticuerpo para su uso en los conjugados de anticuerpo anti-alfaV descritos en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa V humana derivado de la inmunización de un ratón transgénico que contiene genes para la expresión de inmunoglobulinas humanas. La preparación del anticuerpo se describe detalladamente en la publicación PCT N° WO 02/12501 y en la publicación de EE.UU. N° 2003/040044. El anticuerpo incluye cualquier molécula que contiene péptido o proteína que comprende al menos una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma derivada del anticuerpo denominado "CNTO 95" (véase la publicación PCT N° WO 02/12501 y la publicación de EE.UU. N° 2003/040044), en combinación con una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de las mismas, que puede incorporarse en un anticuerpo.

Preferentemente, las CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos manipulados descritos anteriormente comprenden exactamente la(s) misma(s) secuencia(s) de aminoácidos que las de los AcMo totalmente humanos denominados

CNTO 95, Gen0101, CNTO 95, C371A generados por inmunización de un ratón transgénico como se describe en el presente documento. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que puede ser posible cierta desviación de las secuencias de CDR exactas del CNTO 95 conservando al mismo tiempo la capacidad del anticuerpo para unirse de manera eficaz a alfa V (por ejemplo, sustituciones conservadoras). En una forma de realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3). En otra forma de realización particular, el anticuerpo o variante o porción de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6) de la cadena ligera de CNTO95. En una forma de realización preferente, las tres CDR de la cadena pesada y las tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tienen la secuencia de aminoácidos de la correspondiente CDR del AcMo CNTO 95. Por consiguiente, en otra forma de realización, el anticuerpo manipulado puede estar compuesto por una o más CDR que son, por ejemplo, un 90%, 95%, 98% ó 99,5% idénticas a una o más CDR de CNTO 95. Los anticuerpos contra la subunidad alfa-V de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, al menos una porción, secuencia o combinación seleccionada de 5 a todos los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Un anticuerpo contra la subunidad alfa-V puede comprender adicionalmente de manera opcional un polipéptido de al menos uno del 70%-100% de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID NO: 7, 8. Por ejemplo, puede compararse la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, o puede compararse la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de la cadena pesada con la SEQ ID NO: 7.

Tal como se describe en el presente documento, las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1-8 incluyen "modificaciones de secuencia conservadoras", es decir, modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no influyen o modifican significativamente las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en las SEQ ID NO: 1-8, o en los ácidos nucleicos que las codifican, mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-alfa V humana se reemplaza preferentemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

Al menos un anticuerpo de la invención se une a al menos un epítipo especificado específico para al menos una proteína de la subunidad alfaV, subunidad, fragmento, porción o cualquier combinación de las mismas. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región de unión al anticuerpo que comprende al menos una porción de dicha proteína, epítipo que está compuesto preferentemente por al menos una porción extracelular, soluble, hidrófila, externa o citoplásmica de dicha proteína. El al menos un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 1-3 aminoácidos hasta toda la porción especificada de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 9.

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención también se refiere a anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, cadenas de inmunoglobulina y CDR que comprenden los aminoácidos en una secuencia que es sustancialmente igual a una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento. Preferentemente, tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos que comprenden tales cadenas o CDR pueden unirse a la subunidad alfa-V humana con alta afinidad (por ejemplo, K_D inferior o igual a aproximadamente 10^{-9} M). Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a las secuencias descritas en el presente documento incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos, así como deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

Los aminoácidos en un anticuerpo contra la subunidad alfa-V de la presente invención que son esenciales para la función puede identificarse mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis mediante alanina (por ejemplo, Ausubel, *supra*, capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Este último procedimiento introduce mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula. A continuación, las moléculas mutantes resultantes se ensayan para la actividad biológica, tal como, pero sin limitarse a, al menos una actividad neutralizante de subunidad alfa-V. También pueden identificarse los sitios que son cruciales para la unión del anticuerpo mediante análisis estructural tal como la cristalización, la resonancia magnética nuclear o el marcado por fotoafinidad (Smith, *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, *et al.*, Science 255:306-312 (1992)).

3. Métodos de preparación de los conjugados

El compuesto de partida, maitansinol, tal como se utiliza en la producción de los compuestos DM1, DM3 y DM4 y maitansinoides activados relacionados (Fig. 1) según la presente invención puede prepararse a partir de maitansina, un éster C-3 natural aislado de fuentes naturales (Kupchan *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 97, 5294 (1975)) por escisión reductora. Resulta particularmente útil para esta etapa el reactivo hidruro de litio y trimetoxialuminio en tetrahidrofurano a -40°C. También pueden producirse provechosamente otros ésteres de maitansinoide naturales cultivando microorganismos, que pertenecen al género *Nocardia* (patente de EE.UU. N° 4.151.042) o *Actinosynnema spp.*, que se han manipulado para que produzcan en el caldo de cultivo maitansinol, maitanacina o ésteres de maitansinol C-3, tales como propionato de maitansinol, y extrayendo los compuestos a partir del caldo de cultivo para la purificación adicional. Hay muchos grupos de unión conocidos en la técnica para la fabricación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluidos por ejemplo grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles frente a los ácidos, grupos fotolábiles, conectores peptídicos lábiles frente a las peptidasas, o ésteres que pueden ser lábiles frente a los ácidos o escindibles por esterazas.

Tal como se instruye en la patente de EE.UU. N° 5.208.020, la esterificación del maitansinol o un análogo con los ácidos carboxílicos que contienen un grupo metilditio u otro grupo tio protegido, incluido, por ejemplo, N-metil-N- [3-(metilditio)-1-oxopropil]-L-alanina, producen los correspondientes maitansinoides que contienen disulfuro. En caso de dar como resultado dos productos diastereoméricos que contienen las cadenas laterales D-acilo y L-acilo, los ésteres de maitansinoide diastereoméricos se separan fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica y se reduce el producto isómero análogo D-alanil menos deseable para recuperar el maitansinol como se instruye en el documento WO03096782. La escisión reductora del grupo disulfuro con ditiotreitól da el correspondiente maitansinoide que contiene tiol, que se une fácilmente a través de enlaces disulfuro o tioéter a agentes de unión celular. Los maitansinoides con tiol pueden purificarse mediante HPLC utilizando una columna C18 en modo de fase inversa eluyendo con un gradiente de agua-acetonitrilo.

Reactivos de acoplamiento bifuncionales. Se conoce en la preparación de conjugados de dos sustancias, de las cuales al menos una comprende una proteína o un polipéptido, el uso de agentes bifuncionales a fin de acoplar los componentes del conjugado de forma covalente, utilizándose normalmente grupos amino en las moléculas conjugadas para la reacción de conjugación. Los agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales incluyen N-succinimidil-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres tal como adipimidato de dimetilo•HCl, ésteres activos tal como suberato de disuccinimidilo, aldehídos tal como glutaraldehído, compuestos bis-azido tal como bis(p-axidobenzoi)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio tal como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina, diisocianatos (tal como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno. El SPDP se encuentra entre los reactivos más frecuentemente utilizados con este fin, y muchos otros ácidos alcanos N-succinimidil-(2-piridilditio), N-succinimidil-(5-nitro-2-piridilditio) o N-succinimidil-(4-piridilditio) de cadena corta han demostrado su utilidad. La Fig. 2 muestra las estructuras de los conectores bifuncionales comúnmente utilizados y sus acrónimos.

Conjugación de anticuerpo activado a maitansinoide tiolado. La preparación de conjugados de CNTO 95-maitansinoide siguió el método descrito anteriormente (Chari *et al.*, Cancer Res. 52: 127-131, 1992 y la patente de EE.UU. 5.208.020) y que se esboza en la Fig. 3. En este procedimiento, el anticuerpo se modifica con un conector bifuncional en una relación entre conector y anticuerpo en el intervalo de 5 a 10:1 para introducir grupos ditiopiridilo en las cadenas laterales de los aminoácidos del anticuerpo. El anticuerpo activado se separa del conector residual mediante cromatografía de filtración en gel G25. La relación entre anticuerpo y conector después de la purificación es inferior a 5 a 10:1 y por lo general se encuentra en el intervalo de 3 a 5:1 y se mide mediante absorbancia a 252 nm y 280 nm. El maitansinoide tiolado activado se añade en exceso molar con respecto al del conector medido. Después de la conjugación, la mezcla se purifica de nuevo mediante cromatografía de exclusión por tamaño G25 para producir el producto a granel.

En la alternativa, el conjugado de anticuerpo anti-integrina-maitansinoide se prepara mediante esencialmente una sola etapa que consiste en hacer reaccionar un maitansinoide portador de un éster reactivo con el anticuerpo anti-integrina no activado químicamente con antelación. El éster reactivo del maitansinoide puede ser un éster de 3-carboxi 4-nitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2-nitrofenilo, N-sulfoftalimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfosuccinimidilo o N-succinimidilo. El método se describe en la publicación WO2002098883.

4. Métodos de utilización de los conjugados de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse a un sujeto que los necesita para prevenir, tratar, manejar o mejorar un cáncer o uno o más síntomas del mismo. Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse en combinación con uno o más de otros tratamientos, preferentemente tratamientos útiles para la prevención, manejo o tratamiento del cáncer (incluidos, pero no limitados a, los agentes profilácticos o terapéuticos que se enumeran más adelante) a un sujeto que los necesita para prevenir, tratar, manejar o mejorar un cáncer o

uno o más síntomas del mismo. En el presente documento se describe un método de prevención, tratamiento, manejo o mejora del cáncer o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una formulación que comprende los conjugados de anticuerpo anti-alfaV de la invención. También se describe un método para prevenir, tratar o mejorar un cáncer o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los conjugados de anticuerpo anti-alfa V de la invención junto con uno o más tratamientos profiláctica o terapéuticamente eficaces (por ejemplo, cirugía, radioterapia, o la administración de agentes terapéuticos distintos de los conjugados de anticuerpo anti-alfa V). Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden utilizarse como tratamiento del cáncer de primera, segunda, tercera o cuarta línea. Los métodos se describen en el presente documento para tratar o mejorar uno o más síntomas de un cáncer en un sujeto. Otros métodos son para prevenir la reaparición del cáncer en pacientes que han sido tratados y que no tienen actividad de la enfermedad, administrando un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención.

Los cánceres que pueden tratarse mediante los métodos incluyen, pero no se limitan a, neoplasmas, tumores, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado. El cáncer puede ser un cáncer primario o metastásico. Las células cancerosas pueden expresar o no integrinas con subunidad alfaV. En una forma de realización preferente, el cáncer que está siendo manejado, tratado o mejorado según los métodos es un cáncer que expresa la subunidad V de integrina y ha metastatizado a otro sitio u órgano dentro del cuerpo del paciente o tiene el potencial de metastatizar. Los ejemplos específicos de cánceres que pueden tratarse mediante los métodos incluyen, pero no se limitan a, cáncer en la cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, huesos, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas y cerebro. Los cánceres adicionales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias tales como, pero no limitadas a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero no limitadas a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de las células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero no limitados a, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin; mielomas tales como mieloma múltiple, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; cáncer óseo y sarcomas del tejido conjuntivo tales como sarcoma óseo, mieloma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, enfermedad ósea de Paget, tumor de células gigantes maligno, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma de periostio, sarcomas de partes blandas, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no limitados a, glioma, astrocitoma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluidos adenocarcinoma y carcinoma intraductal, y cáncer de mama papilar; cáncer adrenal incluidos feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides; cáncer pancreático; cánceres de pituitaria; cánceres oculares no limitados a melanoma ocular, melanoma de coroides, melanoma de cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales; cáncer de vulva; cánceres de cuello uterino; cánceres uterinos no limitados a carcinoma de endometrio y sarcoma uterino; cánceres de ovario; cánceres de esófago y otros cánceres de cabeza y cuello tales como, pero no limitados a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células en grano de avena (células pequeñas); cánceres de estómago; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos, tal como carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar; colangiocarcinomas; cánceres pulmonares tales como cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer pulmonar de células pequeñas; cánceres testiculares, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cánceres de próstata; cánceres de pene; cánceres orales no limitados a carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándula salival; cáncer de células renales y otros cánceres renales; y cánceres de vejiga no limitados al carcinoma de células de transición (para una revisión de tales trastornos, véase DeVita, V.T., Hellman, S., y Rosenberg, S.A. Cancer: Principles and practice of oncology. Filadelfia: J.B. Lippincott Company, sexta edición, 2001). También pueden tratarse afecciones precancerosas mediante los métodos y las composiciones. Tales cánceres pueden incluir, pero no limitarse a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores hormonodependientes de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos.

En una forma de realización preferente, el cáncer que se está previniendo, manejando, tratando o mejorando según el método está seleccionado de entre cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer óseo, melanoma, cáncer pulmonar y cáncer de ovario. En otra forma de realización, el cáncer que se está previniendo, manejando, tratando o mejorando según los métodos está seleccionado de entre tumores metastásicos, incluidos pero no limitados a, tumores que han metastatizado o que pueden metastatizar al hueso (los ejemplos no limitativos son cánceres de próstata, mama y pulmón que han metastatizado o que tienen el potencial de metastatizar al hueso), tumores que han metastatizado o que pueden metastatizar al pulmón, tumores que han metastatizado o que pueden metastatizar al cerebro y tumores que han metastatizado o que pueden metastatizar a otros órganos o tejidos de un sujeto.

Tratamientos contra el cáncer

Cualquier agente o tratamiento (por ejemplo, quimioterapias, radioterapias, tratamientos hormonales y/o tratamientos biológicos o inmunoterapias), que se sabe resulta útil, o que se ha utilizado o que se utiliza actualmente para la prevención, tratamiento, manejo o mejora del cáncer o de uno o más síntomas del mismo puede utilizarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención según la invención que se describe en el presente documento. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Los ejemplos de las clases de tales agentes (es decir, agentes anticancerosos) incluyen, pero no se limitan a, citotoxinas, inhibidores de la angiogénesis e inmunomoduladores, y agentes utilizados para proporcionar alivio del dolor o para compensar los efectos nocivos de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, el uso de bisfosfonatos para reducir los efectos hipercalcémicos de los glucocorticoides).

Los inmunomoduladores biológicos incluyen: anticuerpos contra el receptor de linfocitos T tales como anticuerpos contra CD3 (por ejemplo, Nuvion (Protein Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o anticuerpos contra CD20 Rituxan (IDEC)), anticuerpos contra CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Hex)), anticuerpos contra CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)); anticuerpos contra citocinas o contra el receptor de citocinas y antagonistas tales como anticuerpos contra el receptor de IL-2 (Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos contra el receptor de IL-6 (por ejemplo, MRA (Chugai)) y anticuerpos contra IL-12 (CNT01275 (Centocor)), anticuerpos contra TNFalfa (Remicade (Centocor)) o antagonista del receptor de TNF (Enbrel (Immunex)), anticuerpos contra IL-6 (BE8 (Diacione) y CNT0328 (Centocor)), y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos asociados a tumores (por ejemplo, trastuzimab (Genentech)).

Los inhibidores de la angiogénesis (es decir, los antiangiogénicos) incluyen, pero no se limitan a, angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; angiozima. Los bisfosfonatos incluyen, pero no se limitan a, alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato y zoledronato.

Los ejemplos específicos de agentes anticancerosos que pueden utilizarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: 5-fluorouracilo; acivicina; aldesleucina; altretamina; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramizina; asparaginasa; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; bicalutamida; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucil; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomizina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiaurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluida interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-m; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-Ib; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocil; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedapa; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; ormaplatino; paclitaxel; pegaspargasa; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; roglitimida; clorhidrato de safinol; semustina; simtraceno; esparfosato sódico; esparfomicina; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; topotecan; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina.

