

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 348**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2005 E 05777870 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 1786449**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades hiperproliferativas con un superantígeno en combinación con un agente citostático**

30 Prioridad:

13.08.2004 US 601548 P

13.08.2004 SE 0402025

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

05.10.2015

73 Titular/es:

ACTIVE BIOTECH AB (100.0%)

SCHEELEVÄGEN 22, BOX 724

220 07 LUND, SE

72 Inventor/es:

HEDLUND, GUNNAR;

FORSBERG, GÖRAN y

WALL N-ÖHMAN, MARIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 348 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades hiperproliferativas con un superantígeno en combinación con un agente citostático

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un tratamiento para el cáncer que implica un superantígeno y un fármaco citostático.

10 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de tratamientos eficaces de tumores malignos sigue siendo un desafío, a pesar del alentador progreso durante las últimas décadas. Hoy en día, el tratamiento usado más comúnmente para el cáncer metastatizado avanzado implica el uso de fármacos citostáticos, en ocasiones uno o más en combinación. Los fármacos citostáticos afectan a las células en proliferación interfiriendo con procesos fundamentales de la multiplicación celular, induciendo de este modo la detención celular o la muerte celular. Las dianas incluyen ADN, el metabolismo de nucleótidos, enzimas relacionadas con la integridad del ADN y el citoesqueleto. Un grupo de fármacos citostáticos que se ha demostrado que son eficaces para el tratamiento del cáncer comprende agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, antibióticos citostáticos, compuestos basados en platino e inhibidores de la topoisomerasa.

Los superantígenos son bacterianos, proteínas virales y ahora, moléculas humanas modificadas por ingeniería genética, capaces de activar a los linfocitos T a concentraciones picomolares. Se unen directamente al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sin procesarse. Los superantígenos se unen sin procesar fuera del surco de unión a antígeno en las moléculas del CMH de clase II, evitando de este modo la mayor parte del polimorfismo en el sitio de unión a péptidos convencional. Los superantígenos se unen a la cadena V β del receptor de células T (TCR), en vez de unirse a los bucles hipervariables del receptor de células T (TCR) y activan a las células T. Por lo tanto, cuando se administra un superantígeno a un animal, tal como un ser humano, se activa de manera no específica un subconjunto de células T por el superantígeno, a diferencia de la administración de un antígeno "regular", que activaría específicamente solo a un pequeño subconjunto de células T. Los ejemplos de superantígenos bacterianos incluyen, pero sin limitación, enterotoxina estafilocócica (SE), exotoxina de *Streptococcus pyogenes* (SPE), toxina del síndrome de choque séptico de *Staphylococcus aureus* (TSST-1), exotoxina mitogénica estreptocócica (SME), superantígeno estreptocócico (SSA), enterotoxina A estafilocócica (SEA) y enterotoxina E estafilocócica (SEE).

Tal como se discute en más detalle a continuación y en las solicitudes de patente y patentes de Estados Unidos indicadas, los superantígenos pueden modificarse, por ejemplo, modificando las secuencias de ADN que codifican a los superantígenos, de tal forma, por ejemplo, que codifican superantígenos modificados que tienen propiedades terapéuticas mejoradas. Por ejemplo, los superantígenos modificados pueden tener unión reducida a antígenos de la clase II del CMH en comparación con superantígenos de tipo silvestre no modificados, dando como resultado una toxicidad sistémica reducida, y/o pueden tener una serorreactividad reducida y/o una capacidad reducida para inducir una respuesta de anticuerpos en comparación con los superantígenos de tipo silvestre, dando como resultado una reducción en los encuentros con y en las dificultades potenciales con, los anticuerpos del hospedador. Un ejemplo de un superantígeno modificado es SEA/E (por ejemplo, SEA/E-120), descrito detalladamente más adelante, que se une a antígenos de clase II del CMH para activar células T (por ejemplo, aquel de SEA de tipo silvestre) y tiene serorreactividad reducida (por ejemplo, menor que SEE de tipo silvestre).

En algunas realizaciones de la presente invención, un resto de direccionamiento, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede conjugarse a un superantígeno (de tipo silvestre o modificado), proporcionando un superantígeno dirigido. Si el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo reconocen a un antígeno asociado a tumores, el superantígeno dirigido puede denominarse superantígeno dirigido a tumores ("TTS"). Los superantígenos dirigidos mantienen la capacidad para activar a un gran número de linfocitos T y añaden la capacidad para dirigir a los linfocitos activados a células que portan el resto diana. Por ejemplo, las moléculas TTS activan a grandes números de células T y las dirigen a tejidos que contienen el antígeno asociado a tumores que se reconoce por el resto de direccionamiento. Al hacerlo, pueden eliminarse las células diana específicas, dejando al resto del organismo relativamente no dañado. Dicha terapia de "bala mágica" es muy deseada en la técnica, ya que los agentes anticáncer no específicos, tales como radiación y los fármacos quimioterapéuticos citostáticos y citotóxicos no son específicos y eliminan a grandes cantidades de células que no están asociadas con los tumores que van a tratarse. Por ejemplo, los estudios con TTS han demostrado que la inflamación por linfocitos T citotóxicos (CTL) en el tejido tumoral aumenta rápidamente en respuesta a la primera inyección de un superantígeno dirigido (Dohlsten et al., 1995). Esta inflamación con infiltración de CTL en el tumor es uno de los efectores principales de la terapéutica antitumoral de los superantígenos dirigidos.

Los agentes anticáncer, tales como fármacos citostáticos y radiación, funcionan generalmente afectando o previniendo la división celular. Ya que no son específicos, por ejemplo, todas las células en división en un animal tratado, tal como un ser humano, se ven afectadas. Esto da como resultado típicamente efectos secundarios adversos extremos derivados del tratamiento con quimioterapia, tales como alteraciones gastrointestinales, pérdida del

cabello y daño al sistema inmunitario, que se conocen notoriamente bien, tanto por los expertos en la materia como por la población en general.

Muchos aspectos del sistema inmune están caracterizados por células en división. Por ejemplo, en una respuesta inmune, la etapa de expansión de inmunocitos necesaria está caracterizada por la proliferación de células inmunitarias. Esta proliferación es fundamental y esencial para una respuesta inmunitaria productiva. Ya que los agentes citostáticos afectan a las células en división, se sabe que los agentes citostáticos son perjudiciales para el sistema inmunitario. De hecho, un sistema inmunitario comprometido es uno de los efectos secundarios más graves y comunes del tratamiento del cáncer con fármacos quimioterapéuticos.

Por otra parte, la inmunoterapia se basa en un sistema inmunitario funcional. (Chen 2003; Le Poole et al., 2003). Las terapias inmunes, tales como vacunas tumorales, se basan en una respuesta inmunitaria funcional en un paciente tratado. Por ejemplo, para una respuesta inmunitaria productiva a una vacuna tumoral, tienen que activarse los linfocitos T y B, expandirse y diferenciarse en cantidades suficientes de células efectoras (Le Poole et al., 2003; Chen 2003). Por supuesto, esto requiere de división celular. Además, es elevadamente probable que dicha respuesta inmunitaria también necesite que la proliferación de inmunocitos se repita una segunda vez para alcanzar una respuesta antitumoral productiva (Tester y Mora, 2001).

Un experto en la materia, por lo tanto, no esperará que la inmunoterapia sea compatible con los agentes anticancerosos, tales como agentes citostáticos que afectan a la división celular. Se espera que la inmunoterapia requiera de división celular en el sistema inmunitario y se sabe que los agentes citostáticos afectan o evitan la división celular.

Por lo tanto, antes del advenimiento de la presente invención, no se esperaba que fuese posible combinar inmunoterapia con agentes anticancerosos, tales como fármacos citostáticos o citocidas. Los solicitantes entienden que la presente invención es la primera vez que se ha hecho uso eficaz de la inmunoterapia en el contexto del tratamiento del cáncer, tal como con fármacos citostáticos o citotóxicos. Tal como se explica a continuación, los presentes inventores han descubierto que la inmunoterapia con superantígenos no solo es compatible con agentes anticancerosos, tales como fármacos citostáticos, sino que de hecho, la coordinación de la dosificación de estos dos agentes proporciona resultados anticancerosos sinérgicos. Además, esta terapia de combinación proporciona el beneficio de reducir la producción de anticuerpos en una persona tratada para los superantígenos.

Técnica anterior

El documento WO 03/002143 A1 divulga un superantígeno para su uso en el tratamiento del cáncer.

El documento WO 03/094846 A2 divulga efectos antitumorales obtenidos a partir del uso combinado de un superantígeno y quimioterapia.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un superantígeno y a un fármaco citostático para su uso en el tratamiento de un cáncer en un mamífero, tal como un ser humano. La presente invención se refiere al descubrimiento de que la terapia con superantígeno y un fármaco citostático puede combinarse para dar como resultado efectos de tratamiento sinérgicos y a la producción de anticuerpos reducida en el hospedador tratado para la terapia de superantígeno.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren al uso de un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para la producción de una preparación farmacéutica para reducir la respuesta de un anticuerpo al superantígeno dirigido a tumores en un mamífero en comparación con la administración del superantígeno solo, a la vez que no se inhibe o incluso se potencia la respuesta de células T del superantígeno dirigido a tumores en el mamífero, donde dicha preparación farmacéutica es para el tratamiento del cáncer.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso en el tratamiento del cáncer, donde la administración combinada del superantígeno dirigido a tumores y del fármaco citostático reduce una respuesta de anticuerpos al superantígeno dirigido a tumores en un mamífero en comparación con la administración del superantígeno solo, a la vez que no se inhibe o incluso se potencia la respuesta de células T del superantígeno dirigido a tumores en el mamífero.

El fármaco citostático puede seleccionarse entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, antibióticos antitumorales y compuestos basados en platino.

En determinadas realizaciones, el agente alquilante se selecciona entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, busulfán, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, carmustina y lomustina.

Además, el antimetabolito puede seleccionarse entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, gemcitabina y pemetrexed.

5 Más particularmente, el antibiótico antitumoral se selecciona entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina, actinomicina D y bleomicina.

En realizaciones adicionales, el inhibidor mitótico se selecciona entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina y etopósido.

10 Además, el compuesto basado en platino se selecciona entre el grupo que consiste en, pero sin limitación, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

15 En determinadas realizaciones, el mamífero, por ejemplo un ser humano, padece una enfermedad hiperproliferativa, donde la enfermedad hiperproliferativa se define además como cáncer. Más particularmente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en, pero sin limitación, cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata.

20 En determinadas realizaciones de la presente invención, el superantígeno se administra en una cantidad de desde 0,001 hasta 500 µg/kg de peso corporal del sujeto.

25 En algunas realizaciones, el superantígeno se administra antes de la administración del agente anticancerígeno. En algunas realizaciones el superantígeno se administra parcialmente de manera simultánea con la administración del agente anticancerígeno. En algunas realizaciones el superantígeno se administra de manera simultánea con la administración del agente anticancerígeno. Además, en algunas realizaciones de la presente invención, el superantígeno se administra posteriormente a la administración del agente anticancerígeno. En todas las realizaciones de la invención, el superantígeno y el agente anticáncer son tal como se definen en las reivindicaciones.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, se administra en primer lugar un fármaco citostático y se administra un superantígeno cuando el nivel del fármaco citostático disminuye hasta el punto que ya no es citostático. En algunas realizaciones, se administra en primer lugar un fármaco citostático y un superantígeno se administra de 0 a 6 días después de la administración del agente citostático. En determinadas realizaciones de la invención, se administra en primer lugar un fármaco citostático y se administra un superantígeno de 12-72 horas después de la administración del agente citostático. En algunas realizaciones, se administra en primer lugar un fármaco citostático y se administra un superantígeno a los 0 a 6 días después de que el nivel del fármaco citostático disminuya hasta el punto que ya no sea citostático. En algunas realizaciones de la invención, se administra en primer lugar un fármaco citostático y se administra un superantígeno a las 0-72 horas después de que el nivel del fármaco citostático disminuya hasta el punto que ya no sea citostático. Además, en algunas realizaciones se administra en primer lugar el fármaco citostático y se administra un superantígeno a las 12-72 horas después de que el nivel del fármaco citostático disminuya hasta el punto que ya no sea citostático.

45 En algunas realizaciones de la invención se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 0 a 6 días entre sí. En algunas realizaciones, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 0-72 horas entre sí. En algunos casos, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 3-4 meses entre sí. Opcionalmente, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 1 mes entre sí. Además, en algunos casos dentro del ámbito de la presente invención, el superantígeno y el fármaco citostático se administran con una diferencia de 2 semanas entre sí. Además, en algunas realizaciones se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 1 semana entre sí. Asimismo, en algunas realizaciones se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 7-10 días entre sí. Además, en algunos casos se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 0-30 días entre sí. Opcionalmente, en algunas realizaciones se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 1-10 días entre sí. En otras realizaciones, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 0-72 horas entre sí. En algunas realizaciones, se administran un superantígeno y un agente anticáncer con una diferencia de 0-24 horas entre sí. En otras realizaciones adicionales, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno con una diferencia de 0-12 horas entre sí.

60 En determinadas realizaciones preferidas, se administran un superantígeno y un agente anticancerígeno en dosificación secuencial. En algunas realizaciones de administración en dosificación secuencial, se administra un superantígeno en primer lugar. Además, en algunas realizaciones de administración en dosificación secuencial, se administra un agente anticancerígeno en primer lugar. En algunas realizaciones de administración en dosificación secuencial, la dosificación secuencial sigue un patrón seleccionado entre los siguientes o aproximaciones del mismo, donde A = superantígeno y B = agente anticancerígeno: A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B; B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A; B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A; y A/A/B/A.

65

En determinadas realizaciones de administración en dosificación secuencial, la administración de un superantígeno y la administración de un agente anticancerígeno se separan por 0-6 días. En determinadas realizaciones de dosificación secuencial, la administración de un superantígeno y la administración de un agente anticáncer están separadas por 0-72 horas.

5 La enfermedad hiperproliferativa se asocia con la formación de tumores u otras formas de concentraciones localizadas de células hiperproliferativas.

10 En realizaciones preferidas de la presente invención, el cáncer que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en tumores de cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata. En realizaciones preferidas, se trata a un ser humano para un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata. Las realizaciones más preferidas incluyen el tratamiento de un ser humano que tiene tumores asociados con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata, con un superantígeno que es un superantígeno bacteriano estafilocócico de tipo silvestre o modificado fusionado a un resto de direccionamiento. En realizaciones aún más preferidas, se trata a un ser humano que tiene uno de los cánceres anteriormente descritos con el superantígeno 5T4Fab-SEA/E-120 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y un agente anticancerígeno seleccionado entre el grupo que consiste en gemcitabina o docetaxel.

20 La invención puede usarse en kits que comprenden un primer envase que contiene al superantígeno y un segundo envase que contiene al agente anticancerígeno. Dichos kits son para el tratamiento de una enfermedad de un mamífero de acuerdo con las reivindicaciones, que en realizaciones preferidas es un ser humano. En una realización preferida, el superantígeno es 5T4Fab-SEA/E-120 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y el agente anticancerígeno se selecciona entre el grupo que consiste en gemcitabina o docetaxel.

Breve descripción de los dibujos

30 Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace ahora referencia a las siguientes descripciones tomadas en conjunto con su dibujo adjunto, donde:

Las FIG. 1A-1D muestran un esquema que muestra realizaciones ejemplares de la presente invención referentes a la administración de TTS y un agente quimioterapéutico a un animal, tal como un ser humano. La FIG. 1A muestra la administración de un agente quimioterapéutico antes de la administración de TTS. La FIG. 1B muestra la administración de TTS antes de la administración de un agente quimioterapéutico. La FIG. 1C muestra la administración de un agente quimioterapéutico seguida de la administración de TTS seguida de la administración simultánea de TTS y un agente quimioterapéutico. La FIG. 1D muestra la administración de TTS seguida de la administración simultánea de TTS y un agente quimioterapéutico.

40 La FIG. 2 es un esquema que muestra realizaciones de la presente invención referentes a la administración de TTS y un agente quimioterapéutico a un animal, tal como un ser humano.

La FIG. 3 es una comparación de los superantígenos SEA, SEE y SEA/E-120.

La FIG. 4 demuestra que el tratamiento con docetaxel (TAXOTERE®) potencia la sensibilidad de las células tumorales a SADCC inducida por ABR-217620.

45 La FIG. 5 muestra la actividad de CTL en esplenocitos en bruto de ratones tratados secuencialmente con gemcitabina a varias dosis y después con Fab-SEA. Se administró a los ratones (3 ratones/grupo) cuatro inyecciones de gemcitabina a las dosis indicadas cada tres días (días 1, 4, 7 y 10) seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 µg/animal), comenzando en el día 16. 48 horas después de la última inyección, se extirparon los bazo y se midió la función citotóxica (SDCC) contra células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional. La relación de células efectoras a diana fue de 100:1. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales.

50 Las FIG. 6A-6D muestran dinámicas de linfocitos T de esplenocitos de ratones tratados secuencialmente con gemcitabina a varias dosis y después con Fab-SEA. Se administró a los ratones (3 animales/grupo) cuatro inyecciones de gemcitabina a las dosis indicadas cada tres días (días 1, 4, 7 y 10) seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 µg/animal), comenzando en el día 16. 48 horas después de la última inyección, se extrajeron los bazo y se midió la expansión de células CD4⁺ y CD8⁺ específica de V_β3. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 individuos. La FIG. 6A muestra la expansión de células T CD4⁺ V_β3 (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 6B muestra la expansión de células T CD4⁺ V_β8 (de control) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 6C muestra la expansión de células T CD8⁺ V_β3 (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 6D muestra la expansión de células T CD8⁺ V_β8 (de control) usando diversas concentraciones de gemcitabina.

65 Las FIG. 7A-7B muestran la dinámica de células T de esplenocitos de ratones tratados secuencialmente con gemcitabina y después con Fab-SEA. Se inyectó a los ratones (3 ratones/grupo) con gemcitabina (0, 1, 2,4 mg/ratón) cada tres días durante cuatro (rombos rellenos) o siete dosis (rombos huecos), seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 µg/animal), comenzando 6 días después de la

última inyección de gemcitabina. 48 horas después de la última inyección, se extrajeron los bazo y se midió la expansión de células CD4 y CD8 específica de $V\beta 3$. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales. La FIG. 7A muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones y pautas de dosificación de gemcitabina. La FIG. 7B muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones y pautas de dosificación de gemcitabina. La FIG. 7C muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones y pautas de dosificación de gemcitabina. La FIG. 7D muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones y pautas de dosificación de gemcitabina.

La FIG. 8 muestra la actividad de CTL en esplenocitos en bruto de ratones tratados secuencialmente con 4 a 7 dosis de gemcitabina y después con Fab-SEA. Se inyectó a los ratones (3 animales/grupo) con gemcitabina (0, 1, 2,4 mg/ratón) cada tres días durante cuatro (rombos rellenos) o siete dosis (rombos huecos), seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$), comenzando 6 días después de la última inyección de gemcitabina. 48 horas después de la última inyección, se extirparon los bazo y se midió la función citotóxica (SDCC) contra células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional. La relación de células efectoras a diana fue de 100:1. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales.

Las FIG. 9A-9D muestran la dinámica de células T de esplenocitos de ratones tratados secuencialmente con gemcitabina y después con Fab-SEA. Se inyectó a los ratones (3 ratones/grupo) con gemcitabina (2,4 mg/ratón) cada tres días durante cuatro dosis (días 1, 4, 7 y 10), seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$), comenzando a diferentes intervalos de tiempo después de la última inyección de gemcitabina. 48 horas después de la última inyección, se extrajeron los bazo y se midió la expansión de células CD4 y CD8 específica de $V\beta 3$. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales. La FIG. 9 muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 9B muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 9C muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de gemcitabina. La FIG. 9D muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones de gemcitabina.

La FIG. 10 muestra la actividad de CTL en esplenocitos en bruto de ratones tratados secuencialmente con gemcitabina y después con Fab-SEA. Se inyectó a los ratones (3 ratones/grupo) con gemcitabina (2,4 mg/ratón) cada tres días durante cuatro dosis (días 1, 4, 7 y 10), seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$), comenzando a diferentes intervalos de tiempo después de la última inyección de gemcitabina. 48 horas después de la última inyección, se extirparon los bazo y se midió la función citotóxica (SDCC) contra células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional. La relación de células efectoras a diana fue de 100:1. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales.

Las FIG. 11 muestran la actividad de CTL en esplenocitos en bruto de ratones tratados secuencialmente con docetaxel a varias dosis y después con Fab-SEA. Se administró a los ratones (3 animales/grupo) una inyección i.p. de docetaxel a las dosis indicadas seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$), comenzando en el día 1 después del tratamiento citostático. 48 horas después de la última inyección de Fab-SEA, se extirparon los bazo y se midió la función citotóxica (SDCC) contra células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional. La relación de efectoras a diana fue de 100:1. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales.

Las FIG. 12A-12D muestran dinámicas de linfocitos T de esplenocitos de ratones tratados secuencialmente con docetaxel a varias dosis y después con Fab-SEA. Se administró a los ratones (3 animales/grupo) una inyección i.p. de docetaxel a las dosis indicadas seguido de tratamiento con tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$), comenzando en el día 1 después del tratamiento citostático. 48 horas después de la última inyección de Fab-SEA, se extrajeron los bazo y se midió la expansión de células CD4 y CD8 específica de $V\beta 3$. Los puntos de datos representan resultados de ratones individuales, así como las líneas de tendencia representan valores promedio de 3 ratones individuales. La FIG. 12A muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de docetaxel. La FIG. 12B muestra el número de células T $CD4^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones de docetaxel. La FIG. 12C muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 3$ (reactivas a SEA) usando diversas concentraciones de docetaxel. La FIG. 12D muestra el número de células T $CD8^+ V\beta 8$ (de control) usando diversas concentraciones de docetaxel.

A continuación, se hace referencia a varias secuencias que incluyen al superantígeno C215Fab-SEA que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 y/o codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 9; al superantígeno 5T4Fab-SEAD227A que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6 y/o codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 8; al superantígeno 5T4Fab-SEA/E-120 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y/o codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 10.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas para tratar a mamíferos, por ejemplo, seres humanos, mediante la administración de un superantígeno y un agente anticancerígeno de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Los inventores han descubierto que la administración combinada de superantígenos (que puede denominarse una forma de inmunoterapia) con agentes anticancerígenos, tales como fármacos citostáticos, da como resultado un efecto anticáncer potenciado para ambos agentes, en comparación con cuando se administra cada agente por separado. Además, esta terapia combinada da como resultado una respuesta de anticuerpos reducida para el superantígeno, en comparación con la administración del superantígeno solo, que ayuda al tratamiento, especialmente en los casos donde se desea administrar superantígenos varias veces a lo largo de un ciclo de tratamiento.

I. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "un", "una" o "uno" pueden significar uno o más. Tal como se usa en el presente documento conjuntamente con la palabra "comprende", las palabras "un", "una" o "uno" significan uno o más de uno. Tal como se usa en el presente documento, "otro" significa al menos un segundo o más. Por ejemplo, una afirmación, tal como "tratamiento con un superantígeno y un agente citostático", ya se encuentre en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones de la presente solicitud puede significar tratamiento: con un superantígeno y un agente anticancerígeno; con más de un superantígeno y un agente anticancerígeno; con un superantígeno y más de un agente anticancerígeno; con más de un superantígeno y más de un agente anticancerígeno; o con varias otras combinaciones de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina, que es capaz de unirse específicamente a un objeto específico, tales como, por ejemplo, un epítipo o un antígeno. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que un anticuerpo se refiere ampliamente a cualquier agente de unión inmunogénica, tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, así como a anticuerpos sintéticos y modificados, así como a anticuerpos de o derivados de diversos animales, tales como, pero sin limitación, seres humanos, ratones y llamas. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunoactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos completamente humanizados (Bird et al., 1988).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad", "trastorno" y "afección" describen cualquier afección o enfermedad de un mamífero, por ejemplo, pero sin limitación, un ser humano y se pretende que tengan una cobertura extensa, abarcando todos los tipos de enfermedades y trastornos, incluyendo, pero sin limitación, cánceres, neoplasias y otros tipos de enfermedades y trastornos hiperproliferativos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "agente" y "fármaco" pueden ser intercambiables. Por ejemplo, en los casos donde sea evidente a partir del contexto, las expresiones "agentes citostáticos" o "agentes anticancerígenos" pueden tener el mismo significado que las expresiones "fármacos citostáticos" y "fármacos anticancerígenos", respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, melanoma, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides malignas. Los ejemplos de cánceres más particulares incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad hiperproliferativa" se define como una enfermedad que es el resultado de una hiperproliferación de células. Las enfermedades hiperproliferativas ejemplares incluyen, pero sin limitación, cáncer o enfermedades autoinmunes. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cánceres, tales como melanoma, de pulmón no microcítico, microcítico de pulmón, pulmón, hepatocarcinoma, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, de encías, de lengua, leucemia, neuroblastoma, de

cabeza, de cuello, de mama, pancreático, de próstata, renal, de huesos, testicular, de ovario, mesotelioma, de cuello de útero, gastrointestinal, linfoma, de cerebro, de colon, sarcoma o cáncer de vejiga. El cáncer puede incluir un tumor compuesto de células tumorales. En otras realizaciones, la enfermedad hiperproliferativa es artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, artrosis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, lesiones pre-neoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma *in situ*, leucoplasia vellosa oral o psoriasis.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se define como una molécula que provoca (suscita, induce o causa) una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmune puede implicar producción de anticuerpos, la activación de determinadas células, tales como, por ejemplo, células inmunocompetentes específicas o ambas. Un inmunógeno puede derivarse de muchos tipos de sustancias, tales como, pero sin limitación, moléculas de organismos, tales como, por ejemplo, proteínas, subunidades de proteínas, células completas eliminadas o inactivadas o lisadas, moléculas sintéticas y una amplia variedad de otros agentes, tanto biológicos como no biológicos. Por lo tanto, un experto en la materia se dará cuenta de que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas, pueden servir como inmunógenos. Además, los inmunógenos pueden proceder de ADN recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" está relacionado con la capacidad de un inmunógeno para provocar (susitar, inducir o causar) una respuesta inmunitaria. Como se conoce en la técnica, diferentes moléculas pueden tener diferentes grados de inmunogenicidad y se sabe que una molécula que tenga una inmunogenicidad que sea mayor en comparación con otra molécula, por ejemplo, es capaz de provocar (susitar, inducir o causar) una respuesta inmunitaria mayor que la de un agente que tenga una inmunogenicidad menor. Como se conoce en la técnica, determinados agentes pueden no tener inmunogenicidad.

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se define como la molécula que es reconocida por los anticuerpos, células inmunocompetentes específicas o ambas. Un antígeno puede derivarse de muchos tipos de sustancias, tal como, pero sin limitación, moléculas de organismos, tales como, por ejemplo, proteínas, subunidades de proteínas, células completas eliminadas o inactivadas o lisadas, moléculas sintéticas y una amplia variedad de otros agentes, tanto biológicos como no biológicos. Por lo tanto, un experto en la materia se dará cuenta de que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas, pueden servir como antígenos. Además, los antígenos pueden proceder de ADN recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "antigenicidad" está relacionado con la capacidad de un antígeno para ser reconocido por anticuerpos, células inmunocompetentes específicas o ambas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "complejo mayor de histocompatibilidad" o "CMH", se define como una agrupación específica de genes, muchos de los cuales codifican proteínas de superficie celular relacionadas evolutivamente implicadas en la presentación de antígenos, que se encuentran entre los determinantes más importantes de la histocompatibilidad. El CMH de clase I o CMH-1, funciona principalmente en la presentación de antígenos a linfocitos T CD8. El CMH de clase II o CMH-II, funciona principalmente en la presentación de antígenos a linfocitos T CD4.

Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugado" o "fusionado" significa unido, e incluye la unión por cualquier medio, incluyendo, pero sin limitación, por medios químicos (por ejemplo, conjugación química), mediante expresión génica recombinante (por ejemplo, una proteína de fusión) y por medios no covalentes, de manera permanente o no permanente, incluyendo, pero sin limitación, los términos fusión o fusionado, e incluyendo la unión de uno o más artículos, objetos, moléculas o similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado", por ejemplo, "derivado de", incluye, pero sin limitación, por ejemplo, moléculas de tipo silvestre derivadas de hospedadores biológicos, tales como bacterias, virus y células y organismos eucariotas y moléculas modificadas, por ejemplo, modificadas por medios químicos o producidas en sistemas de expresión recombinantes.