El anticuerpo de la invención también puede administrarse en combinación con radioterapia que comprende el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En formas de realización preferentes, la radioterapia se administra en forma de radioterapia externa o teleterapia en la que la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras formas de realización preferentes, la radioterapia se administra como tratamiento interno o braquiterapia en el que se coloca una fuente radioactiva dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o una masa tumoral.

En formas de realización específicas, puede administrarse a los pacientes con cáncer de mama una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con la administración de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento del cáncer de mama incluidos, pero no limitados a: doxorubicina, epirubicina, la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida (AC), la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina y 5-

fluorouracilo (CAP), la combinación de ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluorouracilo (CEF), u otros agentes tales como Herceptin, tamoxifeno, paclitaxel o taxotere.

En formas de realización específicas, puede administrarse a los pacientes con cáncer de próstata una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con la administración de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento del cáncer de próstata incluidos, pero no limitados a, radioterapia externa; implantación intersticial de radioisótopos, de decir, renio, paladio o iridio; leuprolida u otros agonistas de LHRH; antiandrógenos no esteroideos (flutamida, nilutamida, bicalutamida), antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona), la combinación de leuprolida y flutamida, estrógenos, tales como DES, etinil estradiol; prednisona a dosis bajas, u otros regímenes de quimioterapia descritos para producir una mejoría subjetiva de los síntomas y la reducción de los niveles de PSA.

En formas de realización específicas, puede administrarse a los pacientes con cáncer de ovario una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento del cáncer de ovario, incluidos pero no limitados a: radioterapia intraperitoneal, tal como el tratamiento con ³²P; radioterapia total abdominal y pélvica, cisplatino, la combinación de paclitaxel (Taxol) o docetaxel (Taxotere) y cisplatino o carboplatino, la combinación de ciclofosfamida y cisplatino, la combinación de ciclofosfamida y carboplatino, la combinación de 5-FU y leucovorina, etopósido, doxorubicina liposomal, gemcitabina, ifosfamida, hexametilmelamina (HMM) o topotecan.

En formas de realización específicas, puede administrarse a los pacientes con tumor con metástasis a hueso una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento de tumores con metástasis a hueso, incluidos pero no limitados a: agentes o tratamientos utilizados en el tratamiento de malignidad subyacente tales como inhibidores hormonales para el cáncer de próstata o mama con metástasis a hueso, radioterapia o quimioterapia con radioisótopos osteotrópicos de metales (estroncio-89 y samario-153) y bisfosfonatos (por ejemplo palmidronato o alendronato).

Los tratamientos contra el cáncer y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la literatura, tal como el Physician's Desk Reference (57ª ed., 2003) ya disponible a través de Internet mediante suscripción de PDR® Electronic Library, Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado (edición de 2004).

Tratamiento del trastorno inflamatorio

Los conjugados de anticuerpo anti-alfa V de la invención pueden administrarse a un sujeto que los necesita para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas del mismo. Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse en combinación con uno o más de otros tratamientos, preferentemente tratamientos útiles para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno inflamatorio (incluidos, pero no limitados a los agentes profilácticos o terapéuticos que se enumeran más adelante en el presente documento) a un sujeto que los necesita para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas del mismo.

Los trastornos inflamatorios que pueden tratarse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteoartritis, espondiloartropatías (por ejemplo, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), osteólisis inflamatoria, enfermedad de Wilson e inflamación crónica resultado de infecciones virales o bacterianas crónicas. Además, los trastornos autoinmunitarios están asociados con una patología inflamatoria.

Tratamientos antiinflamatorios

En el presente documento también se describen métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que lo necesita un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención y uno o más tratamientos, por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos distintos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a las integrinas alfaV. Cualquier agente o tratamiento que se sabe resulta útil, o que se ha utilizado o que se está utilizando actualmente para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas del mismo puede utilizarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención según la invención que se describe en el presente documento. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, inmunomoduladores, antiangiogénicos, antiinflamatorios y antagonistas de TNFalfa.

Los ejemplos específicos de inmunomoduladores que pueden administrarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxan, nuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), leflunomida, anticuerpos contra el receptor de linfocitos T (por ejemplo, Orthoclone OKT3 (Johnson & Johnson), Nuvion (Protein Design Labs), o anticuerpos contra CD20 (Rituxan (IDEC)), anticuerpos contra CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos contra el receptor de IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos contra IL-6 (CNTO 328, Centocor) o contra el receptor de IL-6 (MRA, Chugai), y anticuerpos contra IL-12 (CNTO1275, Centocor), anticuerpos contra IFN, anticuerpos contra TNF, anticuerpos contra IL-1 y antagonistas de IL-1 alfa/ beta.

Los ejemplos de antagonistas de TNFalfa que pueden administrarse en combinación con conjugados de anticuerpo anti-alfa V de la invención a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos (y fragmentos de unión al antígeno de los mismos) tal como anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TNFalfa, moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido o hélices triples), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que bloquean, reducen, inhiben o neutralizan la función, actividad y/o expresión de TNFalfa. Los ejemplos de antagonistas de TNFalfa incluyen: infliximab (REMICADE; Centocor), D2E7 (HUMARA; Abbott Laboratories/Knoll Pharmaceuticals Co., Mt. Olive, N.J.), CDP571 que también se conoce como HUMICADE y CDP-870 (ambos de Celltech/Pharmacia, Slough, Reino Unido), TNF-R1 (Amgen), etanercept (Enbrel; Immunex), y los inhibidores de otros miembros de la superfamilia de receptores TNFR. Otros antagonistas de TNF incluyen, pero no se limitan a, IL-10, que se sabe bloquea la producción de TNFalfa y agentes contra p38 MAPK.

Los ejemplos no limitativos de antiinflamatorios que pueden administrarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención a un sujeto con un trastorno inflamatorio incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, beta agonistas, anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX), diclofenaco (VOLTAREN), etodolaco (IODINE), fenoprofeno (NALFON), indometacina (INDOCIN), ketoralaco (TORADOL), oxaprozina (DAYPRO), nabumetona (RELAFEN), sulindac (CLINORIL), tolmentina (TOLECTIN), rofecoxib (VIOXX), naproxeno (ALEVE, NAPROSYN), ketoprofeno (ACTRON) y nabumetona (RELAFEN). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE), prednisolona y triamcinolona.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con osteoartritis una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles para la prevención, tratamiento, manejo o mejora de la osteoartritis, incluidos pero no limitados a: analgésicos tales como paracetamol, fenacetina; y tramadol, AINE tales como aspirina, diflunisal, diclofenaco, etodolaco, fenamatos, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, salicilato de metilo, nabumetona, naproxin, oxaprazin, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, y tolmetina; inhibidores específicos de ciclooxigenasa (Cox-2) (CSI) tales como celecoxib y rofecoxib; inyección intra o periarticular de preparaciones de depósito de, por ejemplo, glucocorticoides o productos biofarmacéuticos, e inyección intraarticular de ácido hialurónico. Un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención también puede utilizarse en combinación con otras medidas no farmacológicas en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la osteoartritis, incluidas pero no limitadas a: irrigación de la articulación osteoartítica, reducción de la carga de la articulación; aplicación de calor o frío a la articulación afectada; crema de capsaicina; ejercicio y otras terapias físicas, y la cirugía de reemplazo articular.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con artritis reumatoide una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la artritis reumatoide incluidos AINE, analgésicos, y CSI, como se ha analizado para la osteoartritis. Además, pueden utilizarse otros tratamientos al mismo tiempo, antes de, o posteriormente a la administración de un anticuerpo anti-alfaV de la invención, tales como pulsos mensuales con glucocorticoides a dosis alta, o glucocorticoides intraarticulares; fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) incluidos metotrexato, compuestos de oro (por ejemplo Auranofina), D-penicilamina, antipalúdicos (por ejemplo, cloroquina) y sulfasalazina; agentes neutralizantes de TNFalfa tales como etanercept e infliximab; inmunosupresores y agentes citotóxicos no limitados a azatioprina, leflunomida, ciclosporina y ciclofosfamida; e intervenciones quirúrgicas tales como artroplastias, reemplazo total de articulaciones, cirugía de la mano reconstructiva, sinovectomía abierta o artroscópica y tenosinovectomía temprana de la muñeca; intervenciones externas tales como diversas órtesis y dispositivos de apoyo, y otras terapias físicas; y complementos dietéticos tales como el aumento de la ingesta de ácidos grasos omega-3 (tal como el ácido eicosapentaenoico).

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la

prevención, tratamiento, manejo y mejora de la EPOC, incluidos pero no limitados a: broncodilatadores, incluidos pero no limitados a, agonistas beta-adrenérgicos de acción inmediata y de acción prolongada tales como albuterol, pirbuterol, terbutalina y metaproterenol, albuterol de liberación sostenida oral y salmeterol inhalado; anticolinérgicos tales como bromuro de ipratropio, y teofilina y sus derivados; glucocorticoides; oxígeno; trasplante de pulmón; cirugía de reducción de volumen pulmonar; intubación endotraqueal, apoyo ventilatorio; vacuna contra la gripe anual y vacunación antineumocócica; ejercicio; y dejar de fumar.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con fibrosis pulmonar una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con una cantidad eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, incluidos pero no limitados a: oxígeno; corticosteroides; fármacos citotóxicos (ciclofosfamida o azatioprina); broncodilatadores y agonistas beta-adrenérgicos de acción inmediata y de acción prolongada, anticolinérgicos, y teofilina y sus derivados); y antihistamínicos (difenhidramina y doxilamina).

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con asma una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con una cantidad eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento del asma, incluidos pero no limitados a: estimulantes adrenérgicos (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, catecolaminas, por ejemplo, epinefrina, isoproterenol e isoetarina; resorcinolos, por ejemplo, metaproterenol, terbutalina y fenoterol; y saligeninas, por ejemplo, salbutamol; metilxantinas que incluyen teofilina y sus diversas sales; anticolinérgicos incluidos sulfato de atropina, metilnitrato de akopina y bromuro de ipratropio; glucocorticoides, agentes estabilizadores de mastocitos, ácido cromoglicólico sódico y nedocromil sódico; modificadores de leucotrienos Zileutón, zafirlukast y montelukast, inmunosupresores incluido metotrexato, y acetilcisteína.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con alergia una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con una cantidad eficaz de uno o más de otros agentes útiles para el tratamiento de la alergia, incluidos pero no limitados a: ácido cromoglicólico; antihistamínicos; fármacos simpaticomiméticos (medicamentos tanto alfa-adrenérgicos como beta-adrenérgicos); teofilina y sus derivados; glucocorticoides; y tratamientos de desensibilización inmunitaria con inyecciones de alérgeno.

Tratamiento de trastornos autoinmunitarios

El conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención puede administrarse a un sujeto que lo necesita para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo. El conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención también puede administrarse en combinación con uno o más de otros tratamientos, preferentemente tratamientos útiles para la prevención, el manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario (incluidos pero no limitados a los agentes profilácticos o terapéuticos que se enumeran más adelante en el presente documento) a un sujeto que lo necesita para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo. En el presente documento se describe un método para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una formulación líquida de la invención. En el presente documento también se describe un método para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una formulación líquida de la invención y una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a las integrinas alfaV.

En el presente documento también se describen métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un sujeto resistente a tratamientos convencionales para un trastorno autoinmunitario de este tipo, comprendiendo dichos métodos administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los anticuerpos de la invención. En el presente documento también se describen métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo en un sujeto resistente a tratamientos actuales con un solo agente para un trastorno autoinmunitario de este tipo, comprendiendo dichos métodos administrar a dicho sujeto una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención y una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a la integrina alfaV. En el presente documento también se describen métodos para manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo administrando un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con cualquier otro tratamiento a los pacientes que han demostrado ser resistentes a otros tratamientos, pero que ya no siguen estos tratamientos. En el presente documento también se describen métodos para el manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario en el que otro tratamiento ha demostrado ser o puede resultar demasiado tóxico, es decir, que da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto en tratamiento.

En el presente documento también se describen métodos para el manejo o tratamiento de un trastorno autoinmunitario en el que el paciente es resistente a otros tratamientos. En el presente documento también se describen métodos para prevenir la reaparición de un trastorno autoinmunitario en pacientes que han sido tratados y no tienen enfermedad activa administrando un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención.

En los trastornos autoinmunitarios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inmunitaria cuando no hay sustancias extrañas que combatir y el sistema inmunitario, normalmente protector del cuerpo, daña sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con enfermedad de Crohn y la membrana sinovial, el hueso y el cartílago de diversas articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que los trastornos autoinmunitarios avanzan, puede producirse la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, el crecimiento anormal de un órgano que puede ir acompañado de la neovascularización de dicho órgano o tejido, o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar a un solo órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por los trastornos autoinmunitarios incluyen eritrocitos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, orquitis y ooforitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampoloso, cardiomiopatía, enfermedad celiaca-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Se conocen en la técnica tratamientos autoinmunitarios y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado y se han descrito en la literatura, tal como el Physician's Desk Reference (56ª edición, 2002 y 57ª edición, 2003).

En el presente documento también se describen métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que lo necesita un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención y uno o más tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a las integrinas alfaV. Cualquier agente o tratamiento que se sabe resulta útil, o que se ha utilizado o está siendo utilizado actualmente para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo puede utilizarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención según los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, inmunomoduladores, antiinflamatorios y antagonistas de TNFalfa. Se han descrito anteriormente en el presente documento ejemplos específicos de inmunomoduladores, antiinflamatorios y antagonistas de TNFalfa que pueden utilizarse en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno autoinmunitario.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con esclerosis múltiple (EM) una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la EM, incluidos pero no limitados a: IFN-beta1b (Betaseron) e IFN-alfa2A (Avonex); acetato de glatiramer (Copaxone); mitoxantrona; metotrexato; ciclofosfamida; inmunoglobulina intravenosa; glucocorticoides; metilprednisolona; 2-clorodesoxiadenosina (cladribina); baclofeno (por vía oral o por vía intratecal a través de un catéter permanente); clorhidrato de ciclobenzaprina; clonazepam; clorhidrato de clonidina; carbamazepina; gabapentina; amitriptilina; primidona; ondansetrón; isoniazida; oxibutinina; tolterodina; propantelina; betanecol; clorhidrato de terazosina; citrato de sildenafil; amantadina; pemolina; vitaminas a dosis altas; orotato de calcio; ganciclovir; antibiótico; e intercambio de plasma.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con psoriasis una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la psoriasis, incluidas preparaciones tópicas que contienen esteroides; tar (Estar, Psorigel, crema Fototar); análogos

tópicos de la vitamina D tal como ungüento de calcipotrieno; luz ultravioleta con o sin psoraleno; metotrexato; ciclosporina; sulfasalazina; y retinoides sintéticos.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con enfermedad de Crohn una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora de la enfermedad de Crohn, incluidos pero no limitados a: antidiarreicos (loperamida, difenoxilato con atropina, colestiramina o colestipol); antiespasmódicos (propantelina, dicyclomina o hiosciamina); agentes con ácido 5-aminosalicílico (sulfasalazina, mesalamina (Asacol) y su forma de liberación lenta (Pentasa); corticosteroides; fármacos inmunomoduladores útiles en las enfermedades reumáticas - azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina y metotrexato; antibióticos; inhibidores de TNF, incluidos entercept e inflixmab; inmunosupresores incluidos tacrolimus, micofenolato mofetilo y talidomida; tratamientos nutricionales, tratamiento enteral con dietas elementales (por ejemplo, Vivonex durante 4 semanas); y nutrición parenteral total.

En los métodos específicos que se describen en el presente documento, se administra a los pacientes con lupus eritematoso una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-alfaV de la invención en combinación con otros agentes o tratamientos útiles en la prevención, tratamiento, manejo y mejora del lupus eritematoso, incluidos pero no limitados a: antimaláricos (incluida, pero no limitados a, hidroxicloroquina); glucocorticoides (por ejemplo, puede utilizarse el tratamiento con pulsos intravenosos a dosis bajas o a dosis altas); inmunosupresores e inmunomoduladores incluidos ciclofosfamida, clorambucil y azatioprina, metotrexato y micofenolato mofetilo; esteroides androgénicos (incluido, pero no limitados a, danazol); y anticoagulantes (incluido, pero no limitados a, warfarina).

Enfermedades de proliferación celular no malignas o relacionadas con el sistema inmunitario

Los conjugados de la invención también son útiles para tratar enfermedades proliferativas no malignas y, especialmente, las que implican la angiogénesis. Se sabe que la angiogénesis es un factor coadyuvante en diversos estados patológicos además de la capacidad de los tumores para crecer y metastatizar, los trastornos del ojo incluidas las retinopatías, y trastornos de la piel incluidas la psoriasis y el sarcoma de Kaposi. Los ejemplos representativos de tales enfermedades no tumorigénicas dependientes de la angiogénesis incluyen la neovascularización corneal, los queloides y cicatrices hipertróficas, la retinopatía diabética proliferativa, la artritis reumatoide, las malformaciones arteriovenosas (analizadas anteriormente), las placas ateroscleróticas y la cardiopatía isquémica, la cicatrización retardada, articulaciones hemofílicas, fracturas no consolidadas, el síndrome de Osler-Weber, la psoriasis, el pénfigo vulgar, el síndrome de Behcet, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), el granuloma piógeno, la escleroderma, el tracoma, la menorragia (analizada anteriormente) y las adherencias vasculares.

4. Formulaciones farmacéuticas

La invención proporciona formulaciones estables de los conjugados anti-alfaV-maitansinoide, que son preferentemente una solución salina acuosa tamponada con fosfato o solución salina mixta, así como soluciones y formulaciones conservadas que contienen un conservante, así como formulaciones conservadas multiuso adecuadas para su uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un conjugado de anti-alfaV-maitansinoide en una formulación farmacéuticamente aceptable.

Los conservantes preferentes incluyen los seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato sódico y timerosal, o mezclas de los mismos.

Al menos un conjugado de anti-alfaV-maitansinoide, ya sea en las formulaciones o soluciones estables o conservadas descritas en el presente documento, puede administrarse a un paciente según la presente invención a través de diversos métodos de administración, incluidas la inyección SC o IM; por vía transdérmica, pulmonar, transmucosa, implante, bomba osmótica, cartucho, micro bomba, o por otros medios que el experto en la materia comprende, como se conoce en la técnica.

4. Formulaciones farmacéuticas

En un método de administración de CNTO 95-maitansinoide que se describe en el presente documento, la sustancia farmacéutica se administra por vía intravenosa desde un catéter instalado previamente equipado con una bolsa de infusión. El CNTO 95-mertansine es suministrado en viales de 20 ml de un solo uso por ImmunoGen, Inc. (Cambridge, MA). Cada vial contiene proteína a una concentración de 0,05 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml en una solución tamponada (pH 6,5 ± 0,5) compuesta esencialmente por fosfato de potasio monobásico (0,57 mg/ml), fosfato sódico monobásico monohidrato (0,20 mg/ml), fosfato sódico dibásico (0,555 mg/ml) y cloruro sódico (8,16 mg/ml) en agua purificada, USP. El producto farmacéutico se filtra previamente dos veces después de instilar el volumen de la dosis en la bolsa de infusión haciéndolo pasar a través de un filtro de 5-μ con baja afinidad por las proteínas y se administra a los pacientes a través de un filtro en línea de 0,22 μm en un plazo de 8 horas desde la

preparación. Después de la infusión, la línea i.v. debe lavarse abundantemente con líquido para asegurar la administración de la dosis completa de fármaco.

- 5 En base a la experiencia previa en pacientes humanos con los conjugados de AcMo-maitansinoide, proporcionados por vía intravenosa, pueden proporcionarse dosis que van de 22 mg/M² a 295 mg/M² cada tres semanas (J Clin. Oncol. 21: 211-222, 2003).

6. Artículos de fabricación

- 10 La invención incluye un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, que comprende un conjugado de anti-alfaV-maitansinoide, un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El artículo de fabricación contiene preferentemente al menos un vial que comprende una solución de al menos un conjugado de anti-alfaV-maitansinoide con los conservantes y/o
15 tampones prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que tal solución puede mantenerse durante un período de tiempo. La invención puede comprender un artículo de fabricación, que comprende el material de envasado, un primer vial que comprende liofilizado al menos un conjugado de anti-alfaV-maitansinoide, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso de tampón o conservante prescrito, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que proporciona instrucciones al facultativo o paciente sobre la manera de reconstituir el al menos un conjugado de anti-alfaV-
20 maitansinoide en el diluyente acuoso para formar una solución.

- Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable mediante una
25 aguja de inyección hipodérmica).

- Al menos un agente activo en la composición es un conjugado de anticuerpo anti-alfaV-maitansinoide. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar la afección de elección, tal como el cáncer. El prospecto del presente documento puede indicar que el anticuerpo o la composición se utilizan para tratar el cáncer que no responde o responde mal, al tratamiento de referencia como se describe en el presente documento para diagnósticos y enfermedades específicas. En otras formas de realización, el prospecto puede indicar que la composición o el conjugado de anticuerpo-maitansinoide pueden utilizarse también para tratar el cáncer metastásico, el cáncer de próstata, el cáncer de mama o el cáncer colorrectal.

- 35 Aunque se ha descrito la invención en términos generales, en los siguientes ejemplos se describirán adicionalmente las formas de realización de la invención.

EJEMPLO 1

40 Producción y caracterización del anticuerpo monoclonal CNTO95

- La preparación del anticuerpo anti-integrina alfa V CNTO95 se describe detalladamente en la publicación PCT N° WO 02/12501 y en la publicación de EE.UU. N° 2003/040044. En concreto, el AcMo humano CNTO 95 se generó inmunizando (CBA/J x C57/BL6/J, GenPharm International) ratones híbridos F2 con integrina $\alpha_v\beta_3$ purificada
45 a partir de placenta humana. El anticuerpo está compuesto por las regiones constante kappa de IgG1 y variable humanas. El método de fabricación y las características deseables de CNTO95 se han descrito anteriormente en el documento WO0212501 y Trikha, *et al.* 2004, Int. J. Cancer 110 (3): 326-335.

- Se utilizaron ratones transgénicos de GenPharm International que expresan inmunoglobulinas humanas pero no Igk o IgM de ratón. Estos ratones contienen transgenes de secuencia humana que se someten a unión V(D)J, mutación somática y conmutación de clase de la cadena pesada para generar un repertorio de inmunoglobulinas de secuencia humana (Taylor *et al.*, International Immunology 6:579-591 (1993)). El transgén de la cadena ligera se deriva en parte de un clon cromosómico artificial de levadura que incluye casi la mitad de la región V κ humana de la línea germinal. Además de varios genes de VH, el transgén de la cadena pesada (HC) codifica las regiones constantes μ humana y $\gamma 1$ (Lonberg *et al.*, Nature 368:856-859 (1994)) y/o $\gamma 3$ humana. En el proceso de inmunización y fusión se utilizó un ratón derivado del linaje genotípico HC012 para generar un anticuerpo monoclonal anti-alfaV utilizado en la preparación de un conjugado de la invención.

- Se extrajeron placenta humana (disgregada utilizando una picadora de carne) o células de melanoma humano M21 que expresaban la integrina $\alpha_v\beta_3$, con OTG (octil-tioglucoído Pierce) en solución salina tamponada como se describe (WO0212501). Estas preparaciones se emulsionaron con un volumen igual de adyuvante completo de Freund y se utilizaron para inmunizar a ratones macho de 15 a 17 semanas de edad castrados quirúrgicamente (GenPharm, Foster City, CA) los días 0 y 14, y en incompleto de Freund los días 28, 48 y 56. Tres días más tarde, se recogieron los esplenocitos de un ratón que presentaba un título de 1:1.280 contra alfaVbeta3 utilizando un formato de EIA en fase sólida. La fusión se llevó a cabo en una relación 1:1 entre células de mieloma murino (SP2/0) y células esplénicas viables. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron utilizando el ensayo de
65

microplaca de EIA o el ensayo de captura de EIA y las líneas productoras de anticuerpos seleccionadas se multiplicaron y se volvieron a ensayar para las propiedades deseadas.

El análisis ELISA confirmó que el anticuerpo purificado a partir de dos hibridomas, C371A (también llamado AcMo CNTO 95) y C372A, se unían a alfaVbeta3 en función de la concentración. El 50% de la unión se consigue a 0,07 µg/ml y 0,7 µg/ml para C372A y CNTO 95, respectivamente. En el mismo ensayo, el anticuerpo anti-alfaVbeta3, c7E3 IgG, demostró un 50% de la unión máxima a 0,07 µg/ml.

Para determinar la especificidad única de CNTO95 se realizaron ensayos de unión competitiva (o complementación) utilizando los siguientes anticuerpos murinos: m7E3 IgG, anticuerpos anti-alfaVbeta3 (clon LM609, Chemicon), anti-alfaVbeta5 (clon P1F6, Gibco), anti-beta3 (Chemicon, AMAC) o anti-alfaV (clon VNR139, Gibco). Estos resultados demostraron que CNTO 95 se une a un epítipo no compartido por los demás anticuerpos ensayados.

Los valores de afinidad de unión para las integrinas purificadas se compararon con la unión a receptores expresados en diversas líneas celulares utilizando 125-I CNTO 95. Las células A375S2 y M21 expresaron $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, las células HT-29 expresaron $\alpha_v\beta_5$. Para la comparación, se utilizaron otros AcMo capaces de unirse a integrinas. La K_d se calculó a partir de una curva de unión por saturación en cada caso utilizando múltiples repeticiones de múltiples lotes de anticuerpo. En placas recubiertas con $\alpha_v\beta_3$, la K_D media de CNTO 95 fue de $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ M; y la K_d media de abciximab fue $2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$ M. La K_D media de CNTO 95 en $\alpha_v\beta_5$ fue $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ M. Abciximab no mostró unión ni dosis-respuesta en las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$.

Tal como se muestra en la Fig. 4, la dosificación con CNTO 95 inhibía el crecimiento de los tumores de melanoma humano en ratones desnudos. El día 26, CNTO 95 inhibía el crecimiento del tumor aproximadamente un 80% en comparación con los tumores de animales tratados con control. En este modelo, CNTO 95 no interactúa con los vasos angiogénicos del hospedador ya que no se une a las integrinas de ratón, lo que sugiere que el bloqueo de las integrinas expresadas por tumores humanos por sí solo puede inhibir el crecimiento tumoral en ratones independientemente de los efectos antiangiogénicos.

Para los estudios en ratas, se adquirieron de Harlan ratas hembra desnudas, con edades entre 6-7 semanas. Se inocularon s.c. células A375.S2 a veinte ratas (3×10^6) en el flanco (día 1). El día 4, las ratas se asignaron aleatoriamente a 2 grupos. Se inyectó i.v. CNTO 95 a un grupo (10 mg/kg en PBS), mientras que el otro grupo recibió una IgG de control emparejada por isotipo (10 mg/kg). La dosificación se continuó a partir de entonces semanalmente hasta el día 46 (un total de 6 dosis). Los tumores se midieron mediante calibradores dos veces a la semana y los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$. Los pesos corporales también se registraron semanalmente.

En la rata, CNTO 95 es capaz de bloquear las integrinas angiogénicas de rata y las integrinas expresadas por células tumorales humanas. El tratamiento semanal de ratas desnudas portadoras de tumores con CNTO 95 a 10 mg/kg redujo el crecimiento tumoral en comparación con el AcMo de control IgG humana emparejado por isotipo (Fig. 5). Para el día 46, el tratamiento con CNTO 95 dio como resultado una reducción significativa del tamaño final del tumor en comparación con las ratas desnudas tratadas con control ($p = 0,0007$).

En resumen, CNTO 95 es un AcMo totalmente humano, que se une a miembros de la familia de integrinas alfaV con especificidad, avidéz y actividad únicas como se demuestra mediante múltiples ensayos funcionales que muestran que neutraliza los efectos biológicos de los receptores de integrina alfaVbeta3 y alfaVbeta5 *in vitro* e *in vivo*. CNTO 95 inhibía la adhesión, migración, proliferación e invasión de células tumorales y endoteliales *in vitro* y demostró que la unión a y el bloqueo de múltiples receptores de integrina alfaV era más eficaz que el bloqueo de una única integrina sola. Además, CNTO 95 inhibía la angiogénesis y el crecimiento tumoral *in vivo*. El crecimiento de los tumores de melanoma humano se redujo significativamente mediante el bloqueo de las integrinas de células tumorales en el modelo de ratón o mediante el bloqueo combinado de las integrinas angiogénicas del hospedador y células tumorales en el modelo de rata, resaltando la importancia potencial de dirigirse a múltiples dianas celulares para la eficacia antitumoral.

Los resultados de modelos *in vitro* demuestran que CNTO 95 tiene potentes propiedades antiangiogénicas, inhibiendo la adhesión, proliferación, migración de las células endoteliales y el crecimiento de capilares. Además, CNTO 95 bloqueaba la angiogénesis estimulada por las células de melanoma M21 y bFGF en el modelo de Matrigel de rata y por bFGF en un modelo de angiogénesis de primate. CNTO 95 presentó potentes efectos antiangiogénicos tanto en un modelo de roedor como en un novedoso modelo de primate no humano en monos cynomolgus.

Además de bloquear las integrinas en el endotelio angiogénico, la capacidad para inhibir la función de la integrina en las propias células tumorales redujo el crecimiento de los tumores. Se ha sugerido que varias integrinas alfaV desempeñan papeles cruciales en la biología de las células tumorales. En un modelo de xenoinjerto de ratón en el que CNTO 95 no presenta reacción cruzada con las integrinas del hospedador, el tratamiento con CNTO 95 inhibía significativamente el crecimiento de tumores de melanoma positivos para v3/5.

Una de las características más importantes de CNTO 95 es su naturaleza totalmente humana. Debido a que es totalmente humano, es menos probable que CNTO 95 provoque respuestas inmunitarias en los pacientes. Además, debido a que CNTO 95 es capaz de unirse no sólo a alfaVbeta3 y alfaVbeta5 sino también a otras integrinas alfaV, tales como alfaVbeta6 y alfaVbeta1, tiene el potencial de inhibir múltiples eventos mediados por integrinas.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE CONJUGADOS DE CNTO 95-MAITANSINA

Se prepararon conjugados de anticuerpo de maitansinas tioladas para un posterior inicio de ensayos biológicos partiendo utilizando conectores bifuncionales como se describe.

El anticuerpo CNTO 95 fue proporcionado por Centocor para la conjugación. Se suministró CNTO 95 a aproximadamente 20 mg/ml (260 mg) total. El anticuerpo se dializó en Tampón A (KPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM pH 6,5), a continuación se llevó hasta 8 mg/ml en Tampón A al 95%, EtOH al 5%. El anticuerpo se modificó con un exceso molar de 6,5 veces de SPP para introducir el conector para la conjugación del fármaco, formando CNTO 95-SS-Py, en la que S-Py es 2-mercaptopiridina. Se eliminó el SPP residual mediante cromatografía de filtración en gel G25. La relación entre conector y Ac se midió como 4,7. El conjugado Ab-SS-Py se modificó con un exceso molar de 1,7 veces de DM1 (PM = 737,5 g/mol) con respecto al conector, utilizando una concentración de anticuerpo de 3,2/ml en Tampón A al 97%, dimetilacetamida al 3%. Después de la conjugación, el conjugado se volvió a cromatografiar en G25 utilizando como tampón PBS, pH 6,5. El conjugado resultante contenía 3,2 moles de DM1 por mol de CNTO-95: [Ac] = 2,59 mg/ml, [DM1] = 38,3 microgr/ml. Los cálculos se basaron en las lecturas de absorbancia a 252 nm y 280 nm del material filtrado y utilizando coeficientes de extinción: Ac = 224.000 M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm, DM1 = 5700 M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm, Ac = 82.880 M⁻¹ cm⁻¹ a 252 nm y DM1 = 26.790 M⁻¹ cm⁻¹ a 252nm.