Tal como se usa en el presente documento, el término "envase", significa cualquier medio de contención y no está limitado a cualquier medio o dispositivo de contención particular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "neoplasia" o "células neoplásicas" se refieren a células que se multiplican de una manera anormal. Las neoplasias pueden clasificarse como benignas, histoides, malignas, multicéntricas mixtas, organoides o unicéntricas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "serorreactivo", "serorreacción" o "serorreactividad" se definen como la capacidad de un agente, tal como una molécula, para reaccionar con anticuerpos en el suero de un mamífero, tal como, pero sin limitación, un ser humano. Esto incluye reacciones con todos los tipos de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos específicos para la molécula y anticuerpos no específicos que se unen a la molécula, independientemente de si los anticuerpos inactivan o neutralizan al agente. Como se conoce en la técnica, diferentes agentes pueden tener diferentes serorreactividades en relación al otro, donde un agente que tiene una

serorreactividad menor que el otro puede, por ejemplo, reaccionar con menos anticuerpos y/o tener una menor afinidad y/o averse por anticuerpos que un agente que tenga una serorreactividad mayor. Esto también puede incluir la capacidad del agente para provocar una respuesta inmune de anticuerpos en un animal, tal como un mamífero, tal como un ser humano.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor soluble de células T" o "TCR soluble" se refiere a un receptor de células T "soluble" que consiste en las cadenas de un receptor de longitud completa (por ejemplo, unido a membrana), excepto en que, mínimamente, la región transmembrana de las cadenas de receptor se eliminan o mutan de tal forma que el receptor, cuando se expresa por una célula, no se asociará con la membrana.
10 Típicamente, un receptor soluble consistirá únicamente en los dominios extracelulares de las cadenas del receptor de tipo silvestre (por ejemplo, carece de los dominios transmembrana y citoplásmicos).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "superantígeno" se define como una clase de moléculas que estimula a un subconjunto de células T uniéndose a moléculas de la clase II del CMH y a dominios V β de receptores de células T, estimulando la activación de células T que expresan segmentos génicos V particulares de V β . Este término incluye superantígenos de tipo silvestre y naturales, por ejemplo, aquellos aislados a partir de determinados virus de bacterias o expresados a partir de genes no modificados de los mismos, así como de superantígenos modificados, en los que, por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica un superantígeno se ha modificado por ingeniería genética, por ejemplo, pero sin limitación, para producir una proteína de fusión con un resto de
20 direccionamiento, y/o para alterar determinadas propiedades del superantígeno, tal como, pero sin limitación, su unión a la clase II del CMH (por ejemplo, para reducir la afinidad) y/o su serorreactividad, y/o su inmunogenicidad, y/o antigenicidad (por ejemplo, para reducir su serorreactividad). Esta definición incluye moléculas sintéticas que tienen las propiedades de un superantígeno tal como se ha descrito en el presente documento. Esta definición incluye los superantígenos, incluyendo de tipo silvestre y modificados y superantígenos conjugados/fusionados/dirigidos descritos en las siguientes patentes y solicitudes de patente de Estados Unidos:
25 Patentes de Estados Unidos N° 5.858.363, 6.197.299, 6.514.498, 6.713.284, 6.692.746, 6.632.640, 6.632.441, 6.447.777, 6.399.332, 6.340.461, 6.338.845, 6.251.385, 6.221.351, 6.180.097, 6.126.945, 6.042.837, 6.713.284, 6.632.640, 6.632.441, 5.859.207, 5.728.388, 5.545.716, 5.519.114, las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con N° de serie 08/765.695 (presentada el 25 de julio de 1997), 10/283.838 (presentada el 20 de octubre de 2002)
30 (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030092894), 09/463.470 (presentada el 21 de enero de 2000) y 09/900.766 (presentada el 6 de julio de 2001) (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030039655), las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 20040142464, 20030157113, 20030124142, 20030036644, 20030009015, 20020177551, 20020141981, 20020115190, 20020086813, 20020058032, 20020051765, 20020039585, 20020028211, 20020018781, 20010046501, 60/378.988, 60/389.366, 60/406.697, 60/406.750,
35 60/415.310, 60/415.400 y 60/438.686 y la Publicación Internacional PCT número WO/03/094846.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "resto de direccionamiento" se define como cualquier estructura que es capaz de unirse a una estructura de la superficie celular, preferentemente una estructura específica de una enfermedad. El resto de direccionamiento es normalmente distinto del epítipo de la cadena V β al
40 que se une el superantígeno y de los epítopos de la clase II del CMH a los que se unen los superantígenos. Los restos de direccionamiento ejemplares comprenden, pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y similares, receptores solubles de células T, interleucinas, hormonas y factores de crecimiento.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "superantígeno dirigido a tumores" (en ocasiones citado en el presente documento como "TTS") se define como una molécula que comprende uno o más superantígenos (tal como se definen en el presente documento) unidos, fusionados o conjugados con uno o más restos de direccionamiento (tal como se definen en el presente documento). Los ejemplos no limitantes de superantígenos dirigidos a tumores incluyen, pero sin limitación, C215Fab-SEA (SEC ID N° 5), 5T4Fab-SEA/E-120 (SEC ID N° 7) y 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEC ID N° 6).

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de células T" se define como un receptor que es específico para células T. Esta definición incluye expresamente el entendimiento del término tal como se conoce en la técnica, e incluye, por ejemplo, un receptor que consiste en un heterodímero unido por disulfuro de las cadenas α o β altamente variables expresadas en la membrana celular en forma de un complejo con las cadenas CD3 invariables y un receptor formado por cadenas variables γ y δ expresadas en la membrana celular en forma de complejo con CD3 en un subconjunto de células T.
55

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "tumor" se refiere a una concentración, reunión u otra organización localizada de células en hiperproliferación (hiperproliferativas) (incluyendo, pero sin limitación a células hiperproliferativas localizadas en una vaina (teca) u órgano), incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación a células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, células precancerosas y células cancerosas.

65 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se define como la cantidad de la composición farmacéutica que produce al menos cierto efecto en el tratamiento de una enfermedad o de una afección. Por ejemplo, en una combinación de acuerdo con la invención, una cantidad eficaz es la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento de células de una neoplasia *in vivo*. La cantidad eficaz de

principios activos usados para poner en práctica la presente invención para el tratamiento terapéutico de neoplasias (por ejemplo, cáncer) varía dependiendo del modo de administración, de la edad, del peso corporal y de la salud general del sujeto. La determinación de la cantidad adecuada y de la pauta de dosificación por parte de un médico o veterinario tratante se encuentra dentro de las capacidades de la técnica. Dichas cantidades pueden citarse como cantidades "eficaces". Estos términos incluyen, pero sin limitación, situaciones sinérgicas, tales como aquellas presentadas y descritas en la presente invención en las que un solo agente individualmente, tal como un superantígeno o un agente anticancerígeno, tal como un fármaco quimioterapéutico, pueden actuar débilmente o en absoluto, pero que cuando se combinan entre sí, por ejemplo, pero sin limitación, mediante dosificación secuencial, dos o más agentes actúan para producir un resultado sinérgico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe el crecimiento de una neoplasia" se refiere a frenar, detener o revertir de manera medible la velocidad de crecimiento de la neoplasia o células neoplásicas *in vitro* o *in vivo*. De manera deseable, la velocidad de crecimiento se frena en un 20 %, 30 %, 50 % o 70 % o más, según se determina usando un ensayo adecuado para la determinación de las velocidades de crecimiento celular. Típicamente, la reversión de la velocidad de crecimiento se logra iniciando o acelerando los mecanismos necróticos o apoptóticos de la muerte celular en células neoplásicas, dando como resultado una reducción de una neoplasia.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "variante", "variantes", "modificado", "alterado", "mutado" y similares se refieren a proteínas o péptidos y/u otros agentes y/o compuestos que difieren de una proteína, péptido u otro compuesto de referencia. Las variantes, en este sentido, se describen a continuación y en otras partes en la presente divulgación en más detalle. Por ejemplo, los cambios en la secuencia de ácido nucleico de la variante pueden ser silentes, por ejemplo, pueden no alterar los aminoácidos codificados por la secuencia de ácido nucleico. En los casos donde las alteraciones se limiten a cambios silentes de este tipo, una variante codificará un péptido con la misma secuencia de aminoácidos que el péptido de referencia. Los cambios en la secuencia de ácido nucleico de la variante puede alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia. Dichos cambios de ácido nucleico pueden dar lugar a sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el péptido codificado por la secuencia de referencia, tal como se discute a continuación. En general, las diferencias en las secuencias de aminoácidos se limitan de tal forma que las secuencias de la referencia y la variante son estrechamente similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Un péptido variante y de referencia puede diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación. Una variante también puede ser un fragmento de un péptido de la invención que difiere de una secuencia peptídica de referencia por ser más corta que la secuencia de referencia, tal como mediante una eliminación terminal o interna. Otra variante de un péptido de la invención también incluye a un péptido que mantiene esencialmente la misma función o actividad que dicho péptido. Una variante también puede ser, pero sin limitación: (i) una en la que uno o más de los restos de aminoácidos se sustituyen con un resto de aminoácido conservado o no conservado y dicho resto de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético o (ii) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente o (iii) uno en el que el péptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del péptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan al péptido maduro, tal como una secuencia líder o secretoria o una secuencia que se emplea para la purificación del péptido maduro. Las variantes pueden producirse mediante técnicas de mutagénesis, y/o mecanismos de alteración, tales como alteraciones químicas, fusiones, adjuntos y similares, incluyendo aquellos aplicados a ácidos nucleicos, aminoácidos, células u organismos, y/o pueden producirse por medios recombinantes. Las variantes, incluyendo todas las de aquellos definidos anteriormente, se encuentran dentro del ámbito de los expertos en la materia, por ejemplo, a partir de las enseñanzas en el presente documento y de la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "quimioterapia", "quimioterapéutico", "fármaco o agente quimioterapéutico", "fármaco o agente anticancerígeno", "agente o fármaco antiproliferativo", "agente o fármaco citotóxico", "agente o fármaco citocida" y "agente o fármaco citostático" incluyen cualquier cosa que sola o en combinación que tenga cualquier efecto en una enfermedad o afección hiperproliferativa en un mamífero, tal como un ser humano. Estos términos incluyen, pero sin limitación, agentes químicos, biológicos y físicos que actúan directamente sobre (por ejemplo, afecta) una célula hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer o tumor) o en la vascularización de una hiperproliferación. En este contexto, el término "agente" incluye, pero sin limitación, un fármaco. Los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, fármacos) incluyen, pero sin limitación, agentes citostáticos, agentes citotóxicos (citocidas) y agentes antiangiogénesis. Las expresiones "quimioterapia", "quimioterapéutico", "fármaco o agente quimioterapéutico", "fármaco o agente anticancerígeno", "agente o fármaco antiproliferativo", "agente o fármaco citotóxico", "agente o fármaco citocida" y "agente o fármaco citostático", tal como se usan en el presente documento, no incluyen moduladores inmunitarios (agentes que actúan modulando el sistema inmunitario (de manera distinta a la acción citotóxica o citostática), tal como interleucina 2 (IL-2) y linomida.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dosificación secuencial" y la terminología relacionada se refiere a la administración de al menos un superantígeno, con al menos un agente anticancerígeno, por ejemplo, pero sin limitación, un fármaco quimioterapéutico. Esta definición incluye dosis escalonadas de estos agentes (es decir, escalonadas en el tiempo) y variaciones en las cantidades de dosificación. Esto incluye que un agente se administre antes, solapante con (parcial o totalmente) o después de la administración de otro agente. Este término

tiene en consideración generalmente la mejor pauta de administración para lograr una combinación sinérgica de al menos un superantígeno y al menos un agente anticancerígeno de al menos un superantígeno mientras se limita o elimina la generación de una respuesta de anticuerpos a un superantígeno. La determinación del plan de administración secuencial de la dosificación se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia, a partir de los conocimientos básicos y las enseñanzas de la técnica y las de esta solicitud. En determinadas realizaciones, por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que la dosificación secuencial, por ejemplo, con un superantígeno y un agente citostático, depende de la semivida del fármaco citostático. Por ejemplo, tal como se explica detalladamente a continuación, la dosificación de un fármaco citostático y un superantígeno, tal como un TTS, puede calcularse administrando en primer lugar un agente citostático, después administrando TTS en un momento determinado después del fármaco citostático, calculando el tiempo para que sea cuando la concentración del agente citostático caiga por debajo de un nivel funcional. Mediante dicha estrategia de dosificación (es decir, una dosificación secuencial), se pueden lograr efectos sinérgicos de la administración combinada del superantígeno y el agente citostático. Dicha dosificación secuencial también puede reducir la formación de anticuerpos contra el superantígeno en un paciente tratado en comparación con, por ejemplo, la administración solo de superantígeno, dando como resultado menos anticuerpos anti-superantígeno en un paciente tratado con dicha dosificación secuencial.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "sistémica" y "de manera sistémica" se refieren a la administración de un agente, de tal forma que el agente se expone a al menos un sistema asociado con todo el organismo, tal como, pero sin limitación, el sistema circulatorio, el sistema inmunitario y el sistema linfático, en vez de únicamente a una parte localizada del organismo, tal como, pero sin limitación, a un tumor. Por lo tanto, por ejemplo, una terapia sistémica o un agente administrado de manera sistémica es una terapia o un agente en el que al menos un sistema asociado con todo el cuerpo se expone a la terapia o agente, en oposición a o en vez de solo a un tejido diana.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "administración parenteral" incluye cualquier forma de administración en la que el compuesto se absorba en el sujeto sin implicar la absorción a través de los intestinos. Las administraciones parenterales ejemplares que se usan en la presente invención incluyen, pero sin limitación, administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intraarticular.

II. La presente invención

La FIG. 1 muestra un esquema de una realización de la presente invención, que se define por las reivindicaciones. Por ejemplo, uno o más tratamientos de TTS van seguidos directamente por uno o más tratamientos de un agente citostático. En la presente invención, por ejemplo, se ha descubierto inesperadamente que la administración, tal como administración sistémica, de un agente citotóxico o citostático, por ejemplo, poco tiempo después de la administración de TTS potencia, por ejemplo, de manera sinérgica, el efecto antitumoral del TTS y del fármaco citostático. Esto es inesperado ya que, por ejemplo, un experto en la técnica en el momento de la invención entendía que para que funcionase la terapia con TTS, era necesaria la activación del sistema inmunitario. Por ejemplo, la activación de células T contra células tumorales dirigidas. Un experto en la técnica en el momento de la invención también entendía que los agentes quimioterapéuticos, tales como agentes citotóxicos y citostáticos inhiben la activación inmune ya que inhiben la división celular. Los presentes solicitantes han descubierto inesperadamente que los agentes citostáticos pueden administrarse junto con TTS siendo el resultado un efecto potenciado tanto del TTS como de los agentes citostáticos. Esto incluye la administración tanto de TTS como de agentes citostáticos de manera sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. La presente invención ha descubierto que los TTS y los fármacos citostáticos pueden administrarse en combinaciones y dosis variantes, incluyendo, pero sin limitación, dosis completas de TTS y agentes citostáticos en las que el agente citostático se administra antes de la administración del TTS, con la administración del TTS o después de la administración del TTS, por ejemplo, e incluyendo brevemente después de la administración del TTS, tal como se ilustra en la FIG. 1. La presente invención también ha descubierto que también pueden administrarse múltiples rondas de administración de combinaciones variantes de TTS y agentes citostáticos. Por ejemplo, La FIG. 1 muestra múltiples rondas de administración de TTS seguidas brevemente por la administración de un agente quimioterapéutico, tal como un agente citotóxico o citostático.

Se ha descubierto que la administración combinada de superantígenos o TTS con un agente quimioterapéutico citostático reduce el desarrollo de una respuesta de anticuerpos para el superantígeno o TTS, mientras que la administración solamente del TTS genera una respuesta de anticuerpos para el superantígeno o TTS. Un experto en la técnica en el momento de la presente invención sabe que cuando se administra un superantígeno o TTS a animales, incluyendo mamíferos, incluyendo seres humanos, no es infrecuente que el animal desarrolle una respuesta de anticuerpos hacia el superantígeno o TTS (por ejemplo, hacia el superantígeno o resto de direccionamiento, hacia partes del TTS o hacia ambos) después de la primera administración. Esto, por lo tanto, hace que la terapia repetida de TTS sea difícil, ya que los títulos de anticuerpos en un paciente pueden interferir con la acción antitumoral de la terapia con el superantígeno o TTS. Por lo tanto, es un descubrimiento inesperado de la presente invención que la administración conjunta de superantígeno o TTS y agentes, por ejemplo, pero sin limitación, a dosis administradas por vía sistémica, reduce la respuesta de anticuerpos al superantígeno o TTS en un animal tratado, permitiendo de este modo la administración repetida del superantígeno o TTS sin los problemas

generados por una respuesta de anticuerpos en el animal tratado. Una realización para lograr este efecto se muestra en el régimen de tratamiento esquemático de la FIG. 1, en el que un agente quimioterapéutico, tal como un fármaco citostático, se administra brevemente después de la administración de cada dosis de TTS. Inesperadamente, se ha descubierto que dicha administración de un fármaco citotóxico, por ejemplo, inhibe la generación de una respuesta de células B/anticuerpos hacia la molécula de TTS, a la vez que no se inhibe o incluso se potencia, la respuesta inmunitaria de células T asociada con la terapia con TTS.