El producto se analizó mediante SDS-PAGE no reductor, SEC HPLC y por afinidad de unión a la proteína alfaVbeta3 y alfaVbeta5 mediante ELISA. Mediante PAGE, el producto fue predominantemente una banda alrededor de 160 kDa, siendo también visible una banda más tenue de menor peso molecular. Mediante análisis SEC HPLC, la fracción del conjugado eluyendo un monómero (18,8') fue el 96% y aproximadamente el 4% del conjugado eluido como una especie de mayor peso molecular (16,2'). La afinidad de unión se calculó mediante la representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración dando una Kd aparente de 3,0 e-11 M para CNTO95 y una Kd de 3,5 e-11 M para el conjugado en alfaVbeta5. Ambas especies dieron una Kd aparente de aproximadamente 3,0 e-9 en alfaVbeta3.

Se prepararon de manera análoga otros lotes de CNTO95-SPP-DM1 y CNTO 95 conjugado a DM4 y un anticuerpo irrelevante contra un antígeno no humano, F105, conjugados de manera similar, utilizando conectores bifuncionales como se muestra en la Fig. 2 y como se esboza en la Fig. 3. A continuación se proporcionan las características de estas preparaciones:

Preparación de CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM1 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 270,6 mg de CNTO95 con 3,7 mg de DM1, los 98 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,74 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM1 era 37,6 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la relación de DM1 por mol de CNTO95 es 2,98 (1 microgramo de DM1 equivale a 68,9 microgramos de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 96,3% de monómero con un 0,59% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM1 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 104 mg de CNTO95 con 1,82 mg de DM1, los 26 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,65 mg/ml de anticuerpo CNTO95-SPP-DM1 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM1 era 70,07 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene una relación de 3,80 moles de DM1 por mol de CNTO95 (1 µg de DM1 equivale a 57,2 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 93,4% de monómero con un 1,61% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM1 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 228 mg de CNTO95 con 4,13 mg de DM1, los 102 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,24 mg/ml de anticuerpo CNTO95-SPP-DM1 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM1 era 40,53 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene una relación de 3,93 moles de DM1 por mol de CNTO95 (1 µg de DM1 equivale a 55,3 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 94,7% de monómero con un 1,00% de fármaco libre.

Preparación de CNTO 95-SSNPB-DM4 (CNTO 365). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO 95 a maitansinoide DM4 con el conector SSNPB, de la siguiente manera: se conjugaron 121 mg de CNTO 95 a 2,18 mg de DM4, los 34 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,25 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 64,11 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la relación de DM4

por mol de anticuerpo es 3,57 (1 microgr de DM4 equivale a 55,6 microgr de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 95,4% de monómero con un 3,23% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SSNPP-DM4 (CNTO 366). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO 95 a maitansinoide DM4 con el conector SSNPP, de la siguiente manera: se conjugaron 101 mg de CNTO 95 a 1,45 mg de DM4, los 30 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,07 mg/ml de anticuerpo en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 48,39 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación tiene 2,95 moles de DM4 por mol de CNTO95 (1 µg de DM4 equivale a 69,5 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 85,9% de monómero con un 1,18% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPDB-DM4 (CNTO 365). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO 95 a maitansinoide DM4 con el conector SPDB, de la siguiente manera: se conjugaron 228,5 mg de CNTO95 a 4,37 mg de DM4, los 104,5 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,19 mg/ml de anticuerpo CNTO95-SPDB-DM4 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 41,84 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación tiene 3,92 moles de DM4 por mol de CNTO95 (1 µg de DM4 equivale a 52,3 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 93,6% de monómero con un 0,55% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPDB-DM4 (CNTO 365). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO 95 a maitansinoide DM4 con el conector SPDB, de la siguiente manera: se conjugaron 309 mg de CNTO95 a 5,4 mg de DM4, los 130,7 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,36 mg/ml de anticuerpo CNTO95-SPDB-DM4 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 41,2 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación tiene 3,57 moles de DM4 por mol de CNTO95 (1 µg de DM4 equivale a 57,5 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 93,8% de monómero con un 0,40% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM1 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 270,6 mg de CNTO95 a 3,7 mg de DM1, el conjugado resultante se almacenó entre 2°C y 8°C a 2,74 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM1 era 37,6 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene una relación de 2,98 DM1 por mol de CNTO95 (1 microgr de DM equivale a 68,9 microgr de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 96,3% de monómero con un 0,59% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM1 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 245 mg de F105 a 4,28 mg de DM1, los 91,5 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,68 mg/ml de anticuerpo F105-SPP-DM1 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM1 era 46,76 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene una relación de 3,79 moles de DM1 por mol de F105 (1 µg de DM1 equivale a 57,3 µg de anticuerpo F105 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 90,3% de monómero con un 2,44% de fármaco libre.

Preparación de CNTO95-SPP-DM4 (CNTO 366). Se conjugó anticuerpo monoclonal CNTO95 a maitansinoide DM4 con el conector SPP, de la siguiente manera: se conjugaron 76,7 mg de CNTO95 a 1,10 mg de DM4, los 35 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,19 mg/ml de anticuerpo CNTO95-SPP-DM4 conjugado en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 31,5 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene una relación de 2,96 moles de DM4 por mol de CNTO95 (1 µg de DM4 equivale a 69,4 µg de anticuerpo CNTO95 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 97,3% de monómero con un 1,14% de fármaco libre.

Preparación de F105-SSNPB-DM4. Se conjugó anticuerpo monoclonal F105 a maitansinoide DM4 con el conector SSNPB, de la siguiente manera: se conjugaron 106 mg de F105 a 1,84 mg de DM4, los 25 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,85 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 73,45 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la relación de DM4 por mol de anticuerpo es 3,57 (1 microgr de DM4 equivale a 57,5 microgr de anticuerpo F105 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 85,1% de monómero con un 1,92% de fármaco libre.

Preparación de F105-SSNPB-DM4. Se conjugó anticuerpo monoclonal F105 a maitansinoide DM4 con el conector SSNPB, de la siguiente manera: se conjugaron 106 mg de F105 a 1,84 mg de DM4, los 30 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,46 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 57,93 mg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la relación de DM4 por mol de anticuerpo es 3,32 (1 microgr de DM1 equivale a 65,4 microgr de anticuerpo F105 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 88,8% de monómero con un 1,85% de fármaco libre.

Preparación de F105-SSNPP-DM4. Se conjugó anticuerpo monoclonal F105 a maitansinoide DM4 con el conector SSNPP, de la siguiente manera: se conjugaron 105 mg de F105 a 1,76 mg de DM4, los 28 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 3,41 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de

DM4 era 62,87 µg/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene 3,45 moles de DM4 por mol de F105 (1 µg de DM4 equivale a 59,4 µg de anticuerpo F105 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 85,9% de monómero con un 3,75% de fármaco libre.

Preparación de F105-SPDB-DM4. Se conjugó anticuerpo monoclonal F105 a maitansinoide DM4 con conector SPDP, de la siguiente manera: se conjugaron 230,5 mg de F105 a 4,12 mg de DM4, los 104,5 ml de conjugado resultantes se almacenaron entre 2°C y 8°C a 2,21 mg/ml en PBS a pH 6,5. Se determinó que la concentración de DM4 era 39,41 microgr/ml mediante absorbancia. Por lo tanto, la preparación contiene 3,66 moles de DM4 por mol de F105 (1 µg de DM4 equivale a 56,0 µg de anticuerpo F105 conjugado). Mediante HPLC, la preparación fue un 89,2% de monómero con un 0,65% de fármaco libre.

En resumen, se sintetizaron las siguientes especies para su posterior análisis (Tabla 6).

TABLA 6

<u>Compuesto</u>	<u>Fármaco</u>	<u>Reactivo de activación del maitansinol</u>	<u>Reactivo de activación del AcMo</u>	<u>Grupos metilo cercanos al disulfuro en el producto (lado del AcMO:lado del fármaco)</u>
CNTO364	DM1	N-metil, N-(1-ditiometil-3-carboxipropil)alanina	SPP o SSNPP	1:0
CNTO365	DM4	N-metil, N-(1-ditiometil-2-metil-4-carboxi- <i>n</i> -butil)alanina	SPDB o SSNPB	0:2
CNTO366	DM4	N-metil, N-(1-ditiometil-2-metil-4-carboxi- <i>n</i> -butil)alanina	SPP o SSNPP	1:2
F105-DM1	DM1	N-metil, N-(1-ditiometil-3-carboxipropil)alanina	SPP o SSNPP	1:0
F105-DM4	DM4	N-metil, N-(1-ditiometil-2-metil-4-carboxi- <i>n</i> -butil)alanina	SPDB o SSNPB	0:2
F105-DM4	DM4	N-metil, N-(1-ditiometil-2-metil-4-carboxi- <i>n</i> -butil)alanina	SPP o SSNPP	1:2

EJEMPLO 3: CONJUGADO DE CNTO 95-MAITANSINA QUE SE UNE A CÉLULAS TUMORALES

Se ensayó la capacidad y la afinidad del conjugado CNTO95-maitansinoide que se une a las células vivas.

Materiales y métodos. CNTO 95, Centocor lote # 95-VF30A03-1,20 mg/ml en PBS; CNTO 364 (CNTO 95-SPP-DM1), ImmunoGen lote # 1806-164, 37,6 mg/ml de DM1, 2,74 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg; CNTO 365 (CNTO 95-SPDB-DM4), ImmunoGen lote # 2020-78, 41,2 mg/ml de DM4, 2,36 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg; CNTO 366 (CNTO95-SPP-DM4), ImmunoGen lote # 2020-48, 31,5 mg/ml de DM4, 2,19 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg.

Células: las células de carcinoma de colon humano HT29 y de carcinoma pulmonar humano A549 fueron de la ATCC y se mantuvieron en alfaMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS). Se obtuvieron células de carcinoma de ovario humano A2780 del National Cancer Institute. Las células A2780 se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. Las células se recogieron, se aclararon, se suspendieron en DMEM exento de suero, y se incubaron secuencialmente durante 60 minutos en hielo con CNTO 95, CNTO 364, CNTO 365 y CNTO 366 diluidos en serie y anticuerpo anti-humano marcado con FITC (10 mg/ml). La ausencia de anticuerpo primario o la sustitución del anticuerpo primario con anticuerpo emparejado por isotipo hicieron de controles negativos. Las células se analizaron inmediatamente con un citómetro de flujo FACS Scan II (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism utilizando una regresión no lineal para determinar la concentración al 50% de la unión máxima (Tabla 7). La constante de unión efectiva se cambió menos de dos veces en la mayoría de los casos.

TABLA 7

	CE50 (mg/ml)			
	Compuesto	HT29	A549	A2780
5	CNTO 95	0,14	0,18	0,17
	CNTO 364	0,19	0,27	0,27
10	CNTO 365	0,21	0,34	0,27
	CNTO 366	0,29	0,42	0,30

15 EJEMPLO 4: CITOTOXICIDAD DE LOS CONJUGADOS DE CNTO 95-MAITANSINA FRENTE A LAS CÉLULAS TUMORALES

Se ensayó *in vitro* la capacidad de los conjugados de CNTO95-maitansinoide para destruir las células tumorales a lo largo del tiempo.

CNTO 364 (CNTO 95-SPP-DM1), ImmunoGen lote # 1806-164, 37,6 µg/ml de DM1, 2,74 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg. CNTO 365 (CNTO 95-SPDB-DM4), ImmunoGen lote # 2020-78, 41,2 µg/ml de DM4, 2,36 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg. CNTO 366 (CNTO95-SPP-DM4), ImmunoGen lote # 2020-48, 31,5 µg/ml de DM4, 2,19 mg/ml de anticuerpo conjugado, Nivel de endotoxinas <0,1 UE/mg.

Se cultivaron células de carcinoma de colon humano HT29 humanas y células de carcinoma pulmonar no pequeñas A549 humanas (ATCC), en αMEM complementado con FBS al 10% a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de color blanco (5.000 células/pocillo) en medio de cultivo y se incubaron durante 16 horas. Se añadieron diluciones en serie de inmunoconjugados a cada pocillo apropiado (0 µg/ml-20 µg/ml). Se incubaron placas de cultivo tisular a 37°C durante 96 horas. Se realizó un ensayo ATPLite según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism utilizando una regresión no lineal (Tabla 8) para determinar la concentración a la mitad del número máximo de células medida mediante luminosidad.

TABLA 8

Inmunoconjugado	CE50 (µg/ml)	
	HT29	A549
CNTO 364	1,0	1,2
CNTO 365	0,24	0,3
CNTO 366	1,0	1,5

50 EJEMPLO 5: TRATAMIENTO CON CNTO 95-DM1 DE RATAS PORTADORAS DE TUMORES DERIVADOS DE MELANOMA HUMANO

Se investigó la eficacia de CNTO 364 en comparación con CNTO95 contra células de melanoma humano A375.S2 s.c. avanzado.

El CNTO 95-DM1 fue preparado por ImmunoGen, Inc. Lote # 1716-74B, concentración madre: 2,59 mg/ml. 5 mg/kg de CNTO 95-DM1 equivalen a 74 µg/kg de DM1. El CNTO 95 era de Centocor, Lote # 5380-027, concentración madre = 20 mg/ml. IgG humana-DM1: la IgG humana ChromPure era de Jackson ImmunoResearch Laboratories. El Ig humana-GDM fue preparado por ImmunoGen, Lote # 1762-1750, concentración madre: 2,8 mg/ml. 5 mg/kg de este conjugado equivalen a 76 µg/kg de DM1. Maitansina: ImmunoGen, Lote # 1710-121, concentración madre = 16,38 µg/ml en PBS, pH 6,5. La solución madre de maitansina se diluyó con PBS hasta 15 µg/ml y 7,5 µg/ml. PBS: ImmunoGen, pH 6,5. Se adquirieron células de melanoma humano A375.S2 de la ATCC y se sometieron a subpases y se almacenaron en alícuotas congeladas en Centocor Cell Biology Services.

Se inocularon, por vía subcutánea, células de melanoma humano A375.S2 a ratas desnudas atímicas de nueve semanas de edad. El día 14, cuando los volúmenes tumorales medios alcanzaron los 250 mm³-300 mm³, se asignaron al azar los animales a grupos de 9/10 y se inició el tratamiento. Se inyectaron CNTO 95-DM1 y compuestos de control apropiados, por vía intravenosa (tres inyección cada dos días la primera semana, seguido de

una inyección por semana durante dos semanas los días 11, 14, 16, 21 y 28. Se registraron los tamaños de los tumores y los pesos corporales. La Fig. 6 muestra el cambio en los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo para el melanoma humano en ratones desnudos. Los volúmenes tumorales se expresan como media $\pm$ EEM (n = 9 ó 10). Las flechas indican las inyecciones de fármaco por vía intravenosa. El asterisco, que se sacrificó a un animal no respondedor, ya que su volumen tumoral era superior a 1.500 mm³. Todos los animales se sacrificaron el día 35. Los volúmenes tumorales se expresaron como media $\pm$ EEM (n = 9 ó 10). Las flechas indican la administración del fármaco por vía intravenosa. El CNT095-DM1 a 5 mg/kg bloqueaba el crecimiento tumoral y reducía el volumen tumoral medio, mientras que CNT095 a 10 mg/kg no tuvo ningún efecto en este experimento.