La FIG. 2 muestra un esquema de una realización de la presente invención. Por ejemplo, uno o más tratamientos de TTS van seguidos directamente por uno o más tratamientos de un agente quimioterapéutico, tal como un agente citostático. En la presente invención, por ejemplo, se ha descubierto inesperadamente que la administración, tal como administración sistémica, de un agente citostático, por ejemplo, poco tiempo después de la administración de TTS potencia, por ejemplo, de manera sinérgica, el efecto antitumoral del TTS y del agente citostático. Por ejemplo y tal como se muestra en la FIG. 1B, la presente invención ha demostrado que una realización de administración preferida de la presente invención es la administración de TTS en un ciclo de cuatro (4) días seguido de la administración de un agente citostático en el día cinco (5). Este ciclo de tratamiento combinado puede repetirse más de una vez, por ejemplo y tal como se muestra en la FIG. 2, mediante una segunda administración de TTS en los días 22-25 y la administración de un agente citostático en el día 26. Este ciclo de administración conjunta puede continuarse. Además, se muestra otro ejemplo en la FIG. 1C y/o en la FIG. 1D en la que la primera administración de TTS es bien antes o después de la administración de un agente citostático. Si el agente citostático se administra primeramente o antes del TTS, entonces se comienza con el TTS después de que la concentración eficaz del agente citostático se reduzca o caiga en el sujeto por debajo de un nivel inhibidor funcional. Este periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 24 horas o menos, dependiendo del agente citostático. Por lo tanto, después de este periodo de tiempo, puede iniciarse la administración del TTS. El TTS puede administrarse por vía sistémica durante un periodo de tiempo para permitir la producción suficiente de células efectoras, pudiendo ser dicho periodo de tiempo de aproximadamente 1-2 días. Después de este periodo de tiempo, entonces puede producirse una administración simultánea del agente citostático y el TTS, tal como se muestra en la FIG. 1C y en la FIG. 1D.

Como ya se ha discutido anteriormente, también se ha descubierto en la presente invención que dicha combinación de superantígeno, tal como TTS y la administración de un fármaco citostático (por ejemplo, a dosis completa, por administración sistémica), da como resultado una inhibición inesperada en la generación de una respuesta de anticuerpos para el superantígeno (TTS), que, por lo tanto, da como resultado la capacidad inesperada para tratar a un paciente, tal como un ser humano, con múltiples rondas de superantígeno, (TTS) a la vez que se tiene una posibilidad reducida o eliminada de que el paciente genere una respuesta de anticuerpos hacia el superantígeno (TTS). Es inesperado que, por ejemplo, el tratamiento con el superantígeno (TTS) en combinación con un fármaco citostático, pueda inhibir la respuesta de células B/generadora de anticuerpos a la vez que no se inhibe o incluso se potencia, la respuesta de células T/antitumoral del superantígeno (TTS).

En ejemplos ilustrativos, el TTS en las FIG. 1 y 2 puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, C215Fab-SEA (SEC ID N° 5; referencia) 5T4Fab-SEA/E-120 (SEC ID N° 7; de acuerdo con la invención) o 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEC ID N° 6; referencia) administrado por vía sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa, el agente citostático puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, gemcitabina, docetaxel, cisplatino o pemetrexed, administrado por vía sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa y en la dosis "completa" (es decir, la dosis administrada normalmente cuando el agente se administra solo) y el TTS y el agente citostático pueden administrarse a un animal, tal como un mamífero, tal como un ser humano.

III. Superantígenos

En todas las realizaciones de la invención, el superantígeno es como se define en las reivindicaciones.

Los superantígenos son proteínas bacterianas, proteínas virales y moléculas humanas modificadas por ingeniería genética, capaces de activar a los linfocitos T, por ejemplo, a concentraciones picomolares. Los superantígenos se caracterizan por su capacidad para activar a grandes subconjuntos de linfocitos T. Se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sin procesarse. Los superantígenos se unen a regiones conservadas fuera del surco de unión a antígeno en las moléculas del CMH de clase II, evitando la mayor parte del polimorfismo en el sitio de unión a péptidos convencional. Los superantígenos se unen al receptor de células T (TCR) en la cadena V β , en vez de unirse a los bucles hipervariables del receptor de células T. Los ejemplos de superantígenos bacterianos incluyen, pero sin limitación, enterotoxina estafilocócica (SE), exotoxina de *Streptococcus pyogenes* (SPE), toxina del síndrome de choque séptico de *Staphylococcus aureus* (TSST-1), exotoxina mitogénica estreptocócica (SME), superantígeno estreptocócico (SSA), enterotoxina A estafilocócica (SEA) y enterotoxina E estafilocócica (SEE).

Las secuencias polinucleotídicas que codifican muchos superantígenos se han aislado y clonado y los superantígenos expresados a partir de estas secuencias polinucleotídicas se han usando en terapia anticáncer. Los superantígenos expresados por estas secuencias polinucleotídicas pueden ser superantígenos de tipo silvestre, superantígenos modificados o superantígenos de tipo silvestre o modificados conjugados o fusionados con restos que persiguen a dianas. Además, tal como se explica en las siguientes patentes y solicitudes de patente de Estados Unidos, se conoce en la técnica que los superantígenos pueden administrarse a un mamífero, tal como un ser

humano, directamente, por ejemplo, mediante inyección o pueden administrarse, por ejemplo, mediante exposición de la sangre de un paciente al superantígeno fuera del cuerpo, o, por ejemplo, colocando un gen que codifica a un superantígeno dentro de un mamífero que va a tratarse (por ejemplo, mediante métodos de terapia génica conocidos y vectores tal como, por ejemplo, mediante células que contienen y son capaces de expresar, el gen) y expresar el gen en el mamífero. Otras rutas de administración de superantígenos se incluyen dentro del alcance de esta invención.

Los ejemplos de superantígenos y su administración a mamíferos pueden encontrarse en las siguientes patentes y solicitudes de patente de Estados Unidos: Patentes de Estados Unidos N° 5.858.363, 6.197.299, 6.514.498, 6.713.284, 6.692.746, 6.632.640, 6.632.441, 6.447.777, 6.399.332, 6.340.461, 6.338.845, 6.251.385, 6.221.351, 6.180.097, 6.126.945, 6.042.837, 6.713.284, 6.632.640, 6.632.441, 5.859.207, 5.728.388, 5.545.716, 5.519.114, las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con N° de serie 08/765.695 (presentada el 25 de julio de 1997), 10/283.838 (presentada el 20 de octubre de 2002) (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030092894), 09/463.470 (presentada el 21 de enero de 2000) y 09/900.766 (presentada el 6 de julio de 2001) (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030039655), Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 20040142464, 20030157113, 20030124142, 20030036644, 20030009015, 20020177551, 20020141981, 20020115190, 20020086813, 20020058032, 20020051765, 20020039585, 20020028211, 20020018781, 20010046501, 60/378.988, 60/389.366, 60/406.697, 60/406.750, 60/415.310, 60/415.400 y 60/438.686 y la Publicación Internacional PCT número WO/03/094846. Tal como se define en el presente documento, el término "superantígeno (o superantígenos)" incluye superantígenos de tipo silvestre y modificados así como superantígenos dirigidos (por ejemplo, conjugados o fusionados). Más preferentemente, la presente invención se refiere a superantígenos dirigidos (por ejemplo, conjugados o fusionados). La definición del término "superantígeno (o superantígenos)", tal como se usa en el presente documento, abarca cualquier molécula (o moléculas) capaz de interactuar con un TCR para activar a un subconjunto de células T.

A. Superantígenos modificados

Dentro del alcance de esta invención, los superantígenos pueden modificarse a partir del tipo silvestre de virtualmente cualquier manera. Los ejemplos de realizaciones preferidas incluyen modificaciones que mantienen o potencian la capacidad de un superantígeno para estimular a los linfocitos T y pueden, por ejemplo, alterar otros aspectos del superantígeno, tales como, por ejemplo, su serorreactividad o inmunogenicidad. Los superantígenos modificados incluyen moléculas sintéticas que tienen actividad de superantígeno (es decir, la capacidad para activar a subconjuntos de linfocitos T).

Por lo tanto los presentes inventores contemplan que pueden efectuarse diversos cambios en las secuencias polinucleotídicas que codifican a un superantígeno sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, tal como se discute a continuación. La actividad es la inducción de la respuesta de células T para dar como resultado citotoxicidad de las células tumorales. Además, la afinidad del superantígeno por la molécula de la clase II del CMH puede disminuirse con efectos mínimos en la citotoxicidad del superantígeno. Esto, por ejemplo, ayuda a reducir la toxicidad que de otro modo puede suceder si un superantígeno mantiene su capacidad de tipo silvestre para unirse a antígenos de la clase II del CMH (tal como en dicho caso, células que expresan la clase II, tales como células madre inmunitarias, podrían verse afectadas por la respuesta al superantígeno).

Las técnicas para modificar los superantígenos (por ejemplo, polinucleótidos y polipéptidos), incluyendo para la preparación de superantígenos sintéticos, se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, mutagénesis por PCR, mutagénesis por barrido de alanina y mutagénesis de sitio específico (Patentes de Estados Unidos 5.220.007; 5.284.760; 5.354.670; 5.366.878; 5.389.514; 5.635.377; y 5.789.166).

En algunas realizaciones, puede modificarse un superantígeno de tal forma que se reduzca su serorreactividad en comparación con el tipo silvestre, pero se mantiene o se potencia su capacidad para activar a las células T en relación al tipo silvestre. Una técnica para preparar dichos superantígenos modificados es mediante la sustitución de determinados aminoácidos en determinadas regiones de un superantígeno a otro. Esto es posible porque muchos superantígenos, por ejemplo, pero sin limitación, SEA, SEE, SED comparten homología de secuencia en determinadas áreas que se han relacionado con determinadas funciones (Marrack y Kappler, 1990). Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la presente invención, un superantígeno que tiene una respuesta de inducción de la activación de células T deseada, pero una serorreactividad no deseada, se modifica de tal forma que el superantígeno resultante mantiene su capacidad de activación de células T y aun así tiene serorreactividad reducida.

Los expertos en la materia saben y entienden que los sueros de seres humanos contienen normalmente varios títulos de anticuerpos contra superantígenos. Para los superantígenos estafilocócicos, por ejemplo, los títulos relativos son TSST-1 > SEB > SEC-1 > SE3 > SEC2 > SEA > SED > SEE. Como puede observarse, la serorreactividad de, por ejemplo, SEE (enterotoxina estafilocócica E) es menor que la de, por ejemplo, SEA (enterotoxina estafilocócica A). Basándose en estos datos, un experto en la materia preferirá administrar un superantígeno de título bajo, tal como, por ejemplo, SEE, en lugar de un superantígeno de un título mayor, tal como, por ejemplo, SEB (enterotoxina estafilocócica B). Sin embargo, como también han descubierto los presentes

inventores, diferentes superantígenos tienen diferentes propiedades de activación de células T en relación a otros y para los superantígenos de tipo silvestre, los mejores superantígenos activadores de células T también tienen a menudo una serorreactividad indeseablemente elevada.

5 Un experto en la materia también será consciente que estos títulos relativos indican problemas potenciales con la serorreactividad, tales como problemas con anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, la presente invención contempla el uso de un superantígeno de título bajo, tal como SEA o SEE para evitar la serorreactividad de los superantígenos administrados por vía parenteral. Un "superantígeno de título bajo" tiene una serorreactividad baja según se mide, por ejemplo, mediante anticuerpos anti-superantígeno típicos en una población general. En algunos casos también
10 tienen una inmunogenicidad baja. Dichos superantígenos de título bajo pueden modificarse para que mantengan su "título bajo", tal como se describe en el presente documento.

Los presentes inventores han descubierto formas de modificar superantígenos de tal forma que, por ejemplo, pueda crearse un superantígeno modificado que tenga tanto las propiedades de activación de células T deseadas como la serorreactividad reducida y en algunos casos también inmunogenicidad reducida. Una forma para lograr esto es mediante el descubrimiento de los inventores de que determinadas regiones de homología entre superantígenos se relacionan con la serorreactividad. Usando esta información, se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la materia el diseño de un superantígeno recombinante que tenga una activación de células T deseada y una serorreactividad y/o inmunogenicidad deseada.

Además, se sabe y entiende claramente que las secuencias de proteínas y la reactividad cruzada inmunológica de los superantígenos o de las enterotoxinas estafilocócicas se dividen en dos grupos relacionados. Un grupo consiste en SEA, SEE y SED. El segundo grupo es SPEA, SEC y SEB. Por lo tanto, la presente invención también contempla el uso de superantígenos de título bajo para disminuir o eliminar la reactividad cruzada de la presente invención con anticuerpos de título elevado o endógenos contra enterotoxinas estafilocócicas.

Las regiones de los superantígenos que se han identificado por desempeñar un papel en la serorreactividad incluyen, por ejemplo, la Región A, que comprende los restos de aminoácido 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27; la Región B, que comprende los restos de aminoácidos 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49; la Región C, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 y 84; la Región D, que comprende los restos de aminoácidos 187, 188, 189 y 190; y la Región E, que comprende los restos de aminoácidos 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226 y 227 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/900.766 (presentada el 6 de julio de 2001) (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030039655)). Por lo tanto, se contempla que estas regiones identificadas sean las regiones en las que un experto en la materia podría introducir mutaciones usando, por ejemplo, sustitución de aminoácidos, para producir un superantígeno que tenga una serorreactividad alterada.

Los polipéptidos o secuencias de aminoácidos para los superantígenos anteriormente listados pueden obtenerse a partir de cualquier banco de datos de secuencias, por ejemplo, Protein Data Bank y/o GenBank. Los números de referencia de GenBank ejemplares incluyen, pero sin limitación, SEE que es P12993; SEA que es P013163; SEB que es P01552; SEC1 que es P01553; SED que es P20723; y SEH que es AAA19777. Además, un experto en la técnica puede obtener las secuencias de ácido nucleico de los superantígenos citados anteriormente y otros superantígenos de GenBank.

La secuencia de tipo silvestre de SEE (SEC ID N° 1) o de SEA o (SEC ID N° 2) puede modificarse de tal forma que los aminoácidos en cualquiera de las regiones A-E identificadas se sustituyen con aminoácidos de SEE. Dichas sustituciones incluyen, por ejemplo, K79, K81, K83 y D227 o K79, K81, K83, K84 y D227 o por ejemplo, K79E, K81E, K83S y D227S o K79E, K81E, K83S, K84S y D227A. Más particularmente, el superantígeno es SEAE-120 (SEC ID N° 3; véase también la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/900.766 (presentada el 6 de julio de 2001) (Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 20030039655)) o SEAD227A (SEC ID N° 4; véase también la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 08/765.695 (presentada el 25 de julio de 1997)).

1. Polinucleótidos y polipéptidos modificados

El equivalente funcional biológico puede comprender un polinucleótido que se haya diseñado para contener distintas secuencias mientras que a la vez retiene la capacidad para codificar la proteína de "tipo silvestre" o convencional. Esto puede lograrse debido a la degradación del código genético, es decir, la presencia de múltiples codones, que codifican los mismos aminoácidos. En un ejemplo, un experto en la materia puede desear introducir una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción en un polinucleótido a la vez que no se altera la capacidad de ese polinucleótido para codificar una proteína.

En otro ejemplo, un polinucleótido puede ser (y codificar) un equivalente biológico funcional con más cambios significativos. Determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos, sitios de unión en moléculas de sustrato, receptores y similares. Los cambios denominados "conservativos" no alteran la actividad biológica de la proteína, ya que el cambio estructural no es uno que incida en la estabilidad de la proteína para llevar a cabo su función diseñada. Por lo tanto los presentes inventores contemplan

que puedan efectuarse diversos cambios en la secuencia de genes y proteínas divulgadas en el presente documento, a la vez que se cumplen los objetivos de la presente invención.

En términos de equivalentes funcionales, los expertos en la materia entienden que, de manera inherente en la definición de una proteína y/o polinucleótido "equivalente biológicamente funcional", está el concepto de que hay un límite en cuanto al número de cambios que pueden efectuarse en una porción definida de la molécula a la vez que se mantiene una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Los equivalentes biológicamente funcionales se definen por lo tanto en el presente documento como aquellas proteínas (y polinucleótidos) en que pueden sustituirse aminoácidos (o codones) seleccionados. La actividad funcional es la inducción de la respuesta de células T para dar como resultado citotoxicidad de las células tumorales. Además, la afinidad del superantígeno por la molécula de la clase II del CMH se reduce con efectos mínimos en la citotoxicidad del superantígeno.

En general, cuanto más corta sea la molécula, podrán efectuarse menos cambios en la molécula a la vez que se mantiene la función. Los dominios más largos pueden tener un número intermedio de cambios. La proteína de longitud completa tendrá una tolerancia mayor para un número mayor de cambios. Sin embargo, tiene que apreciarse que determinadas moléculas o dominios que son elevadamente dependientes de su estructura tolerarán muy poca o ninguna modificación.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliadad, carga, tamaño, y/o similares. Un análisis del tamaño, forma y/o tipo de sustituyentes de cadena lateral de aminoácido revela que la arginina, lisina y/o histidina son todos restos cargados positivamente; que la alanina, glicina y/o serina son todos de un tamaño similar; y/o que la fenilalanina, triptófano y/o tirosina tienen todos una forma generalmente similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, la arginina, lisina y/o histidina; la alanina, glicina y/o serina; y/o la fenilalanina, triptófano y/o tirosina; se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Para efectuar cambios más cuantitativos, puede tenerse en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Se ha asignado un índice hidropático a cada aminoácido basándose en sus características de hidrofobicidad y/o carga, siendo estas: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y/o arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológicamente interactiva en una proteína se entiende generalmente bien en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático y/o puntuación similar y/o que aún mantienen una actividad biológica similar. Al efectuar cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos sean de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos que sean de ± 1 , y/o son aún más preferidos aquellos que sean de $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede efectuarse de manera eficaz basándose en la hidrofiliadad, particularmente en los casos donde la proteína y/o péptido equivalente biológicamente funcional creado de este modo esté previsto para su uso en realizaciones inmunológicas, como en determinadas realizaciones de la presente invención. La Patente de Estados Unidos 4.554.101, afirma que la mayor hidrofiliadad media local de una proteína, regida por la hidrofiliadad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su serorreactividad y/o antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Tal como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliadad a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina ($-0,5 \pm 1$); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al efectuar cambios basándose en valores de hidrofiliadad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliadad sean de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos que sean de ± 1 , y/o son aún más preferidos aquellos que sean de $\pm 0,5$.

2. Aminoácidos alterados

La presente invención, en muchos aspectos, se basa en la síntesis de péptidos y polipéptidos en células, mediante la transcripción y traducción de polinucleótidos adecuados. Estos péptidos y polipéptidos incluirán los veinte aminoácidos "naturales" y modificaciones postraduccionales de los mismos. Sin embargo, la síntesis peptídica *in vitro* permite el uso de aminoácidos modificados y/o no habituales. A continuación en el presente documento se proporciona una tabla (Tabla 1) ejemplar, pero no limitante, de aminoácidos modificados y/o no habituales.

Tabla 1 - Aminoácidos modificados y/o no habituales			
Abrev.	Aminoácido	Abrev.	Aminoácido
Aad	Ácido 2-aminoadípico	EtAsn	N-etilasparagina
BAad	Ácido 3-Aminoadópico	Hyl	Hidroxilisina
BAla	beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico	AHyl	alo-hidroxilisina
Abu	Ácido 2-aminobutírico	3Hyp	3-hidroxiprolina
4Abu	Ácido 4-aminobutírico ácido piperidínico	4Hyp	4-hidroxiprolina
Acp	Ácido 6-aminocaproico	Ide	Isodesmosina
Ahe	Ácido 2-aminoheptanoico	Aile	alo-isoleucina
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico	MeGly	N-metilglicina, sarcosina
BAib	Ácido 3-aminoisobutírico	Melle	N-metilliso leucina
Apm	Ácido 2-aminopimélico	MeLys	6-N-metilisina
Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico	MeVal	N-Metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpm	Ácido 2,2'-diaminopimélico	Nle	Norleucina
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiónico	Orn	Ornitina
EtGly	N-etilglicina		

3. Miméticos

- 5 Además de los equivalentes biológicamente funcionales discutidos anteriormente, los presentes inventores también contemplan que pueden formularse compuestos similares para imitar a las porciones clave de péptidos o polipéptidos de la presente invención. Dichos compuestos, que pueden denominarse peptidomiméticos, pueden usarse del mismo modo que los péptidos de la invención y, de este modo, también son equivalentes funcionales.
- 10 Determinados miméticos que imitan elementos de la estructura secundaria y terciaria de proteínas se describen en Johnson et al., (1993). El razonamiento subyacente detrás del uso de peptidomiméticos es que la estructura peptídica de la proteína existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de una forma tal que facilite las interacciones moleculares, tales como aquellas de anticuerpo y/o antígeno. Un peptidomimético se diseña por lo tanto para permitir interacciones moleculares similares a las de la molécula natural.
- 15 Algunas aplicaciones exitosas del concepto de peptidomimético se han centrado en miméticos de giros β en proteínas, que se sabe que son altamente antigénicos. Probablemente, la estructura de giro β en un polinucleótido puede predecirse mediante algoritmos asistidos por ordenador, tal como se ha tratado en el presente documento. Una vez que se han determinado los aminoácidos que forman el giro, pueden construirse miméticos para lograr una
- 20 orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas laterales de aminoácido.
- Otras estrategias se han centrado en el uso de proteínas pequeñas, que contienen múltiples disulfuro como moldes estructurales atractivos para producir conformaciones biológicamente activas que imitan los sitios de unión de proteínas grandes, Vita et al., (1995). Un motivo estructural que parece estar evolutivamente conservado en
- 25 determinadas toxinas es pequeño (30-40 aminoácidos), estable y elevadamente permisivo a la mutación. Este motivo está compuesto de una lámina beta y una hélice alfa puenteada en el núcleo interior por tres disulfuros.
- Los giros beta II se han imitado satisfactoriamente usando L-pentapéptidos cíclicos y aquellos con D-aminoácidos. Weisshoff et al. (1999). Asimismo, Johannesson et al. (1999) comunican tripéptidos bicíclicos con propiedades
- 30 inductoras de giros inversos.
- Los métodos para generar estructuras específicas se han divulgado en la técnica. Por ejemplo, los miméticos de alfa-hélice se divulgan en las Patentes de Estados Unidos 5.446.128; 5.710.245; 5.840.833; y 5.859.184. Estas estructuras hacen que el péptido o proteína sea más estable térmicamente y también aumentan la resistencia a la
- 35 degradación proteolítica. Se divulgan estructuras de anillo de seis, siete, once, doce, trece y catorce miembros.
- Los métodos para generar giros beta y abultamientos beta conformacionalmente restringidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.440.013; 5.618.914; y 5.670.155. Los giros beta permiten sustituyentes laterales cambiados sin que haya cambios en la conformación estructural correspondiente y tienen
- 40 extremos adecuados para su incorporación en péptidos mediante procedimientos de síntesis convencionales. Otros tipos de giros miméticos incluyen giros inversos y gamma. Los miméticos de giro inverso se divulgan en las Patentes de Estados Unidos 5.475.085 y 5.929.237 y los miméticos de giro gamma se describen en las Patentes de Estados

Unidos 5.672.681 y 5.674.976.

Otras proteínas y moléculas que se encuentran dentro del alcance de esta invención incluyen aquellas que pueden variar en, por ejemplo, la glucosilación, pero que mantienen la misma función (por ejemplo, las proteínas denominadas "biosimilares" o "bioequivalentes").

4. Intercambio de dominio

Además, puede crearse un superantígeno sustituyendo regiones homólogas de diversas proteínas. Esto se conoce, en determinados contextos, como "intercambio de dominios". El intercambio de dominios implica la generación de moléculas quiméricas que utilizan polipéptidos diferentes pero, en este caso, relacionados. Al comparar diversas proteínas de superantígenos, se pueden hacer predicciones en cuanto a las regiones funcionalmente significativas de estas moléculas. Es posible, por tanto, intercambiar dominios relacionados de estas moléculas en un esfuerzo para determinar hasta qué punto son críticas estas regiones para la función del superantígeno. Estas moléculas pueden tener valor adicional en tanto que estas "quimeras" pueden distinguirse de las moléculas naturales, mientras que se proporciona posiblemente la misma función.

B. Superantígenos dirigidos

En determinadas realizaciones de la presente invención, un resto de direccionamiento, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede conjugarse a un superantígeno, proporcionando un superantígeno dirigido. Si el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo reconocen a un antígeno asociado a tumores, el superantígeno dirigido puede denominarse superantígeno dirigido a tumores ("TTS"). Los superantígenos dirigidos mantienen la capacidad para activar a un gran número de linfocitos T y añaden la capacidad para dirigir a los linfocitos activados a células que portan el resto diana. Por ejemplo, las moléculas TTS activan a grandes números de células T y las dirigen a tejidos que contienen el antígeno asociado a tumores unido al resto de direccionamiento. En dichas situaciones, se eliminan células diana específicas, dejando al resto del organismo relativamente no dañado. Dicha terapia de "bala mágica" es muy deseada en la técnica, ya que los agentes anticáncer no específicos, tales como fármacos quimioterapéuticos citostáticos, no son específicos y eliminan a grandes cantidades de células que no están asociadas con los tumores que van a tratarse. Por ejemplo, los estudios con TTS han demostrado que la inflamación por linfocitos T citotóxicos (CTL) en el tejido tumoral aumenta rápidamente en respuesta a la primera inyección de un superantígeno dirigido (Dohlsten et al., 1995). Esta inflamación con infiltración de CTL en el tumor es uno de los efectores principales de la terapéutica antitumoral de los superantígenos dirigidos.

Tal como se usa en la presente invención, los superantígenos dirigidos a tumores (TTS) representan una inmunoterapia contra el cáncer y son proteínas terapéuticas de fusión que contienen un resto de direccionamiento y un superantígeno (Dohlsten et al., 1991; Dohlsten et al., 1994). Estos tipos de compuestos se divulgan y describen exhaustivamente en, por ejemplo, los documentos WO9201470, EP 610179, US 5,858,363, US 6,197,299, WO9601650, EP 766566 y WO03002143. Los ejemplos de TTS que pueden usarse en la presente invención incluyen C215Fab-SEA (SEC ID N° 5; referencia), 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEC ID N° 6; referencia) y 5T4Fab-SEA/E-120 (SEC ID N° 7; de acuerdo con la invención).

El resto de direccionamiento, en principio, puede ser cualquier estructura que sea capaz de unirse a una estructura de la superficie celular, preferentemente una estructura específica de una enfermedad. La estructura contra la que se dirige un resto de direccionamiento es normalmente distinta de (a) el epítipo de cadena V β al que se une el superantígeno y (b) los epítipos de clase II del CMH a los que se unen los superantígenos. El resto buscador de diana se selecciona principalmente entre anticuerpos, incluyendo fragmento de unión a antígeno de anticuerpos y entidades relacionadas, receptores de células T solubles, factores de crecimiento, interleucinas (por ejemplo, interleucina 2), hormonas, etc. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.080.840, 6.514.498; 5.858.363; 6.197.299; las Solicitudes de Estados Unidos N° US2004/0126379, US2003/0175212, US2003/0144474, US2002/0142389, US2002/119149 y las Publicaciones Internacionales WO2003020763, WO2004050705, WO2003002143, WO9960120 y WO9960119.

En determinadas realizaciones, el resto de direccionamiento es un anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab)₂, Fv, un anticuerpo monocatenario, etc.). Un experto en la materia será consciente de que los anticuerpos son restos de direccionamiento extremadamente versátiles y útiles porque pueden generarse contra cualquier antígeno de la superficie celular que sea de interés. Se han generado anticuerpos monoclonales contra receptores de la superficie celular, antígenos asociados a tumores y marcadores específicos de linaje de leucocitos, tales como antígenos de CD. Los genes de la región variable del anticuerpo pueden aislarse fácilmente a partir de células de hibridoma mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los antígenos asociados a tumores ejemplares que pueden usarse para producir un resto diana pueden incluir, pero sin limitación, ge100, Melan-A/MART, MAGE-A, MAGE (antígeno E de melanoma), MAGE-3, MAGE-4, MAGEA3, tirosinasa, TRP2, NY-ESO-1, CEA (antígeno carcinoembrionario), PSA, p53, Mamaglobina A, Survivina, Muc1 (mucina 1)/DF3, metaloproteína 1 (MPS-1), isoforma 1B1 de citocromo P450, proteína de unión a 90K/Mac-2, Ep-CAM (MK-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, LAGE-1/CAMEL, TAGE-1, GAGE, 5T4, gp70, SCP-1, c-myc, ciclina B1, MDM2, p62, Koc, IMP1, RCAS1, TA90, OA1, CT-7, HOM-MEL-40/SSX-2, SSX-1, SSX-4, HOM-TE5-14/SCP-1, HOM-TE5-85, HDAC5, MBD2, TRIP4, NY-CO-45, KNLS6, HIP1R, Seb4D,

KIAA1416, IMP1, proteína de unión a 90K/Mac-2, MDM2, NY/ESO y LMNA.

Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos anticáncer ejemplares pueden incluir, pero sin limitación, anti-CD19, anti-CD20, anti-5T4, anti-Ep-CAM, anti-Her-2/neu, anti-EGFR, anti-CEA, anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)/hidrolasa de folato 1 (FOLH1), anti-IGF-1R.

Además, el superantígeno de la presente invención puede fusionarse y/o puede conjugarse a fragmentos activos de anticuerpo, tales como C215Fab, 5T4Fab (documento WO8907947) o C242Fab (Lindholm et al., documento WO9301303).

Otro tipo de resto de direccionamiento incluye un receptor soluble de células T (TCR). Algunas formas de TCR solubles pueden contener bien solo dominios extracelulares o dominios extracelulares y citoplásmicos. También pueden preverse otras modificaciones del TCR para producir un TCR soluble en el que se hayan eliminado y/o alterado los dominios transmembrana de tal forma que el TCR no queda unido a la membrana, tal como se describe en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° US2002/119149, US2002/0142389, US2003/0144474 y US2003/0175212 y en las Publicaciones Internacionales N° WO2003020763; WO9960120 y WO9960119.

El resto de direccionamiento puede añadirse al superantígeno usando bien técnicas recombinantes o uniendo químicamente el resto de direccionamiento al superantígeno. Estos métodos son bien conocidos para el experto habitual en la materia y comprenden un gran número de variantes.