En un segundo experimento en ratas, los volúmenes tumorales medios alcanzaron los 250 mm³ el día 14. Los animales se agruparon al azar y la primera dosis se administró por vía intravenosa el día 14. Se proporcionaron inyecciones posteriores los días 16 y 18 de la misma semana y, a continuación, una vez por semana posteriormente el día 23 y el día 31. Todos los animales se sacrificaron el día 35. CNT095-DM1 a 5 mg/kg indujo la regresión completa de los xenoinjertos de melanoma humano A375.S2 en ratas atímicas hembra (Fig. 7). Los compuestos de control, que incluían PBS, CNT095 libre, conjugado de anticuerpo irrelevante-DM1, maitansina libre y CNT095 libre más maitansina libre no mostraron efectos significativos.

EJEMPLO 6: TRATAMIENTO CON CNT095-DM1 DE RATAS PORTADORAS DE TUMORES DERIVADOS DE CARCINOMA DE COLON HUMANO

Se investigó la eficacia de CNT0364 en comparación con CNT095 contra el carcinoma de colon humano HT29 s.c. avanzado.

CNT0364, ImmunoGen lote # 1806-50, concentración de proteína: 2,53 mg/ml, concentración de DM1: 41,8 mg/ml, relación entre DM1 y CNT095: 3,6 moles de DM1 por mol de CNT095. PBS o anticuerpo F105-DM1. Se utilizaron como controles F105-DM1; ImmunoGen lote # 1806-44, concentración de proteína: 2,2 mg/ml, concentración de DM1: 38,3 mg/ml, relación entre DM1 y F105: 3,8 moles de DM1 por mol de F105. Todos los artículos de ensayo se habían ensayado para la contaminación por endotoxinas y los valores LAL estaban por debajo de 1,0 UE/mg. La línea celular de carcinoma de colon humano HT29, que expresa integrinas avb3, avb5 y avb6, se obtuvo del banco de células de Centocor. Se determinó que esta línea celular estaba libre de micoplasmas y agentes bacterianos. Las células se cultivaron en α MEM complementado con FBS al 10%, piruvato al 1% y aminoácido no esencial MEM al 1% en presencia de CO₂ al 5% a 37°C.

En este estudio se utilizaron setenta ratas atímicas hembra obtenidas de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Se inyectaron a las ratas 5x10⁶ células HT29 por vía subcutánea (0,2 ml de 25 x 10⁶ células/ml) en el flanco trasero (lado dorsal, aproximadamente 0,5 pulgadas en dirección caudal a la última costilla y 0,5 pulgadas desde la columna vertebral). Todas las ratas se monitorizaban diariamente (días de trabajo) para la aparición de un tumor palpable. Se estratificó a los animales por el volumen del tumor individual en siete grupos, cada uno con 9 animales (Tabla 9). El volumen tumoral medio de partida para todos los grupos fue de entre 250 mm³-260 mm³.

TABLA 9

Grupo	N	CNT0364 (mg/kg)	Días de las dosis
1) PBS	9	0	7, 14, 21, 28 y 35
2) F105-DM1	9	25	7 y 14
3) CNT0364	9	3	7, 14, 21, 28 y 35
4) CNT0364	9	6	7, 14, 21, 28 y 35
5) CNT0364	9	10	7, 14, 21, 28 y 35
6) CNT0364	9	15	7, 14 y 35
7) CNT0364	9	25	7 y 14

El día del agrupamiento (día 0), se pesó a los animales y se les inyectó por vía intravenosa el control anticuerpo F105-DM1 a 25 mg/kg o CNT0364 a 3, 6, 10, 15 ó 25 mg/kg. Los artículos de ensayo y de control se proporcionaron en un volumen de 1 ml/100 g de peso corporal. Se administró CNT0364 a 3, 6 y 10 mg/kg i.v. en un programa q7dx5. Se administró CNT0364 a 15 mg/kg los días 7, 14 y 35. Se administró CNT0364 a 25 mg/kg y F105-DM1 a 25 mg/kg los días 7 y día 14. Se sacrificó a los dos últimos grupos por la significativa pérdida de peso corporal (más del 10% desde el día 0) de conformidad con las directrices del IACUC de la instalación (Fig. 8).

Las mediciones del volumen tumoral se registraron dos veces por semana. Los tumores se midieron con calibradores en dos dimensiones (longitud y anchura) en milímetros (mm). El volumen tumoral (mm³) se calculó

utilizando la fórmula $V = (\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura})/2$. Las estadísticas se realizaron con el software GraphPad Prism utilizando el ensayo t de student para muestras no relacionadas.

El CNTO 364 inhibía el crecimiento de los tumores de colon establecidos, en función de la dosis (Fig. 9). CNTO 364 a 10 mg/kg en un programa de dosificación q7dx5 produjo 3 regresiones de tumor completas y 2 regresiones parciales de cada 9 animales (Fig. 10). El tratamiento con CNTO 364 a 15 mg/kg los días 7, 14 y 35 produjo 4 regresiones completas y 4 regresiones parciales en los 9 animales portadores de tumores. Se sacrificó al grupo de control con PBS el día 35 después de la implantación de las células tumorales (volumen tumoral medio superior a 5.000 mm³). En ese momento la diferencia en los volúmenes tumorales entre los grupos tratados con CNTO 364 a 10 mg/kg y a 15 mg/kg frente al control con PBS tenían un valor de $p < 0,0001$ utilizando un ensayo t de student bilateral para muestras no relacionadas.

Dos inyecciones consecutivas para CNTO 364 a 25 mg/kg y F105-DM1 a 25 mg/kg eran tóxicas y producían una pérdida de peso corporal inaceptable (Fig. 8). Sin embargo, una sola inyección de CNTO 364 a 25 mg/kg inducía la regresión completa de los tumores de carcinoma de colon humano HT29 avanzados con un volumen tumoral medio superior a 4.000 mm³ (no mostrado)

EJEMPLO 7: TRATAMIENTO CON CNTO 95-DM1 DE RATAS PORTADORES DE TUMORES DERIVADOS DE CARCINOMA PULMONAR HUMANO

Se llevó a cabo este estudio para evaluar la eficacia *in vivo* de un conjugado de CNTO 95-DM1, en ratas hembra atímicas portadoras del carcinoma pulmonar humano A549. El CNTO 95 se preparó en Centocor, (Malvern, PA) y la conjugación de DM1 fue realizada por ImmunoGen (Cambridge, MA). El CNTO 364 (CNTO95-SPP-DM1) era como se describe en el Ejemplo 1.

Se cultivó la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 (ATCC) en MEMalfa que contenía FBS al 10% y las células se prepararon en α MEM exento de suero para la implantación subcutánea en ratas atímicas. Se implantaron a ratas hembra atímicas (6 semanas de edad, Harlan Laboratory, Indianapolis, IN) 5×10^6 células por vía subcutánea (0,2 ml de 25×10^6 células/ml) en el flanco trasero (lado dorsal, aproximadamente 0,5 pulgadas en dirección caudal a la última costilla y 0,5 pulgadas desde la columna vertebral). Cuando los volúmenes tumorales medios alcanzaron los 250 mm³, se estratificó a los animales en grupos de dosificación con volúmenes tumorales promedio similares (Tabla 10) y se trataron por vía intravenosa los días 17 y 29 después de la inyección de células tumorales.

TABLA 10

Grupo	Fármaco	Dosis los días 17 y 29
1	PBS	N/A
2	F105-DM1	15 mg/kg
3	CNTO 364	15 mg/kg
4	CNTO 95 solo	15 mg/kg
5	CNTO 95 + Maitansina	15 mg/kg + 260 microgr/kg
6	Maitansina sola	260 microgr/kg

Las mediciones del volumen tumoral se registraron dos veces por semana. Los tumores se midieron con calibradores electrónicos Vernier en dos dimensiones (longitud y anchura) en milímetros (mm). El volumen tumoral (mm³) se calculó utilizando la fórmula $V = (\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura})/2$. Los volúmenes tumorales se expresan como media $\pm$ EEM (n = 6). Estos resultados se representaron gráficamente a lo largo del tiempo, Fig. 12, donde las flechas indican el momento de las inyecciones de fármaco por vía intravenosa. El uso del peso corporal como indicador para la tolerabilidad (Fig. 11) demuestra también que el programa de dosificación de CNTO 364 utilizado en este estudio era bien tolerado por los animales, produciendo sólo un 3% de pérdida transitoria de peso corporal en el peso corporal inicial después de la primera dosificación.

Se realizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con la prueba de Bonferroni con el software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando un intervalo de confianza del 95%. Haciendo referencia a la Fig. 12: Grupo 1, PBS; grupo 2, F105-DM1 a 15 mg/kg; grupo 3, CNTO 364 a 15 mg/kg; grupo 4, CNTO 95 solo a 15 mg/kg; grupo 5, CNTO 95 a 15 mg/kg más maitansina a 260 mg/kg; grupo 6, maitansina sola a 260 mg/kg. El valor P se determinó mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. *P < 0,05, CNTO 364 v.s. F105-DM1, CNTO 95 más maitansina o maitansina sola; **P < 0,01, CNTO 364 v.s. CNTO 95 solo; *** P < 0,001, CNTO 364 v.s. PBS

La conjugación de DM1 a CNTO 95, una molécula grande, podría cambiar las propiedades farmacocinéticas de DM1 por la prolongación de la semivida de DM1 *in vivo*. Para excluir esta posibilidad, se incluyó en este estudio un inmunoconjugado de anticuerpo irrelevante F105-DM1 para determinar si la actividad del conjugado de CNTO 95-DM1 era dependiente de CNTO 95. Puesto que CNTO 95 es un compuesto antiangiogénico y antitumoral y DM1 es un agente citotóxico, es posible que la actividad antitumoral se debiese a los efectos aditivos simples de CNTO 95 libre y DM1 libre. Por lo tanto, se incluyeron como controles grupos a los que se administró CNTO 95 libre, CNTO 95 libre más maitansina libre, y maitansina libre. Como se muestra en la Fig. 13, CNTO 364 a 15 mg/kg eliminó seis de seis tumores de xenoinjerto de tumor pulmonar A549 en el programa de dosificación qx12dx2. Se observó una regresión completa del tumor en el grupo F105-DM1 y dos en el grupo CNTO 95 más maitansina. Estos resultados demuestran la superioridad del inmunoconjugado CNTO 95-DM1, CNTO 364, en la regresión del tumor pulmonar A549. Los animales tratados con CNTO364 en este régimen de dosificación mostraron una pérdida de peso corporal y toxicidad cutánea transitorias, sin signos evidentes de toxicidad grave.

EJEMPLO 8: COMPARACIÓN DE ESTRUCTURAS DEL CONJUGADO EN UN MODELO DE TUMOR DE CARCINOMA DE COLON HUMANO

Se eligió un modelo de tumor avanzado utilizando células derivadas de tumor de colon humano HT29 implantadas por vía subcutánea en ratas con inmunodeficiencia para examinar la tolerabilidad y la potencia de diversos enlaces utilizados para preparar inmunoconjugados de CNTO 95.

CNTO 95-SPP-DM1 (CNTO 364), CNTO 95-SSNPB-DM4 (CNTO 365), CNTO 95-SSNPP-DM4 (CNTO 366), y los AcMo F105 equivalentes de éstos fueron preparados por ImmunoGen (Cambridge, MA). Se obtuvieron cien ratas atímicas hembra (4-6 semanas de edad) de Harlan Laboratories.

Se cultivaron HT29 humanas (ATCC) en α MEM complementado con FBS al 10% a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Las células se prepararon a una concentración de veinticinco millones de células por ml en α MEM exento de suero para la inoculación. Se inocularon a ratas atímicas hembra 5x10⁶ células HT29 por vía subcutánea (0,2 ml de 25 x 10⁶ células/ml) en el flanco trasero (lado dorsal, aproximadamente 0,5 pulgadas en dirección caudal a la última costilla y 0,5 pulgadas desde la columna vertebral). Todas las ratas se monitorizaban dos veces por semana para la aparición del tumor. Se estratificó a los animales en 13 grupos, 6 animales por grupo en base a un volumen tumoral medio para cada grupo de aproximadamente 250 mm³. El día del agrupamiento (Día 7) cada grupo recibió su dosis inicial que se enumera en Tabla 11. Las dosis de inmunoconjugados se calcularon en base a los contenidos de DM1 o DM4 en cada conjugado. La L y la H representan 175 μ g/kg y 350 μ g/kg de DM1 o DM4, respectivamente. Todos los artículos de ensayo se proporcionaron en un volumen de 1 ml/100 g de peso corporal. A excepción del grupo 11, que recibió una sola dosis el día 7, al resto de los grupos se les administró el día 7 y el día 21. Los cambios en los volúmenes tumorales se utilizaron como indicadores de potencia (Fig. 14A y B) y los cambios en el peso corporal (FIG. 15A y B) se utilizaron para monitorizar la tolerabilidad. Todas las mediciones se expresan como la media del grupo $\pm$ EEM (n = 6).

TABLA 11

Nº de grupo	Conjugado de Ac administrado (mg/kg)	Dosis de DMx microgr/kg
1. PBS	0	0
2. F105-SPP-DM1	11,5	DM1: 175
3. F105-SPP-DM1	23	DM1: 350
4. F105-SSNPB-DM4	10	DM4: 175
5. F105-SSNPB-DM4	20	DM4: 350
6. F15-SSNPP-DM4	10,5	DM4: 175
7. F105-SSNPP-DM4	21	DM4: 350
8. CNTO 364	10	DM1: 175
9. CNTO 364	20	DM1: 350
10. CNTO 365	10	DM4: 175
11. CNTO 365	20	DM4: 350
12. CNTO 366	12	DM4: 175
13. CNTO 366	24	DM4: 350

Los animales a los que se inoculó CNTO 365 y F105-SSNPB-DM4 a 350 microgr/kg de DM4 perdieron más del 10% del peso corporal original después de la primera dosificación, como se muestra en la Fig. 14B. Por lo tanto, se interrumpió la dosificación en estos dos grupos después de una inyección. La pérdida de > 10% del peso corporal fue transitoria y los animales se recuperaron en un plazo de 10 días desde la interrupción del tratamiento. Se trató a los grupos restantes el día 7 y el día 21 y no se observó pérdida significativa de peso corporal, a excepción del grupo de CNTO 364 a dosis alta, en el que los animales perdieron más de un 10% de peso corporal. No se había observado pérdida de peso significativa en otros experimentos utilizando CNTO 364 con este programa de dosificación. Como se muestra en la Fig. 14B, una sola inyección de CNTO 365 a dosis alta indujo la regresión completa del carcinoma de colon HT29 humano sc establecido en 4 de 6 animales. CNTO 364 a dosis alta (350 microgr/kg de DM1) y CNTO 365 a dosis baja (175 microgr/kg de DM4) también indujo la regresión de tumores de colon preformados (2 de 6 animales en cada grupo respectivamente) o inhibió significativamente el crecimiento de los tumores de colon HT29. Sin embargo, CNTO 364 a dosis baja (175 microgr/kg de DM1) y CNTO 366 a ambas dosis no tuvieron ningún efecto significativo en el tamaño del tumor. Estos resultados sugieren que CNTO 365 tiene mayor potencia y eficacia que CNTO 364 y CNTO 366 cuando se administra i.v. en un programa q14dx2 en este modelo de xenoinjerto de tumor.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centocor, Inc.
 Trikha, Mohit
 Qiming, Chen

<120> INMUNOCONJUGADOS ANTI-INTEGRINA, MÉTODOS Y USOS
 <130> CEN 50??

<140> TBD
 <141> 04-11-2004

<160> 9
 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

5
 Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

10
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15
 <400> 4

20
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

25
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 5

35
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

40
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45
 <400> 6

50
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 1 5

55
 <210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60
 <400> 7

65

ES 2 539 126 T3

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

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

15 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

25 Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30 Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

35 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

40 <210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 8

ES 2 539 126 T3

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

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

20 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

30 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

35 <210> 9
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 9

Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
 20 25 30
 Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
 35 40 45
 Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
 50 55 60
 Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
 65 70 75 80
 Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
 85 90 95
 Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
 100 105 110
 Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
 115 120 125
 Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
 130 135 140
 Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
 165 170 175
 Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190
 Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205
 Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr

225		230		235		240
Arg Thr Ala Gln	Ala Ile Phe Asp Asp	Ser Tyr Leu Gly Tyr	Ser Val			
	245	250	255			
Ala Val Gly Asp	Phe Asn Gly Asp Gly	Ile Asp Asp Phe	Val Ser Gly			
	260	265	270			
Val Pro Arg Ala	Ala Arg Thr Leu Gly Met	Val Tyr Ile Tyr	Asp Gly			
	275	280	285			
Lys Asn Met Ser	Ser Leu Tyr Asn Phe Thr	Gly Glu Gln Met	Ala Ala			
	290	295	300			
Tyr Phe Gly Phe	Ser Val Ala Ala Thr Asp	Ile Asn Gly Asp	Asp Tyr			
305	310	315	320			
Ala Asp Val Phe	Ile Gly Ala Pro Leu Phe	Met Asp Arg Gly	Ser Asp			
	325	330	335			
Gly Lys Leu Gln	Glu Val Gly Gln Val	Ser Val Ser Leu	Gln Arg Ala			
	340	345	350			
Ser Gly Asp Phe	Gln Thr Thr Lys Leu	Asn Gly Phe Glu	Val Phe Ala			
	355	360	365			
Arg Phe Gly Ser	Ala Ile Ala Pro Leu Gly	Asp Leu Asp Gln	Asp Gly			
	370	375	380			
Phe Asn Asp Ile	Ala Ile Ala Ala Pro Tyr	Gly Gly Glu Asp	Lys Lys			
385	390	395	400			
Gly Ile Val Tyr	Ile Phe Asn Gly Arg	Ser Thr Gly Leu	Asn Ala Val			
	405	410	415			
Pro Ser Gln Ile	Leu Glu Gly Gln Trp	Ala Ala Arg Ser	Met Pro Pro			
	420	425	430			
Ser Phe Gly Tyr	Ser Met Lys Gly Ala Thr	Asp Ile Asp Lys	Asn Gly			
	435	440	445			
Tyr Pro Asp Leu	Ile Val Gly Ala Phe	Gly Val Asp Arg	Ala Ile Leu			
	450	455	460			

Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
 485 490 495
 Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
 500 505 510
 Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
 515 520 525
 Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
 565 570 575
 Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg
 580 585 590
 Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu
 595 600 605
 Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu
 610 615 620
 Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val
 625 630 635 640
 Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr
 645 650 655
 Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu
 660 665 670
 Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg
 675 680 685

Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn
 690 695 700
 Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly
 705 710 715 720
 Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu
 725 730 735
 Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu
 740 745 750
 Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val
 755 760 765
 Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe
 770 775 780
 Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu
 785 790 795 800
 Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly
 805 810 815
 Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys
 820 825 830
 Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly
 835 840 845
 Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys
 850 855 860
 Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln
 865 870 875 880
 Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu
 885 890 895
 Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
 900 905 910

Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
915 920 925

Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln
930 935 940

Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
945 950 955 960

Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
965 970 975

Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
980 985 990

Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu
995 1000 1005

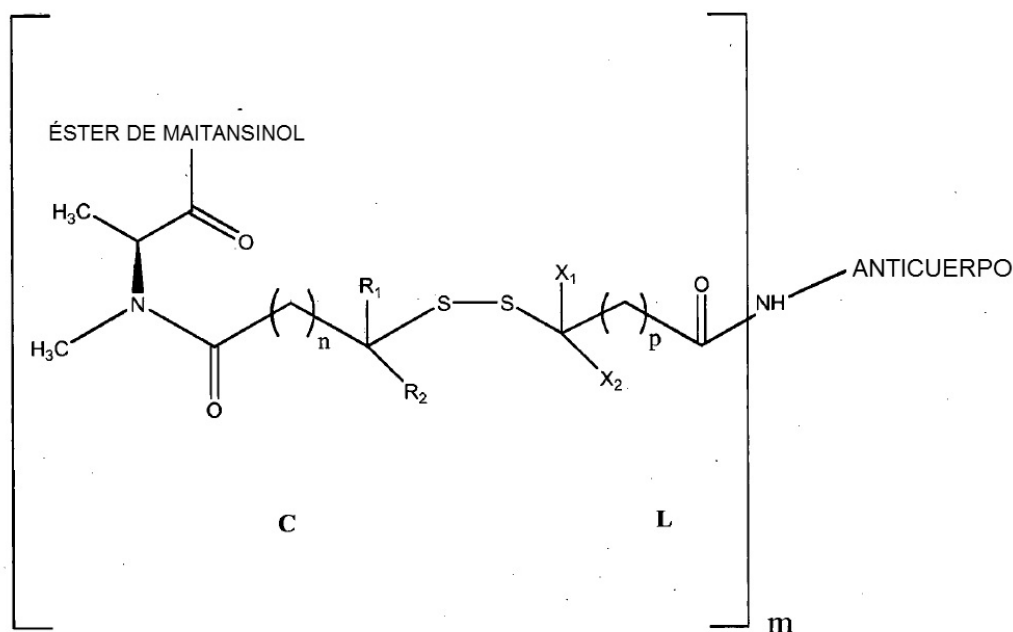
Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg
1010 1015 1020

Val Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro
1025 1030 1035

His Glu Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
1040 1045

Reivindicaciones

1. Conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende: un anticuerpo que se une a una subunidad alfaV de un receptor integrina humano heterodimérico conjugado a un agente citotóxico con una CI_{50} de 10^{-9} M o menos, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una línea celular de cáncer que expresa integrina alfaV, de fórmula:



en el que el anticuerpo es un anticuerpo específico contra la subunidad de integrina alfaV humana, en el que dicho anticuerpo es capaz de ser internalizado por la célula que expresa dicha subunidad alfaV; en el que el maitansinol está esterificado en C-3; R_1 , R_2 , X_1 y X_2 son independientemente H, Me, C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un resto arilo heterocíclico, o un resto heterocicloalquilo; n es 1 - 5; p es 1 - 5; y m es de 1 a 10, y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo compite por la unión a la integrina alfaV humana con el anticuerpo monoclonal CNTO 95 o un fragmento del mismo.

3. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la molécula de anticuerpo es el anticuerpo monoclonal CNTO 95 o un anticuerpo recombinante que tiene al menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de CNTO 95 que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1-6 o sustituciones conservadoras de al menos una CDR.

4. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal compite con el AcMo CNTO 95 que se une a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana.

5. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la molécula de anticuerpo es específica para un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

6. Conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

7. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el número medio de residuos citotóxicos unidos a la molécula de anticuerpo es de entre 3 y 4.

8. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1 en el que n = 2, R_1 y R_2 son ambos metilo, X_1 y X_2 son H y p es 2.

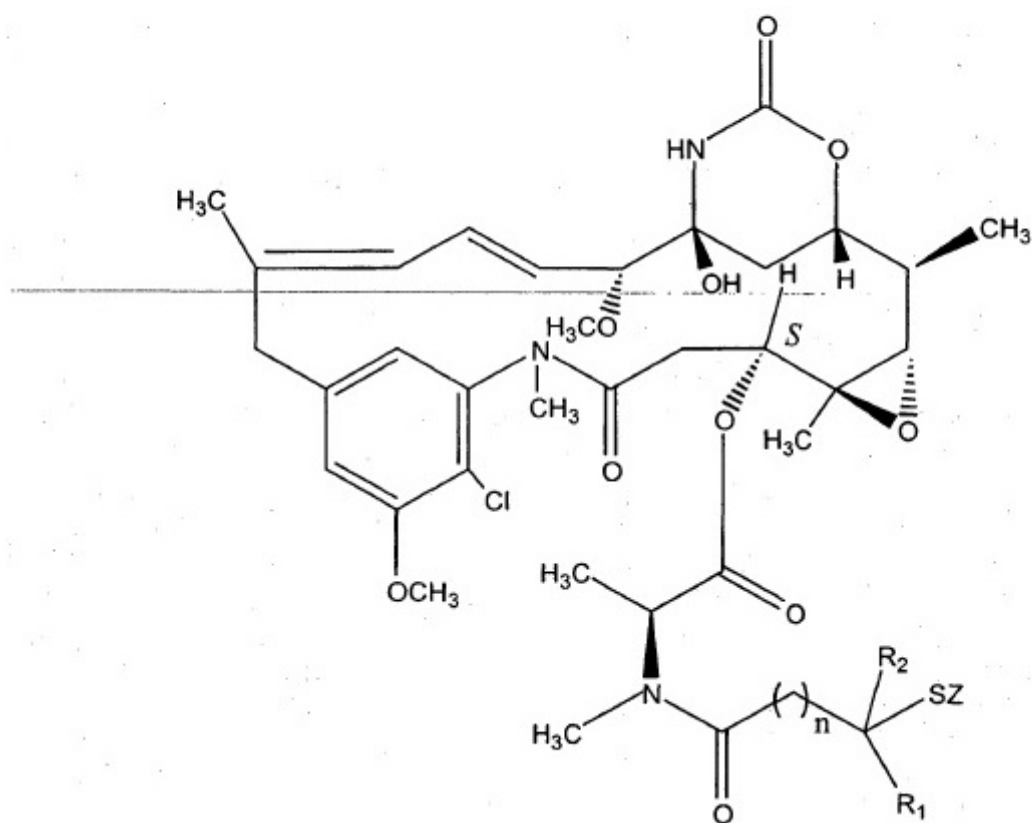
9. Método de producción de un conjugado según la reivindicación 1, que comprende las etapas: (a) introducir uno o más grupos tiol libres o protegidos en una molécula de anticuerpo que se une a una subunidad alfaV de un receptor

integrina humano heterodimérico; (b) hacer reaccionar la molécula de anticuerpo de la etapa (a) con un compuesto que es un agente citotóxico con una Cl_{50} de 10^{-9} M o menos, teniendo dicho compuesto uno o más grupos tiol o disulfuro; y (c) recuperar el conjugado resultante, en el que el compuesto tóxico es un maitansinoide.

- 5 10. Método según la reivindicación 9, en el que se utiliza éster de N-hidroxisuccinimida del ácido (2-piridil)-3-ditiopropanoico (SPDP), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido (2-piridil)-4-ditiopentanoico (SPP) o éster de N-hidroxisuccinimida del ácido (2-piridil)-4-ditiobutanoico (SPDB) para introducir los grupos tiol libres o protegidos en la molécula de anticuerpo.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en medicina, preferentemente para uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 13. Conjugado según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento del adenocarcinoma de mama, el adenocarcinoma pulmonar, el adenocarcinoma de páncreas, el adenocarcinoma de colon, el carcinoma de células renales o el adenocarcinoma de estómago.
- 20 14. Conjugado según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, el carcinoma de células escamosas del esófago, el carcinoma de células escamosas del pulmón, el carcinoma de células escamosas de la piel o el carcinoma de células escamosas del cuello uterino.
- 25 15. Conjugado según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o la prevención de la propagación metastásica del cáncer.
16. Conjugado de anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que impide que CNTO 95 se una a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana para uso en medicina, preferentemente para su uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en un mamífero.
- 30 17. Conjugado para su uso según la reivindicación 16, en el que el conjugado de anticuerpo se administrará por vía intravenosa.
- 35 18. Conjugado para su uso según la reivindicación 17, en el que el conjugado de anticuerpo se administrará en una cantidad de 0,05 mg/kg a 12,0 mg/kg de peso corporal.
19. Conjugado para su uso según la reivindicación 16, en el que el mamífero es un paciente humano.
- 40 20. Conjugado de anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que impide que CNTO 95 se una a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero con una enfermedad dependiente de la angiogénesis seleccionada del grupo que consiste en la metástasis cancerosa, el angioma, el angiofibroma, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, el glaucoma neovascular, una enfermedad corneal inducida por la angiogénesis, la involución macular, la degeneración macular, el pterigio, la degeneración retiniana, la fibroplasia retrolental, la conjuntivitis granular, la psoriasis, la telangiectasia, el granuloma piógeno, la dermatitis seborreica, el acné y la artritis.
- 45 21. Conjugado de anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que impide que CNTO 95 se una a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana para su uso en la mejora de una enfermedad inflamatoria en un mamífero, en la que dicha enfermedad inflamatoria está seleccionada del grupo que consiste en la artritis reumatoide, la degeneración macular, la psoriasis, la retinopatía diabética.
- 50 22. Conjugado de anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que impide que CNTO 95 se una a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana para tratar un trastorno cutáneo angiogénico seleccionado del grupo que consiste en la psoriasis, las úlceras venosas, el acné, la rosácea, las verrugas, el eczema, los hemangiomas y la linfangiogénesis.
- 55 23. Conjugado de anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que impide que CNTO 95 se una a las células vivas que expresan integrina alfaVbeta3 humana para tratar un trastorno que implica la neovascularización de la córnea o de la retina.
- 60 24. Conjugado para su uso según la reivindicación 22 ó 23 en el que el conjugado de anticuerpo se administra en combinación con un segundo agente o modalidad terapéutica o profiláctica.
- 65 25. Artículo de fabricación que comprende la composición de conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un recipiente, y que comprende adicionalmente un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede utilizarse para tratar una enfermedad **caracterizada por** células que expresan integrina con subunidad alfaV.

26. Artículo de fabricación según la reivindicación 25 en el que el prospecto indica que la composición puede utilizarse para tratar el cáncer.
- 5 27. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que $n = 2$, R_1 y R_2 son ambos metilo.
28. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende (i) todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena pesada de CNTO 95 como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 2, y 3, y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de la CDR de la
- 10 cadena ligera de CNTO 95 como se muestra en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.
29. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 28, en el que al menos una de las secuencias de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de CNTO 95 como se muestra en la SEQ ID NO: 7.
- 15 30. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 28, en el que al menos una de las secuencias de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera de CNTO 95 como se muestra en la SEQ ID NO: 8.
- 20 31. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de CNTO 95 como se muestra en la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera de CNTO 95 como se muestra en la SEQ ID NO: 8.
- 25 32. Conjugado de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal CNTO 95.
- 30

Fig 1.