1. Unión recombinante

Para los superantígenos recombinantes, en forma de proteínas de fusión o en algunos casos como conjugados, la sustancia obtenida será uniforme respecto de la posición de enlace. O bien se une el extremo amino de un superantígeno al extremo carboxilo del resto de direccionamiento o viceversa. Para anticuerpos, pueden usarse bien la cadena ligera o la cadena pesada para la fusión. Por ejemplo, para fragmentos Fab, se enlaza el extremo amino terminal del superantígeno modificado al primer dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo (CH1). Además, el superantígeno modificado también puede enlazarse a un fragmento Fab uniendo la cadena ligera o al dominio VH1 y VL del superantígeno. Además, puede usarse un puente o enlazante peptídico para unir las dos composiciones. La conjugación o fusión usando un enlazante o puente puede llevarse a cabo usando técnicas recombinantes. En dichos casos, se prefieren puentes oligopeptídicos que contienen restos aminoácidos hidrófilos, tales como Gln, Ser, Gly, Glu, Pro, His y Arg. Los puentes particularmente preferidos son puentes peptídicos que consisten en 1-10 restos de aminoácidos, más particularmente, para 3-7 restos de aminoácidos. Un puente ejemplar es el tripéptido Gly-Gly-Pro.

2. Enlace químico

También se prevé que el superantígeno modificado pueda unirse al resto de direccionamiento mediante enlace químico. El enlace químico de los dos compuestos puede requerir un puente enlazante o peptídico. El puente es preferentemente hidrófilo y muestra una o más estructuras seleccionadas entre amida, tioéter, disulfuro, etc. (Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.858.363, 6.197.299 y 6.514.498).

El enlace químico de un superantígeno modificado a un resto de direccionamiento utiliza a menudo grupos funcionales (por ejemplo, grupos de amina primaria o grupos carboxi) que están presentes en muchas posiciones en los compuestos. Se deduce que el producto final contendrá una mezcla de moléculas conjugadas que difieren en posiciones enlazantes, así como hetero y homoconjugados.

C. Expresión de los superantígenos

La presente invención también se refiere al uso de vectores de expresión y células hospedadoras. Estos vectores de expresión, que se han diseñado por ingeniería genética para que contengan la secuencia de ácido nucleico del superantígeno, se introducen o transforman en células hospedadoras para producir el superantígeno de la presente invención (Véase Dohlsten et al., 1994, Forsberg et al., 1997, Erlandsson et al., 2003 y el documento WO2003002143).

Las células hospedadoras pueden modificarse por ingeniería genética para que incorporen secuencias de ácido nucleico y expresen péptidos de la presente invención. La introducción de secuencias de ácido nucleico en la célula hospedadora puede efectuarse mediante transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, raspadura de carga, introducción balística, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como, et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Los ejemplos representativos de células hospedadoras adecuadas incluyen células bacterianas, tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y células de *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levaduras y células de *Aspergillus*; células de insecto, tales como células S2 de *Drosophila* y células Sf9 de *Spodoptera*; células animales, tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 y células de melanoma de Bowes.

Los ejemplos de sistemas de producción para superantígenos se encuentran, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/463,470 (presentada el 21 de enero de 2000).

D. Purificación de proteínas

La purificación del superantígeno o de variantes del mismo será deseable. Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento en bruto del medio celular en fracciones peptídicas y no peptídicas. Habiendo separado la proteína de otras proteínas, la proteína de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o la purificación hasta la homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de afinidad; electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz para purificar péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso HPLC.

Determinados aspectos de la presente invención se refieren a la purificación y en realizaciones particulares, la purificación sustancial de una proteína o péptido codificado. La expresión "proteína o péptido purificado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, aislable a partir de otros componentes, donde la proteína o péptido se purifica hasta cualquier punto en relación a su estado obtenible naturalmente. Por lo tanto, una proteína o péptido purificado también se refiere a una proteína o a un péptido, libre del ambiente en el que puede aparecer de manera natural.

En general, "purificado" se referirá a una proteína o composición peptídica que se haya sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes y manteniendo dicha composición su actividad biológica expresada. En los casos donde se use la expresión "sustancialmente purificado", esta denominación se referirá a una composición en la que la proteína o péptido forme el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o más de las proteínas en la composición.

Los expertos en la materia conocerán diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos en una fracción mediante análisis de SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial y por lo tanto calcular el grado de pureza, evaluado en el presente documento como "número de veces de purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad, por supuesto, dependerán de la técnica de ensayo concreta seleccionada para efectuar el seguimiento de la purificación y de si la proteína o péptido expresado muestra o no una actividad detectable.

Los expertos en la materia conocerán diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Estos incluyen, por ejemplo, precipitación a partir de sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o mediante desnaturalización por calor, seguido de centrifugación; etapas cromatográficas, tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase reversa, cromatografía de hidroxilapatita y de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de ejecución de las diversas etapas de purificación puede cambiarse o que pueden omitirse determinadas etapas y aún así ser un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, en ocasiones de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi et al., 1977). Por lo tanto, se apreciará que en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de productos de expresión purificados o parcialmente purificados pueden variar.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con una resolución de los picos extraordinaria. Esto se logra mediante el uso de partículas muy finas y alta presión para mantener un caudal adecuado. La separación puede lograrse en cuestión de minutos o como mucho una hora. Además, solo se necesita un volumen muy pequeño de muestra debido a que las partículas son tan pequeñas y están tan densamente empaquetadas que el volumen vacío es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Asimismo, la concentración de la muestra no necesita ser muy elevada debido a que las bandas son tan estrechas que hay muy poca dilución de la muestra.

La cromatografía en gel o cromatografía de tamiz molecular, es un tipo especial de cromatografía de partición que se basa en el tamaño molecular. La teoría detrás de la cromatografía en gel es que la columna, que se prepara con partículas diminutas de una sustancia inerte que contiene pequeños poros, que separan las moléculas mayores de las menores a medida que pasan a través o alrededor de los poros, dependiendo de su tamaño. A medida que el material del que están hechas las partículas no adsorbe las moléculas, el único factor que determina el caudal es el tamaño. De este modo, se eluyen las moléculas a partir de la columna en un tamaño decreciente, siempre que el tamaño sea relativamente constante. La cromatografía en gel es insuperable para separar moléculas de diferentes tamaños ya que la separación es independiente de todos los demás factores, tales como pH, fuerza iónica, temperatura, etc. Asimismo, tampoco hay prácticamente adsorción, hay menos dispersión de zona y el volumen de elución se relaciona de un modo simple con el peso molecular.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que se va a aislar y una molécula a la que puede unirse específicamente. Esta es una interacción de tipo receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza mediante acoplamiento covalente de uno de los compañeros de unión a una matriz insoluble. El material de la columna entonces es capaz de adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución sucede cambiando las condiciones a aquellas en las que no sucede la unión (alteración de pH, fuerza iónica, temperatura, etc.).

IV. Agente y/o terapia anticancerígena

Un agente y/o terapia "anticancerígena" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, eliminando células cancerosas, induciendo la apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la velocidad de crecimiento de células cancerosas, reduciendo la incidencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el aporte de sangre a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer.

La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un gran problema en la oncología clínica. Una meta de la investigación actual del cáncer es encontrar modos para mejorar la eficacia de la quimioterapia y de la radioterapia combinándola con inmunoterapia, tal como un superantígeno. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia con el superantígeno pueda usarse en combinación con agentes quimioterapéuticos y/o agentes radioterapéuticos.

A. Agentes quimioterapéuticos

En todas las realizaciones de la invención, el agente quimioterapéutico es un fármaco citostático.

Los fármacos o agentes quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos que solos o en combinación tienen un efecto sobre una enfermedad o afección hiperproliferativa en un mamífero, tal como un ser humano. Estos términos incluyen, pero sin limitación, agentes químicos, biológicos y físicos que actúan directamente sobre (por ejemplo, afectan) a una célula hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer o tumor) o en la vascularización de una hiperproliferación. En este contexto, el término "agente" incluye, pero sin limitación, un fármaco. Estos incluyen, pero sin limitación a agentes citostáticos, agentes citotóxicos (citocidas) y agentes antiangiogénesis, pero no incluyen moduladores inmunitarios (agentes que actúan modulando el sistema inmunitario (de manera distinta a la acción citotóxica o citostática), tal como interleucina 2 (IL-2) y linomida.

En algunas realizaciones, se usa un agente quimioterapéutico para indicar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Dichos agentes o fármacos pueden categorizarse dependiendo de su modo de acción en una célula, por ejemplo, dependiendo de si o en qué estado afectan al ciclo celular. Como alternativa, puede caracterizarse un agente basándose en su capacidad para reticular directamente al ADN, para intercalarse en el ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas afectando a la síntesis de ácidos nucleicos.

Los agentes citostáticos se definen como agentes o fármacos que evitan el crecimiento y la proliferación de células. Un experto en la materia entiende que un agente citostático es un agente quimioterapéutico. Más particularmente, los agentes citostáticos que pueden usarse en combinación con un superantígeno incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucilo, melfalano); antimetabolitos (por ejemplo, mercaptopurina, cladribina, citarabina, fluorouracilo, gemcitabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina); inhibidores de la mitosis (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, etopósido, topotecán, Irinotecán); compuestos basados en platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino) y hormonas corticoesteroides. También se encuentra dentro del alcance de la invención combinar agentes o fármacos quimioterapéuticos citocidas (citotóxicos) con la administración del superantígeno, así como combinar agentes que afectan negativamente a la vascularización de tumores (agentes anti-angiogénesis) con fármacos con la administración de superantígeno.

1. Hormonas corticoesteroides

Las hormonas corticoesteroides son útiles para tratar algunos tipos de cáncer (linfoma, leucemias y mieloma múltiple). Aunque estas hormonas se han usado para el tratamiento de muchas afecciones no cancerosas, se consideran fármacos de quimioterapia cuando se implementan para eliminar o frenar el crecimiento de células cancerosas. Las hormonas corticoesteroides pueden aumentar la eficacia de otros agentes de quimioterapia y por consiguiente, se usan frecuentemente en tratamientos combinados, incluyendo con terapia de superantígeno. La prednisona y la dexametasona son ejemplos de hormonas corticoesteroides.

2. Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son fármacos que interactúan directamente con el ADN genómico para evitar que proliferen las células cancerosas. Esta categoría de fármacos citostáticos representa agentes que afectan a todas las fases del ciclo celular, es decir, no son específicos de fase. Más específicamente, los agentes alquilantes o sus intermedios reactivos, forman enlaces covalentes con el ácido desoxirribonucleico (ADN), con el ácido ribonucleico (ARN) y con proteínas para formar un aducto en el que se añade un grupo metilo o etilo. Se cree que los aductos de ADN juegan un papel importante en la mutagénesis y en la clastogénesis, así como en la carcinogénesis. Los aductos de ADN se forman en una serie de sitios reactivos en bases nucleotídicas. Las localizaciones comunes incluyen el N-7 y el O-6 de la guanina, que se ha demostrado que están asociados con la mutagénesis y la carcinogénesis. En general, parece que los agentes alquilantes que no son particularmente de naturaleza iónica se localizan más en los átomos de nitrógeno del anillo, mientras que aquellos que tienen un carácter iónico mayor muestran mayores preferencias por la reacción en los átomos de oxígeno en el ADN. Los agentes alquilantes pueden implementarse para tratar la leucemia crónica, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y cánceres concretos de mama, pulmón y de ovario. Los agentes alquilantes ejemplares incluyen busulfán (Myleran), clorambucilo, ciclofosfamida (Cytosan), dacarbazina (DTIC-Dome), fosfato de estramustina, ifosfamida, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalano (mostaza de fenilalanina), procarbazona, tiotepa y mostaza de uracilo.

Además, las nitrosoureas parecen funcionar como agentes alquilantes, así como a través de otros mecanismos, tales como carbamoilación, que es una reacción que sucede entre un isocianato y un reactivo capaz de perder un protón e implica la formación de un enlace covalente entre el isocianato y su reactivo. La alquilación es una reacción atribuida a la alquilación de ácidos nucleicos y la carbamoilación se atribuye a la carbamoilación de proteínas.

Las nitrosoureas se convierten de manera no enzimática en un ión carbonio y una molécula de isotiocianato. El ión carbonio actúa como un agente alquilante típico y es probablemente responsable de la acción citotóxica de las nitrosoureas. El isotiocianato puede interactuar con proteínas y ser responsable de algunos de los efectos tóxicos de estos fármacos. Las nitrosoureas son elevadamente lipófilas, lo que les permite cruzar fácilmente membranas lipófilas, tales como aquellas encontradas en el sistema nervioso central y en la piel. Las nitrosoureas ejemplares incluyen carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) y estreptozocina.

Puede usarse un superantígeno para tratar un cáncer en combinación con uno cualquiera o más de estos agentes alquilantes, algunos de los cuales se describen a continuación.

a) Busulfán

El busulfán (también conocido como myleran) es un agente alquilante bifuncional. El busulfán se conoce químicamente como dimetanosulfonato de 1,4-butanodiol.

El busulfán no es un análogo estructural de las mostazas de nitrógeno. El busulfán está disponible en forma de comprimido para administración oral. Cada comprimido ranurado contiene 2 mg de busulfán y los ingredientes no activos son estearato de magnesio y cloruro de sodio. La semivida del busulfán es de aproximadamente 2,5 horas. El busulfán se absorbe rápidamente y probablemente por completo a través del tracto GI y se obtienen concentraciones en sangre medibles pasadas 0,5-2 horas después de la administración oral del fármaco. El busulfán se excreta lentamente en la orina, en forma de metabolitos. Se excreta aproximadamente un 10-50 % de una dosis en forma de metabolitos a las 24 horas.

El busulfán está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia mielógena crónica (mieloides, mielocítica, granulocítica). Aunque no es curativo, el busulfán reduce la masa total de granulocitos, alivia los síntomas de la enfermedad y mejora el estado clínico del paciente. Aproximadamente el 90 % de adultos con leucemia mielógena crónica no tratada previamente obtendrán una remisión hematológica con regresión o estabilización de la organomegalia después del uso de busulfán. Se ha demostrado que es superior a la irradiación esplénica respecto a los tiempos de supervivencia y al mantenimiento de los niveles de hemoglobina y que es equivalente a la irradiación para controlar la esplenomegalia.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con busulfán, por ejemplo, tratando en primer lugar con busulfán. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz del busulfán en el paciente por debajo de un nivel

inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

b) Clorambucilo

5 El clorambucilo (también conocido como leukeran) es un agente alquilante bifuncional del tipo de las mostazas de nitrógeno que se ha demostrado activo contra enfermedades neoplásicas humanas seleccionadas. El clorambucilo se conoce químicamente como ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanoico.

10 El clorambucilo está disponible en forma de comprimido para administración oral. Se absorbe rápida y completamente a través del tracto gastrointestinal. Después de dosis orales individuales de 0,6-1,2 mg/kg, se alcanzan niveles máximos de clorambucilo en plasma trascurrida una hora y la semivida terminal del fármaco parental se estima en 1,5 horas. Pueden usarse de 0,1 a 0,2 mg/kg/día o de 3 a 6 mg/m²/día o como alternativa 0,4 mg/kg para el tratamiento antineoplásico. Los regímenes de tratamiento se conocen bien por los expertos en la materia y pueden encontrarse en las obras "Physicians Desk Reference" y en "Remington's Pharmaceutical Sciences", citadas en el presente documento.