$n \geq 1$

$R_1, R_2, R_3 = H, Me, C_2H_5$, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocicloalquilo, aromático heterocíclico

$Z = H, SR_3$

DM1 $n = 1, R_1, R_2 = H, Z = H$

DM3 $n = 2, R_1 = H, R_2 = Me, Z = H$

DM4 $n = 2, R_1, R_2 = Me, Z = H$

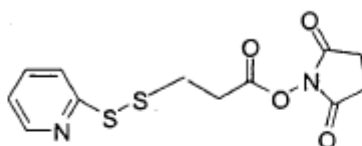
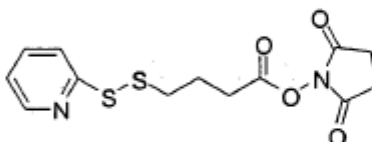
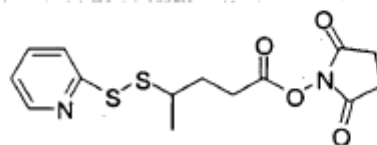
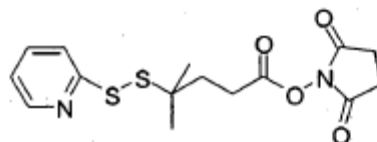
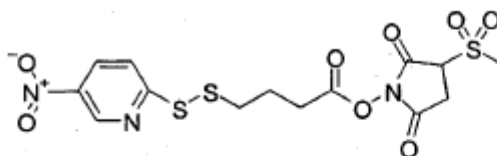
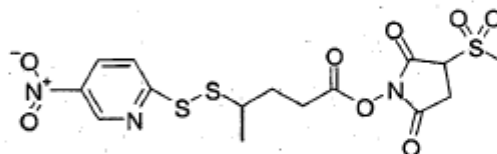
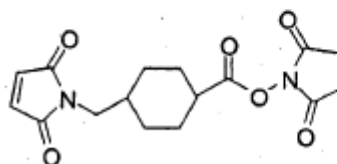
*Fig. 2***SPDP****SPDB****SPP****SMNP****SSNPB****SSNPP****SMCC**

Fig. 3

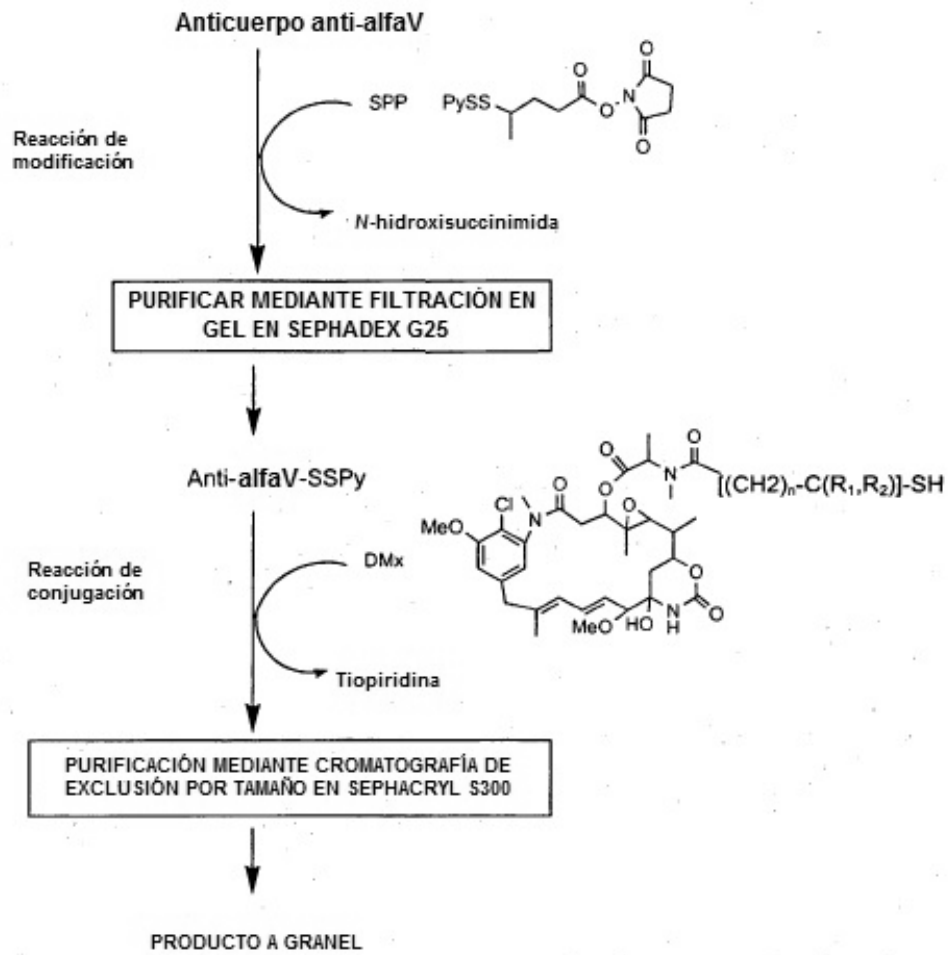


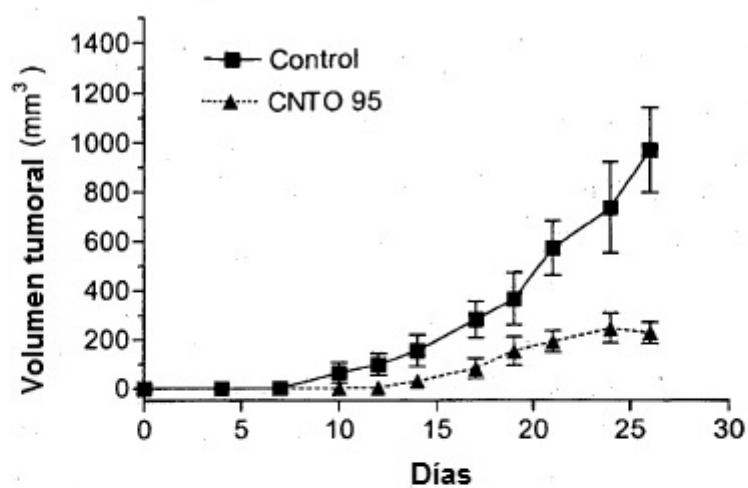
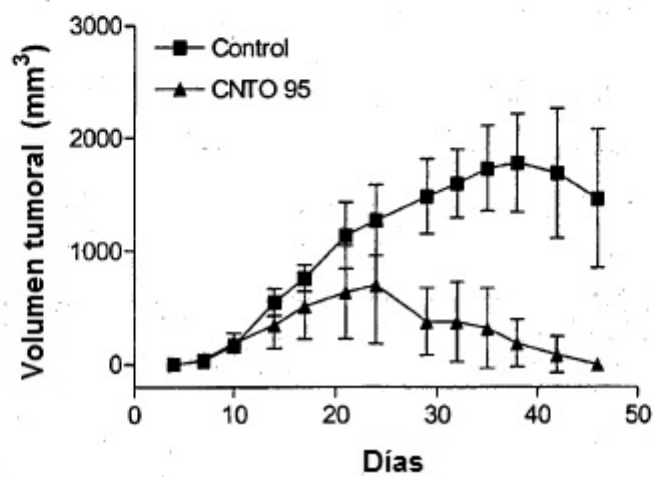
FIG. 4**FIG. 5**

Fig. 6

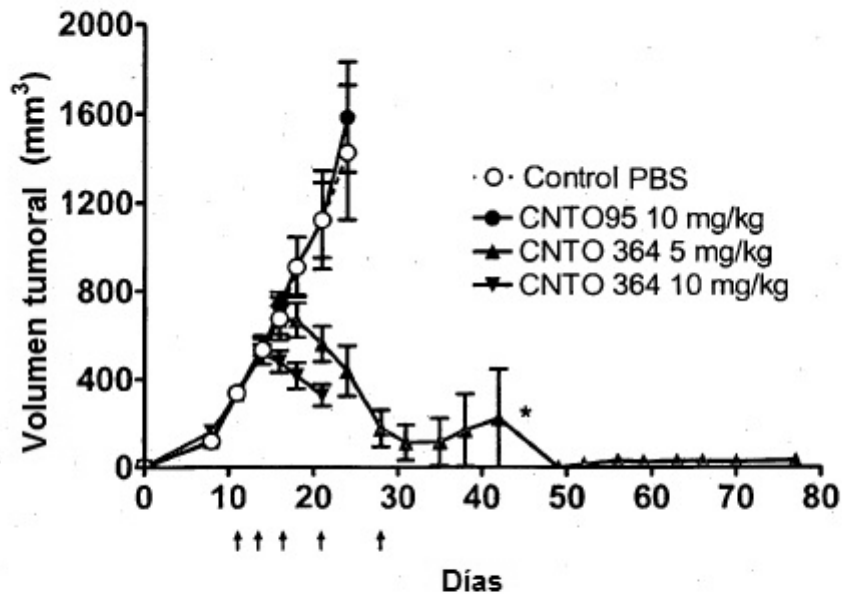


Fig. 7

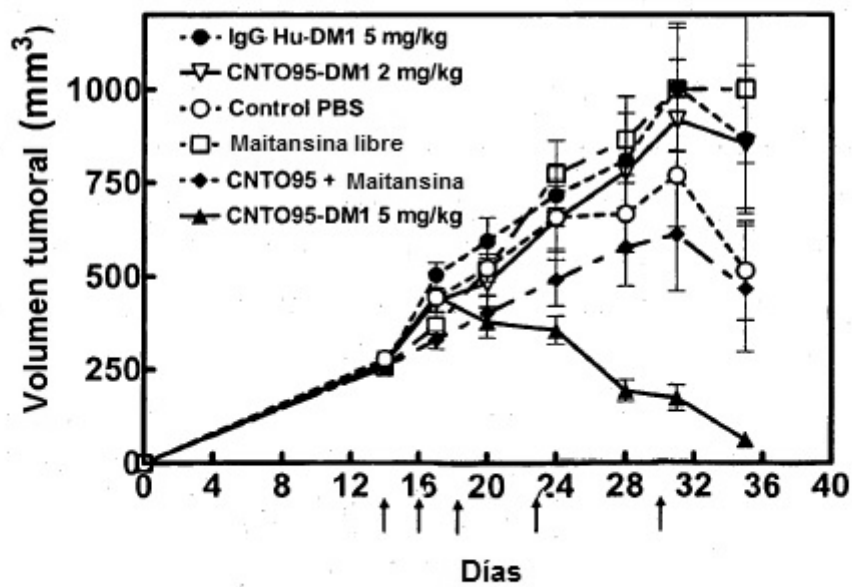


Fig.8

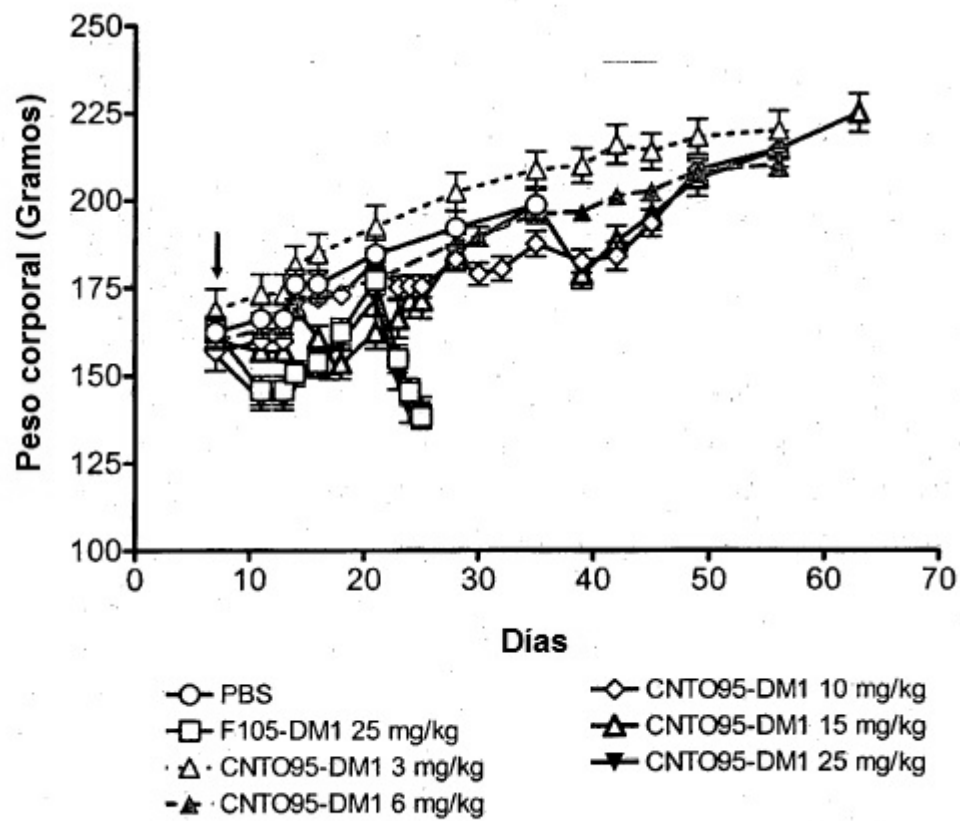


Fig. 9

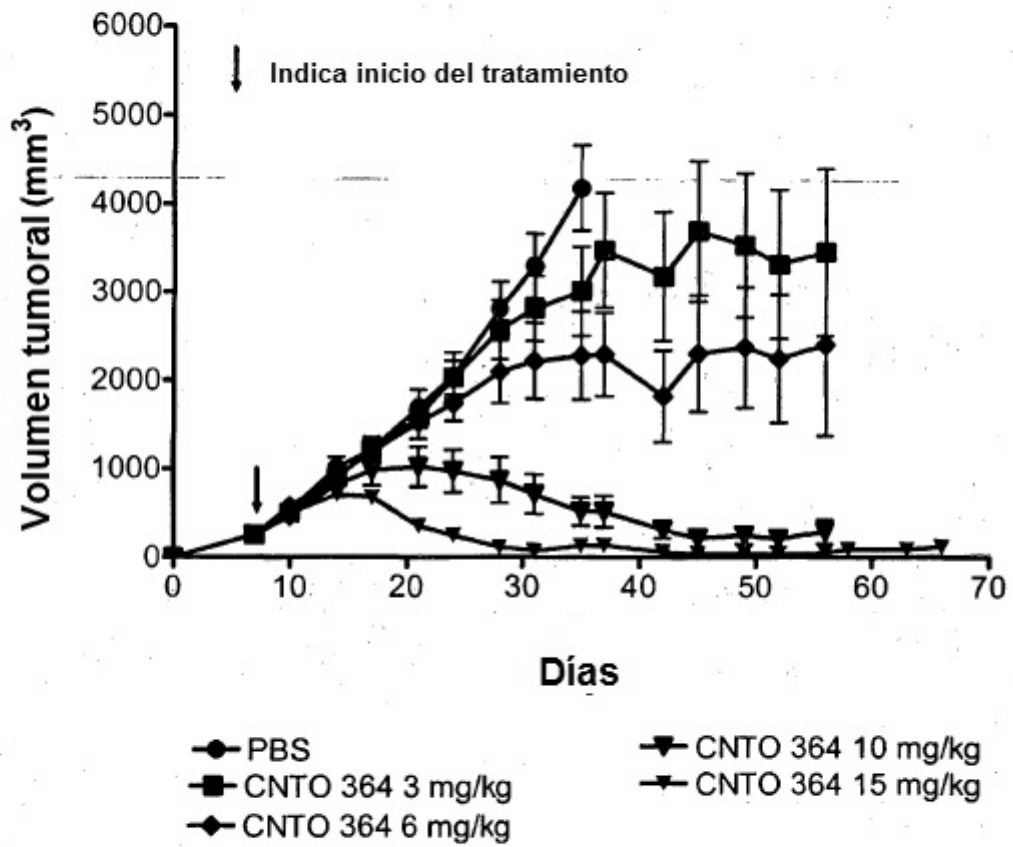


Fig. 10

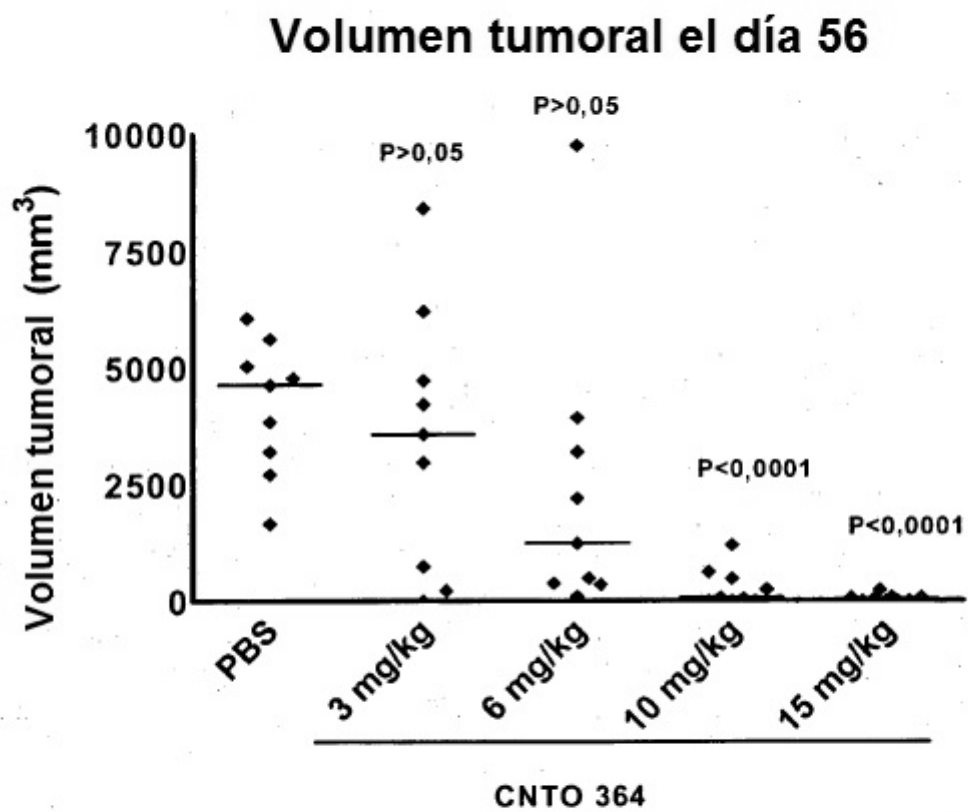


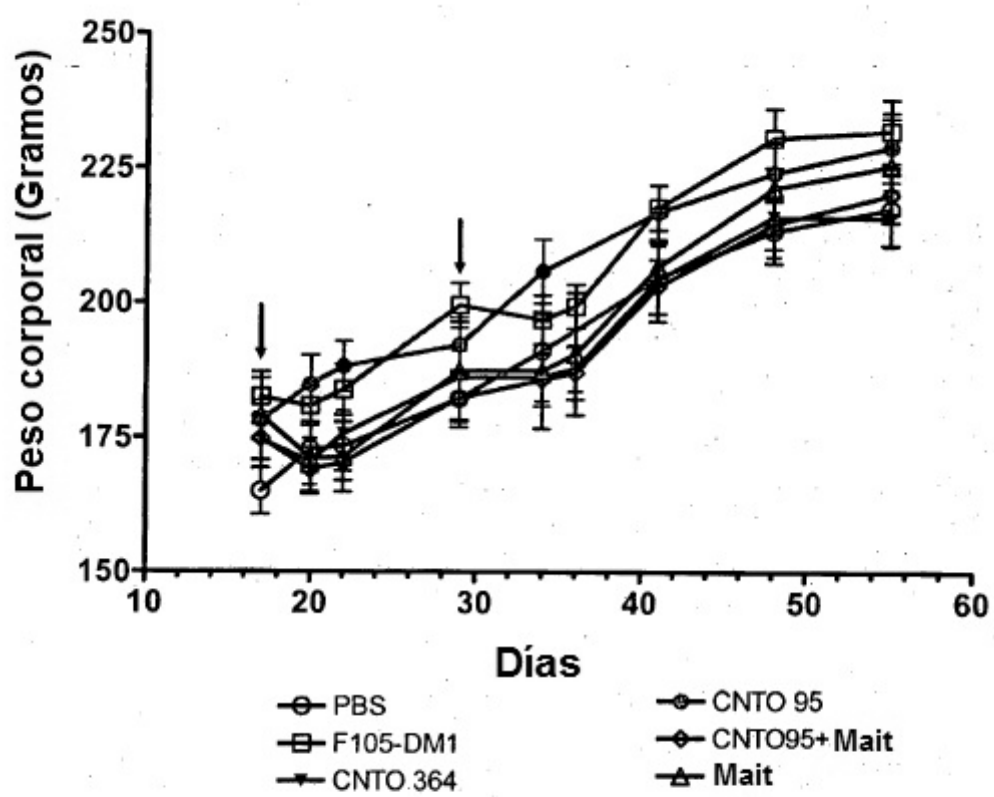
Fig. 11

Fig. 12

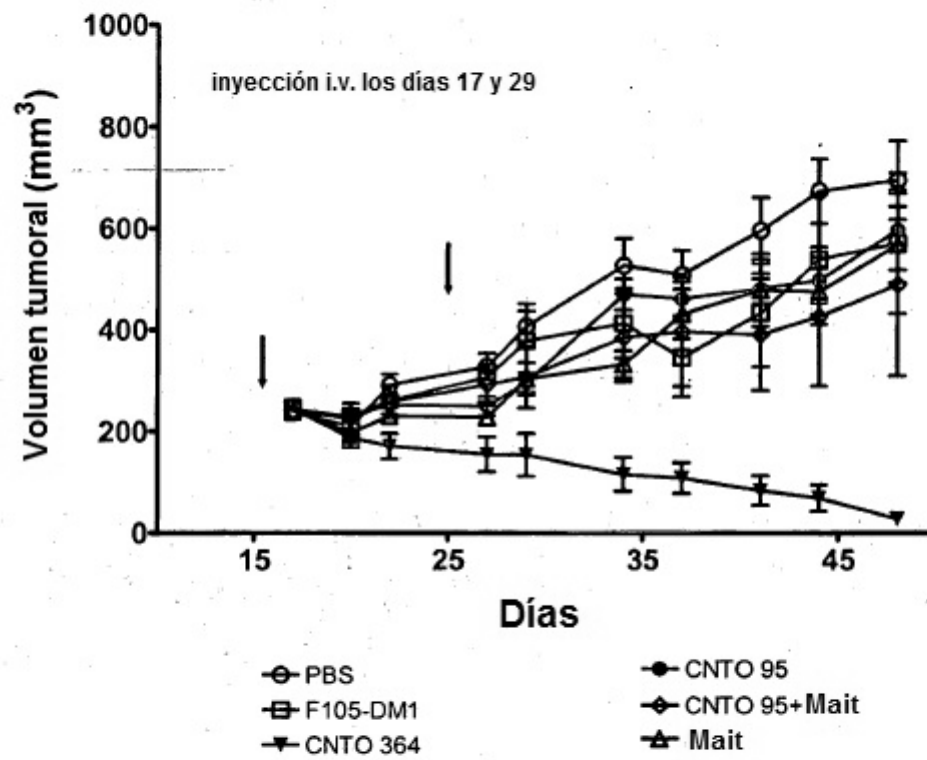


Fig. 13

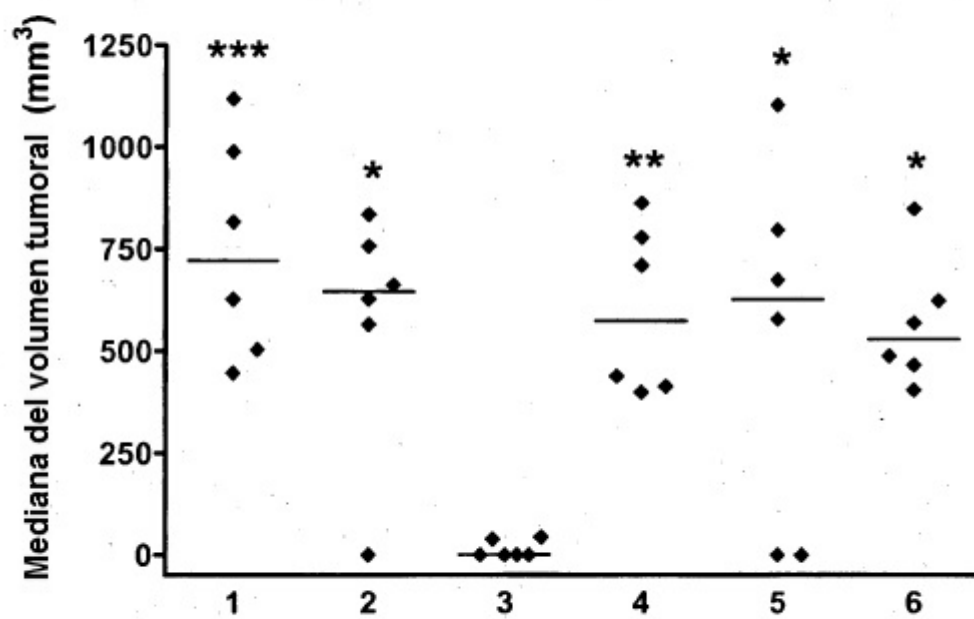


FIG. 14A

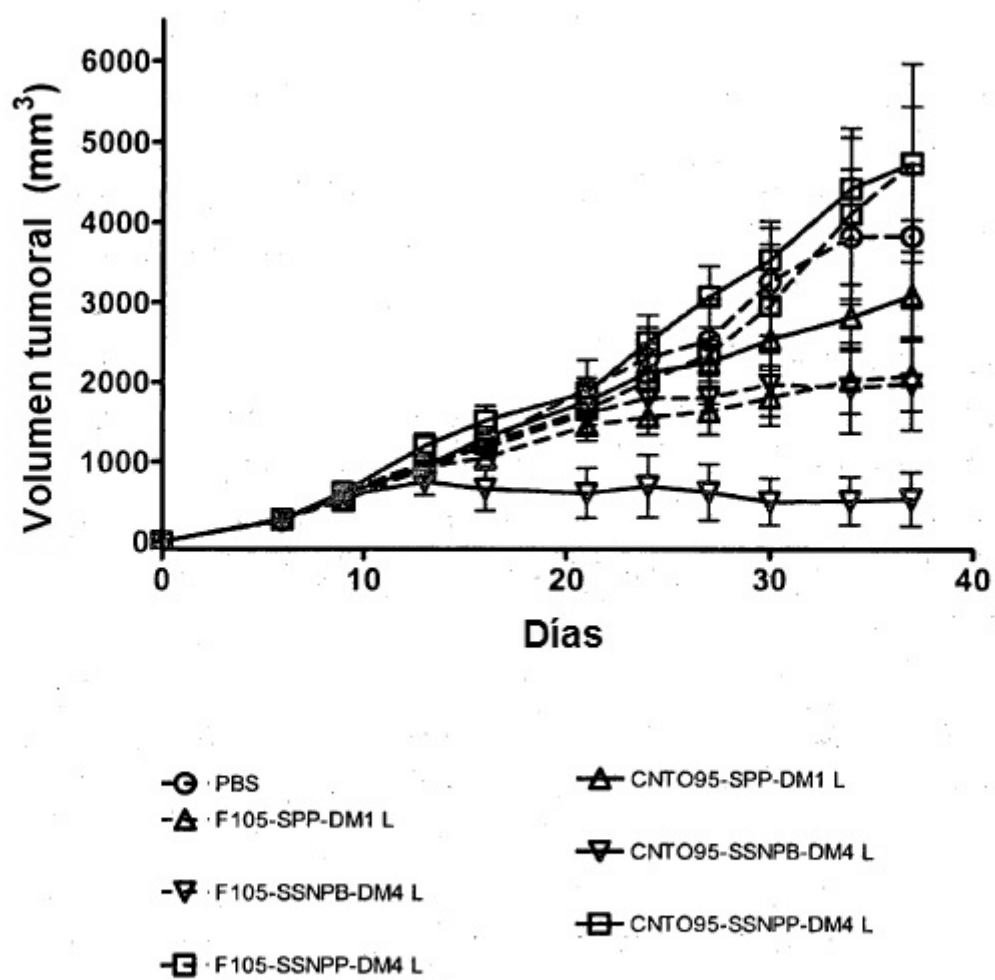
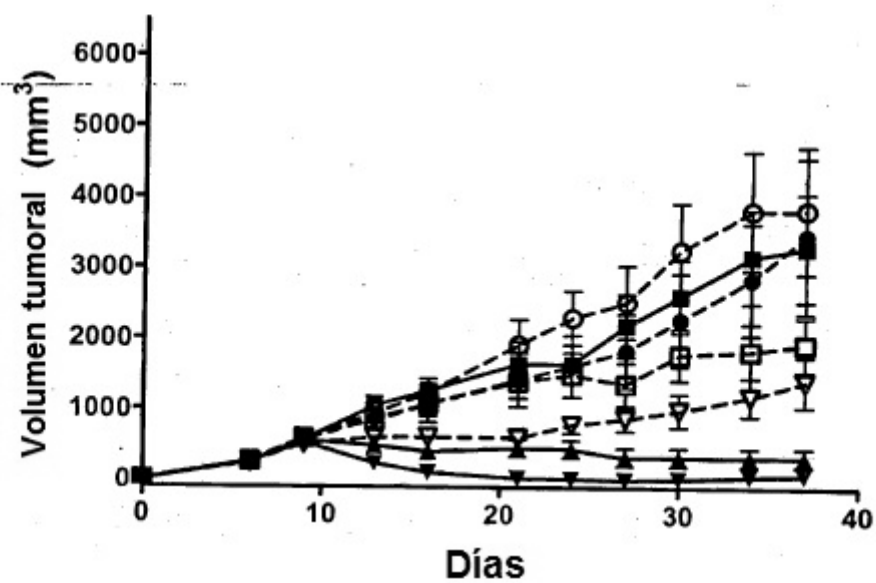


FIG. 14B



○ PBS

□ F105-SPP-DM1 H

▽ F105-SSNPB-DM4 H

● F105-SSNPP DM4 H

▲ CNTO95-SPP-DM1 H

▼ CNTO95-SSNPB-DM4 H

■ CNTO95-SSNPP-DM4 H

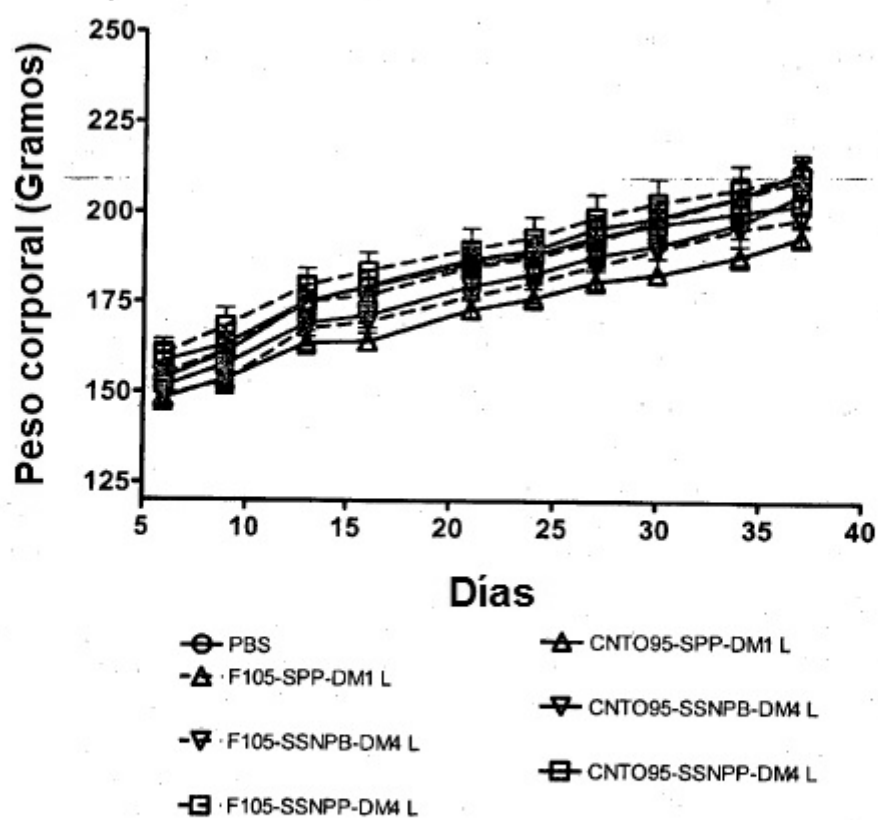
Fig. 15A

Fig. 15B