15 El clorambucilo está indicado para el tratamiento de leucemia linfática (linfocítica) crónica, linfomas malignos, incluyendo linfosarcoma, linfoma folicular gigante y enfermedad de Hodgkin. No es curativo en ninguno de estos trastornos pero puede producir una paliación clínicamente útil.

20 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con clorambucilo, por ejemplo, tratando en primer lugar con clorambucilo. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz del clorambucilo en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

25 c) Ciclofosfamida

30 La ciclofosfamida es monohidrato de N,N-bis(2-cloroetil)tetrahidro-2H-1,3,2-oxaazafosforin-2-amina, 2 óxido; denominada Cytosan, disponible a través de mead Johnson; y Neosar, disponible a través Adria. La ciclofosfamida se prepara condensando 3-amino-1-propanol con N,N-bis(2-cloroetilo), dicloruro fosforamídico, [(CICH₂CH₂)₂N-POCl₂] en solución de dioxano bajo la influencia catalítica de trietilamina. La condensación es doble, implicando tanto a los grupos hidroxilo como a los grupos amino, efectuando de este modo la ciclación.

35 A diferencia de otros alquilantes de β-cloroetilamino, no cicla fácilmente en la forma activa de etilenimonio hasta que se activa por las enzimas hepáticas. Por lo tanto, la sustancia es estable en el tracto gastrointestinal, se tolera bien y es eficaz por las rutas oral y parenteral y no causa vesicación local, necrosis, flebitis o incluso dolor. La ciclofosfamida tiene una semivida de aproximadamente 4-8 horas y se metaboliza por el hígado en sus componentes activos: acroleína, 4-aldofosfamida, 4-hidroxi-peroxiciclofosfamida y mostaza de nor-nitrógeno.

40 Las dosis adecuadas para adultos incluyen, por vía oral, de 1 a 5 mg/kg/día (normalmente en combinación), dependiendo de la tolerancia gastrointestinal; o de 1 a 2 mg/kg/día; por vía intravenosa, inicialmente de 40 a 50 mg/kg en dosis divididas durante un periodo de 2 a 5 días o de 10 a 15 mg/kg cada 7 a 10 días o de 3 a 5 mg/kg dos veces a la semana o de 1,5 a 3 mg/kg/día. Puede administrarse una dosis de 250 mg/kg/día como antineoplásico. Debido a los efectos adversos gastrointestinales, se prefiere la ruta intravenosa para la dosis de carga. Durante el mantenimiento, normalmente se desea un recuento leucocitario de 3000 a 4000/mm³. A menudo también se administra el fármaco por vía intravenosa, mediante infiltración o en las cavidades corporales. Está disponible en formas de dosificación para inyección de 100, 200 y 500 mg y en comprimidos de 25 y 50 mg. Se remite al experto en la materia a "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, Capítulo 61, incorporada al presente documento por referencia, para detalles relativos a las dosis para su administración.

50 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con ciclofosfamida, por ejemplo, tratando en primer lugar con ciclofosfamida. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de la ciclofosfamida en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

55 d) Melfalano

60 El melfalano, también conocido como alkeran, mostaza de L-fenilalanina, mostada de fenilalanina, L-PAM o L-sarcolisina, es un derivado de fenilalanina de mostaza de nitrógeno. El melfalano es un agente alquilante bifuncional que es activo contra enfermedades neoplásicas humanas selectivas. Químicamente se conoce como 4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina.

65 El melfalano es el isómero L activo del compuesto y se sintetizó por primera vez en 1953 por Berger y Stock; el isómero D, conocido como medfalano, es menos activo contra determinados tumores animales y la dosis necesaria para producir efectos en los cromosomas es mayor que la necesaria con el isómero L. La forma (DL-) racémica se conoce como melfalano o sarcolisina. El melfalano es insoluble en agua y tiene un pKa₁ de ~2,1. El melfalano está

disponible en forma de comprimido para administración oral y se ha usado para tratar el mieloma múltiple.

Las pruebas disponibles sugieren que de aproximadamente un tercio a aproximadamente la mitad de los pacientes con mieloma múltiple muestran una respuesta favorable a la administración oral del fármaco.

5 El melfalano se ha usado en el tratamiento del carcinoma ovárico epitelial. Un régimen usado normalmente para el tratamiento del carcinoma de ovario ha sido administrar melfalano a una dosis de 0,2 mg/kg a diario durante cinco días como un solo ciclo. Los ciclos se repiten cada cuatro a cinco semanas dependiendo de la tolerancia hematológica (Smith y Rutledge, 1975; Young et al., 1978). Como alternativa, la dosis de melfalano usada puede ser
10 tan baja como 0,05 mg/kg/día o tan alta como 3 mg/kg/día o cualquier dosis intermedia o por encima de estas dosis. Será necesario efectuar alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del paciente que se esté tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

15 La absorción del melfalano a través del tracto gastrointestinal es variable; se ha comunicado que la biodisponibilidad media es del 56 % pero puede variar desde el 25 hasta el 89 %. La absorción se reduce por la presencia de alimento. Después de la absorción se distribuye rápidamente por todo el agua corporal con un volumen de distribución de aproximadamente 0,5 litros por kg de peso corporal y se ha comunicado se inactiva principalmente por hidrólisis espontánea. Se ha comunicado que la semivida en plasma terminal del melfalano es del orden de 40 a
20 140 minutos. El melfalano se excreta por la orina, aproximadamente un 10 % como fármaco no cargado. Se ha comunicado que aproximadamente de un 50 a un 60 % de una dosis absorbida está inicialmente unida a proteínas, aumentando a entre un 80 a 90 % después de 12 horas.

25 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con melfalano, por ejemplo, tratando en primer lugar con melfalano. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz del melfalano en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

30 e) Carmustina

La carmustina (carmustina estéril) es una de las nitrosoureas usadas en el tratamiento de determinadas enfermedades neoplásicas. Es 1,3bis(2-clorofenil)-1-nitrosourea. Se encuentra en forma de copos liofilizados de color amarillo pálido o una masa congelada con un peso molecular de 214,06. Es elevadamente soluble en alcohol y lípidos y muy poco soluble en agua. La carmustina se administra por infusión intravenosa después de su
35 reconstitución, según se recomienda. La carmustina estéril está fácilmente disponible en viales monodosis de 100 mg de material liofilizado.

Aunque se admite generalmente que la carmustina alquila al ADN y ARN, no es resistente de manera cruzada con otros alquilantes. Como con otras nitrosoureas, también puede inhibir diversos procesos enzimáticos clave mediante la carbamoylación de aminoácidos en proteínas.
40

La carmustina está indicada como terapia paliativa como agente único o en terapia combinada establecida con otros agentes quimioterapéuticos aprobados en tumores cerebrales, tales como glioblastoma, glioma del tallo cerebral, meduloblastoma, astrocitoma, ependimoma y tumores cerebrales metastásicos. También se ha usado en
45 combinación con prednisolona para tratar el mieloma múltiple. Se ha demostrado que la carmustina es útil en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y en linfomas no de Hodgkin, como terapia secundaria en combinación con otros fármacos aprobados en pacientes con recaída mientras están en tratamiento con la terapia principal o que no responden a la terapia principal.

50 La dosis recomendada de carmustina como agente único en pacientes no tratados previamente es de 150 a 200 mg/m² por vía intravenosa cada 6 semanas. Esto puede administrarse como una sola dosis o dividirse en inyecciones diarias, tales como de 75 a 100 mg/m² en 2 días consecutivos. La semivida terminal media es de aproximadamente 22 minutos.

55 Cuando se usa carmustina en combinación con otros fármacos mielosupresores o en pacientes en los que la reserva de médula ósea está agotada, las dosis deben ajustarse consecuentemente. Las dosis posteriores a la dosis inicial deben ajustarse de acuerdo con la respuesta hematológica del paciente a la dosis anterior. Por supuesto, se entiende que pueden usarse otras dosis en la presente invención, por ejemplo, 10 mg/m², 20 mg/m², 30 mg/m², 40 mg/m², 50 mg/m², 60 mg/m², 70 mg/m², 80 mg/m², 90 mg/m², 100 mg/m². Se remite al experto en la materia a
60 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, Capítulo 61. Será necesario efectuar alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del paciente que se esté tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

65 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con carmustina, por ejemplo, tratando en primer lugar con carmustina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de la carmustina en el paciente por debajo

de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

f) Lomustina

5 La lomustina es una de las nitrosoureas usadas en el tratamiento de determinadas enfermedades neoplásicas. Es 1-(2-cloro-etil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea. Es un polvo de color amarillo con la fórmula empírica de $C_9H_{16}ClN_3O_2$ y un peso molecular de 233,71. La lomustina es soluble en etanol al 10 % (0,05 mg por ml) y en alcohol puro (70 mg por ml). La lomustina es relativamente insoluble en agua (<0,05 mg por ml). Está relativamente no ionizada a un pH fisiológico. Los ingredientes inactivos en las cápsulas de lomustina son: estearato de magnesio y manitol.

10 Aunque se admite generalmente que la lomustina alquila al ADN y ARN, no es resistente de manera cruzada con otros alquilantes. Como con otras nitrosoureas, también puede inhibir diversos procesos enzimáticos clave mediante la carbamoilación de aminoácidos en proteínas.

15 La lomustina puede administrarse por vía oral. Después de la administración por vía oral de lomustina radioactiva a dosis en el intervalo de 30 mg/m^2 a 100 mg/m^2 , se excretó aproximadamente la mitad de la radioactividad administrada en forma de productos de degradación trascurridas 24 horas.

20 La semivida en suero de los metabolitos se encuentra en el intervalo de 16 horas a 2 días. Los niveles en tejido son comparables a los niveles plasmáticos a los 15 minutos después de la administración intravenosa.

25 Se ha demostrado que la lomustina es útil como agente único además de para otras modalidades de tratamiento o en terapia combinada establecida con otros agentes quimioterapéuticos aprobados, en tumores cerebrales tanto primarios como secundarios, en pacientes que ya se han sometido a procedimientos quirúrgicos y/o radioterapéuticos adecuados. También ha demostrado ser eficaz en la terapia secundaria contra la enfermedad de Hodgkin en combinación con otros fármacos aprobados en pacientes que tienen recaídas mientras están tratándose con la terapia primaria o que no responden a la terapia principal.

30 La dosis recomendada de lomustina en adultos y niños como agente único en pacientes no tratados previamente es de 130 mg/m^2 como una sola dosis oral cada 6 semanas. En individuos con la función de la médula ósea comprometida, la dosis debe reducirse a 100 mg/m^2 cada 6 semanas. Cuando se usa lomustina en combinación con otros fármacos mielosupresores, las dosis deben ajustarse consecuentemente. Se entiende que pueden usarse otras dosis, por ejemplo, 20 mg/m^2 , 30 mg/m^2 , 40 mg/m^2 , 50 mg/m^2 , 60 mg/m^2 , 70 mg/m^2 , 80 mg/m^2 , 90 mg/m^2 , 100 mg/m^2 , 120 mg/m^2 o cualquier dosis entre estas cifras según determine necesario el clínico para el individuo al que se esté tratando.

40 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con lomustina, por ejemplo, tratando en primer lugar con lomustina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de la lomustina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

3. Antimetabolitos

45 Los antimetabolitos detienen la síntesis del ADN y del ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, los antimetabolitos influyen específicamente al ciclo celular durante la fase S. Los antimetabolitos que son análogos estructurales de nucleótidos se incorporan en los componentes celulares como si fuesen la pirimidina o purina esencial y por consiguiente, detiene la síntesis de ácidos nucleicos. Otros antimetabolitos detienen procesos enzimáticos esenciales del metabolismo. Un ejemplo es el antagonista de folato, 5-fluorouracilo, que detiene el metabolismo vital del ácido fólico. Los antimetabolitos ejemplares incluyen cladribina, citarabina (arabinósido de citosina), floxuridina (FUDR, 5-fluorodesoxiuridina), fludarabina, 5-fluorouracilo (5FU), gemcitabina, hidroxurea, 6-mercaptopurina (6MP), metotrexato (amopterina), 6-tioguanina, pentostatina, pibobromano, tegafur, trimetrexato, glucuronato.

55 Los antimetabolitos se han usado para combatir leucemias crónicas además de tumores de mama, ovario y del tracto gastrointestinal. Los superantígenos pueden usarse en combinación con uno o más de los antimetabolitos descritos a continuación en el presente documento.

a) 5-fluorouracilo y compuestos relacionados

60 El 5-fluorouracilo (5-FU) es el nombre químico de 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidindiona. Se cree que su mecanismo de acción es mediante el bloqueo de la reacción de metilación del ácido desoxirribonucleico a ácido timidílico. Por lo tanto, el 5-FU interfiere con la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y en menor medida inhibe la formación de ácido ribonucleico (ARN). Ya que el ADN y el ARN son esenciales para la división y proliferación celular, se cree que el efecto del 5-FU es crear una deficiencia de timidina que da lugar a la muerte celular. Por lo tanto, el efecto del 5-FU se encuentra en células que se dividen rápidamente, una característica de los cánceres metastásicos.

65

La semivida de eliminación del 5-FU es de 6 a 20 minutos y es dependiente de la dosis. El metabolismo del 5-FU sucede principalmente en el hígado y da como resultado productos de degradación (por ejemplo, dióxido de carbono, urea, a-fluoro-b-alanina) que son inactivos. Aproximadamente el 15 % de la dosis se excreta intacta en la orina a las 6 horas y más del 90 % de esta se excreta en la primera hora; del 60 al 80 % se excreta como dióxido de carbono en la respiración a las 8 a 12 horas.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con 5-FU, por ejemplo, tratando en primer lugar con 5-FU. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de 5-FU en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

También se incluyen en la presente invención otros compuestos que están relacionados con el 5-FU (por ejemplo, pero sin limitación, capecitabina XELODA® (Roche)).

15 **b) Gemcitabina**

La gemcitabina se usa normalmente para carcinomas de pulmón no microcíticos y para el carcinoma pancreático. Se administran dosis de 1000 a 1250 mg/m² de gemcitabina mediante una inyección IV de 30 minutos una vez a la semana durante 3 semanas seguido de 1 semana de descanso. Se han estudiado diversas pautas de dosificación para la combinación de gemcitabina con cisplatino para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico avanzado; se han usado dosis de gemcitabina de 1000 mg/m² administradas una vez a la semana durante 3 semanas en un ciclo de 4 semanas o de 1250 mg/m² administradas una vez a la semana durante 2 semanas en un ciclo de 3 semanas en grandes ensayos aleatorizados. Otras pautas de dosificación para gemcitabina (por ejemplo, dosis mayores, dosis menores administradas durante periodos de infusión más largos) también pueden usarse. Por ejemplo, también pueden administrarse dosis de 65 mg/kg.

La semivida de la gemcitabina depende de la duración del periodo de infusión, de la edad y del sexo. Por ejemplo, la semivida de la gemcitabina para infusiones cortas varía de 32 a 94 minutos y el valor para infusiones prolongadas varía desde 245 hasta 638 minutos. La menor eliminación en mujeres y ancianos da como resultado concentraciones mayores de gemcitabina para cualquier dosis administrada. En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con gemcitabina, por ejemplo, tratando en primer lugar con gemcitabina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de gemcitabina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

35 **c) Pemetrexed**

El Pemetrexed (Alimta®) es un agente antifolato. Más específicamente, el pemetrexed y sus poliglutamatos inhiben al menos cuatro enzimas implicadas en el metabolismo del folato y en la síntesis del ADN; se especula con que esta acción multidiana limita el desarrollo de resistencia al fármaco. Está aprobado para el tratamiento de pacientes con mesotelioma pleural maligno que no son candidatos para la resección quirúrgica. También se ha demostrado que el fármaco tiene actividad antitumoral en carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal, cáncer de mama y varias otras neoplasias.

El pemetrexed se administra por vía intravenosa (IV) a una dosis de 500 miligramos/metro cuadrado (mg/m²) durante 10 minutos en el día 1 de cada ciclo de 21 días. Después de las dosis intravenosas (que varían de 0,2 a 838 mg/m²), el pemetrexed tiene un volumen de distribución de 16,1 litros, lo que sugiere una distribución limitada en tejidos y una eliminación de 91,8 mililitros/minuto. La unión a proteínas es de aproximadamente el 81 %. El metabolismo parece mínimo y la mayoría de una dosis se excreta inalterada en la orina. La semivida es de aproximadamente 3,5 horas.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con pemetrexed, por ejemplo, tratando en primer lugar con pemetrexed. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de pemetrexed en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

4. Antibióticos antitumorales

Los antibióticos antitumorales tienen actividad tanto antimicrobiana como citotóxica. Estos fármacos también interfieren con el ADN inhibiendo químicamente enzimas y la mitosis o alterando las membranas celulares. Estos agentes no son específicos de fase, por lo que funcionan en todas las fases del ciclo celular. Por lo tanto, se usan ampliamente para una diversidad de cánceres. La mayoría de los antibióticos antitumorales se intercalan entre pares de bases de ADN y alteran la síntesis y/o función de los ácidos nucleicos. Sin embargo, se adscribe un mecanismo diferente para la bleomicina. La bleomicina aparentemente se une al ADN y da como resultado roturas monocatenarias y escisiones bicatenarias, alterando de este modo la síntesis de ADN. La doxorubicina no solo se intercala entre pares de bases, sino que también alquila a macromoléculas. La daunorrubicina, doxorubicina y sus

derivados, pertenecen a una subclase de antibióticos antitumorales denominados antraciclinas. Los antibióticos antitumorales ejemplares incluyen aclarrubicina, bleomicina, dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorrubicina (adriamicina), epirubicina, idarrubicina, mitomicina C, mitoxantrona, plicamicina (mitramicina). Los superantígenos pueden usarse en combinación con uno o más de los antibióticos antitumorales descritos a continuación en el presente documento.

a) Doxorrubicina

El clorhidrato de doxorrubicina, 5,12-naftaceno-1,4-diona, (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-a-L-ribo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-clorhidrato (clorhidrato de hidroxidaunorrubicina, adriamicina) se usa en un amplio espectro antineoplásico. Se une al ADN e inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, inhibe la mitosis y promueve aberraciones cromosómicas.

Administrada individualmente, es el primer fármaco de elección para el tratamiento del adenoma de tiroides y del carcinoma hepatocelular. Es un componente de 31 combinaciones de primera elección para el tratamiento de tumores de ovarios, endometrio y mama, carcinoma broncogénico de células en avelana, carcinoma no microcítico de pulmón, adenocarcinoma gástrico, retinoblastoma, neuroblastoma, micosis fungoide, carcinoma pancreático, carcinoma prostático, carcinoma de vejiga, mieloma, linfoma histiocítico difuso, tumor de Wilms, enfermedad de Hodgkin, tumores adrenales, sarcoma osteogénico, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma y leucemia linfocítica aguda. Es un fármaco alternativo para el tratamiento de cánceres de células de islote, de cuello de útero, testiculares y adrenocorticales. También es inmunosupresor.

La doxorrubicina se absorbe mal y debe administrarse por vía intravenosa. La farmacocinética es multicompartmental. Las fases de distribución tienen semividas de 12 minutos y 3,3 horas. La semivida es de aproximadamente 30 horas. Del cuarenta al 50 % se secreta en la bilis. La mayoría del remanente se metaboliza en el hígado, parcialmente en un metabolito activo (doxorubicinol), pero un porcentaje pequeño se excreta en la orina. En presencia de insuficiencia hepática debe reducirse la dosis.

Las dosis adecuadas, por vía intravenosa, para un adulto de 60 a 75 mg/m² a intervalos de 21 días o de 25 a 30 mg/m² en cada uno de 2 o 3 días consecutivos repitiendo a intervalos de 3 o 4 semanas o 20 mg/m² una vez a la semana. Debe usarse la dosis más baja en pacientes ancianos, cuando hay depresión de la médula ósea causada por quimioterapia anterior o por invasión neoplásica de la médula o cuando el fármaco se combina con otros fármacos supresores mielopoyéticos. La dosis debe reducirse en un 50 % si la bilirrubina en suero se encuentra entre 1,2 y 3 mg/dl y en un 75 % si se encuentra por encima de 3 mg/dl. La dosis total de por vida no debe exceder los 550 mg/m² en pacientes con función cardíaca normal y 400 mg/m² en personas que han recibido irradiación del mediastino. Como alternativa, 30 mg/m² en cada uno de 3 días consecutivos, repetido cada 4 semanas. Las dosis ejemplares pueden ser 10 mg/m², 20 mg/m², 30 mg/m², 50 mg/m², 100 mg/m², 150 mg/m², 175 mg/m², 200 mg/m², 225 mg/m², 250 mg/m², 275 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m², 425 mg/m², 450 mg/m², 475 mg/m², 500 mg/m². Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con doxorrubicina, por ejemplo, tratando en primer lugar con doxorrubicina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de doxorrubicina en el paciente por debajo de un nivel inhibitorio funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

b) Daunorrubicina

El clorhidrato de daunorrubicina, 5,12-naftaceno-1,4-diona, (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-a-L-ribo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-10-metoxi-, clorhidrato; también denominado cerrubidina y disponible a través de Wyeth. La daunorrubicina se intercala en el ADN, bloquea a la ARN polimerasa dirigida por ADN e inhibe la síntesis de ADN. Puede evitar la división celular a dosis que no interfieren con la síntesis de ácido nucleico.

En combinación con otros fármacos se incluye en la quimioterapia de primera elección de la leucemia mielocítica aguda en adultos (para inducir la remisión), en la leucemia linfocítica aguda y en la fase aguda de la leucemia mielocítica crónica. La absorción por vía oral es baja y debe administrarse por vía intravenosa. La semivida de distribución es de 45 minutos y la de eliminación de aproximadamente 19 horas. La semivida de su metabolito activo, el daunorrubicinol, es de aproximadamente 27 horas. La daunorrubicina se metaboliza principalmente en el hígado y también se secreta en la bilis (aproximadamente el 40 %). Debe reducirse la dosis si hay insuficiencia hepática o retiniana.

Las dosis adecuadas son (equivalente de base), por vía intravenosa en adultos mayores de 60 años 45 mg/m²/día (30 mg/m² para pacientes mayores de 60 años) durante 1, 2 o 3 días cada 3 o 4 semanas o de 0,8 mg/kg/día durante 3 a 6 días cada 3 o 4 semanas; no deben administrarse más de 550 mg/m² en toda la vida o solo 450 mg/m² si ha habido irradiación de pecho; en niños, 25 mg/m² una vez a la semana a menos que la edad sea menos de 2

años o la superficie corporal de menos de 0,5 m, en cuyo caso se usa la pauta basada en peso de adultos. Está disponible en formas de dosificación inyectables (equivalente de base) de 20 mg (como equivalente de base de 21,4 mg del clorhidrato). Las dosis ejemplares pueden ser 10 mg/m², 20 mg/m², 30 mg/m², 50 mg/m², 100 mg/m², 150 mg/m², 175 mg/m², 200 mg/m², 225 mg/m², 250 mg/m², 275 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m², 425 mg/m², 450 mg/m², 475 mg/m², 500 mg/m². Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con daunorrubicina, por ejemplo, administrando en primer lugar daunorrubicina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de daunorrubicina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

c) Mitomicina

La mitomicina (también conocida como mutamicina y/o mitomicina C) es un antibiótico aislado del caldo de *Streptomyces caespitosus* que ha demostrado tener actividad antitumoral. El compuesto es estable al calor, tiene un elevado punto de fusión y es altamente soluble en disolventes orgánicos.

La mitomicina inhibe de manera selectiva la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). El contenido en guanina y citosina se correlaciona con el grado de reticulación inducido por la mitomicina. A elevadas concentraciones del fármaco, también se suprimen la síntesis de ARN celular y de proteínas.

En seres humanos, la mitomicina se elimina rápidamente del suero después de administración intravenosa. El tiempo necesario para reducir la concentración en suero en un 50 % después de inyecciones de bolos de 30 mg es de 17 minutos. Después de la inyección de 30 mg, 20 mg o 10 mg por vía I.V., las concentraciones séricas máximas fueron de 2,4 mg/ml, 1,7 mg/ml y 0,52 mg/ml, respectivamente. La eliminación se efectúa principalmente mediante metabolismo en el hígado, pero también sucede el metabolismo en otros tejidos. La velocidad de eliminación es inversamente proporcional a la concentración sérica máxima debido a, según se cree, la saturación de las vías degradativas. Aproximadamente el 10 % de la dosis de mitomicina se excreta inalterada en la orina. Ya que las rutas metabólicas se saturan a dosis relativamente bajas, el porcentaje de una dosis excretado en la orina aumenta al aumentar la dosis. En niños, la excreción de la mitomicina administrada por vía intravenosa es similar.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con mitomicina, por ejemplo, tratando en primer lugar con mitomicina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de mitomicina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

d) Actinomicina D

La actinomicina D (Dactinomicina) [50-76-0]; C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆ (1255,43) es un fármaco antineoplásico que inhibe a la ARN polimerasa dependiente de ADN. Es un componente de combinaciones de primera elección para el tratamiento del coriocarcinoma, del rhabdomyosarcoma embrionario, del tumor testicular y del tumor de Wilms. Los tumores que no responden al tratamiento sistémico en ocasiones responden a la perfusión local. La dactinomicina potencia la radioterapia. Es un inmunosupresor secundario (eferente).

La actinomicina D se usa en combinación con la cirugía primaria, radioterapia y otros fármacos, particularmente vincristina y ciclofosfamida. También se ha indicado actividad antineoplásica en tumor de Ewing, sarcoma de Kaposi y sarcomas de tejidos blandos. La dactinomicina puede ser eficaz en mujeres con casos avanzados de coriocarcinoma. También produce respuestas consistentes en combinación con clorambucilo y metotrexato en pacientes con carcinomas testiculares metastásicos. En ocasiones puede observarse una respuesta en pacientes con enfermedad de Hodgkin y en linfomas no de Hodgkin. También se ha usado la dactinomicina para inhibir respuestas inmunológicas, particularmente el rechazo de trasplantes renales.

La mitad de la dosis se excreta intacta en la bilis y el 10 % en la orina; la semivida es de aproximadamente 36 horas. El fármaco no pasa a través de la barrera hematoencefálica. La actinomicina D se suministra en forma de polvo liofilizado (0,5 mg en cada vial). Su dosis habitual es de 10 a 15 mg/kg; esta se administra por vía intravenosa durante 5 días; si no aparecen manifestaciones de toxicidad, pueden administrarse ciclos adicionales a intervalos de 3 a 4 semanas. Se han administrado inyecciones diarias de 100 a 400 mg a niños durante 10 a 14 días; en otros regímenes, se han usado de 3 a 6 mg/kg hasta un total de 125 mg/kg y dosis de mantenimiento semanales de 7,5 mg/kg. Aunque es más seguro administrar el fármaco en el tubo de una infusión intravenosa, se han administrado inyecciones intravenosas directas, con la precaución de desechar la aguja usada para extraer el fármaco del vial para evitar reacciones subcutáneas. Las dosis ejemplares pueden ser 100 mg/m², 150 mg/m², 175 mg/m², 200 mg/m², 225 mg/m², 250 mg/m², 275 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m², 425 mg/m², 450 mg/m², 475 mg/m², 500 mg/m². Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con actinomicina D, por ejemplo, tratando en primer lugar con actinomicina D. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de actinomicina D en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

5 e) Bleomicina

La bleomicina es una mezcla de antibióticos glucopeptídicos citotóxicos aislados de una cepa de *Streptomyces verticillus*. Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto de la bleomicina, las pruebas disponibles parecen indicar que el modo principal de acción es la inhibición de la síntesis de ADN con algunas evidencias de inhibición menor de la síntesis de ARN y proteína.

En ratones, se encuentran concentraciones elevadas de bleomicina en la piel, pulmones, riñones, peritoneo y conductos linfáticos. Se ha descubierto que las células tumorales de la piel y de los pulmones tienen elevadas concentraciones de bleomicina en comparación con las bajas concentraciones encontradas en el tejido hematopoyético. Las bajas concentraciones de bleomicina encontradas en la médula ósea pueden relacionarse con niveles elevados de enzimas degradantes de la bleomicina que se encuentran en este tejido.

En pacientes con un aclaramiento de creatinina > 35 ml por minuto, la semivida de eliminación terminal en suero o plasma de bleomicina es de aproximadamente 115 minutos. En pacientes con un aclaramiento de creatinina < 35 ml por minuto, la semivida de eliminación terminal en plasma o suero aumenta exponencialmente a medida que disminuye el aclaramiento de creatinina. En seres humanos, se recupera en la orina del 60 % al 70 % de una dosis administrada en forma de bleomicina activa. La bleomicina puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Es altamente soluble en agua.

La bleomicina debe considerarse como un tratamiento paliativo. Se ha demostrado que es útil para el control de las siguientes neoplasias, bien como un agente único o en combinaciones probadas con otros agentes quimioterapéuticos aprobados en carcinomas de células escamosas, tales como de cabeza y cuello (incluyendo de boca, lengua, amígdalas, nasofaringe, orofaringe, senos, paladar, labio, mucosa bucal, encías, epiglotis, laringe), de piel, de pene, de cuello de útero y de vulva. También se ha usado en el tratamiento de linfomas y de carcinoma testicular.

Debido a la posibilidad de una reacción anafiláctica, los pacientes con linfoma deben tratarse con dos unidades o menos durante las dos primeras dosis. Si no aparecen reacciones agudas, puede seguirse la siguiente pauta de dosis regular.

La mejora en la enfermedad de Hodgkin y en tumores testiculares es rápida y se percibe en 2 semanas. Si no se observa mejora trascurrido este tiempo, es improbable que haya mejora. Los cánceres de células escamosas responden más lentamente, necesitando en ocasiones hasta 3 semanas antes de que se perciba ninguna mejora.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con bleomicina, por ejemplo, tratando en primer lugar con bleomicina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de bleomicina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

5. Inhibidores mitóticos

Los inhibidores mitóticos o inhibidores de la mitosis, incluyen alcaloides de plantas y otros agentes naturales que pueden inhibir bien la síntesis de proteínas necesaria para la división celular o la mitosis. Funcionan durante una fase específica durante el ciclo celular. Los inhibidores mitóticos incluyen entre otros los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina) que son inhibidores del huso mitótico y las epipodofilotoxinas (tenipósido y etopósido) que son inhibidores de la ADN topoisomerasa II. Los inhibidores del huso mitótico se unen a proteínas microtubulares y bloquean su capacidad para polimerizarse y despolimerizarse, un proceso que detiene la división nuclear. Los inhibidores de la ADN topoisomerasa II bloquean la religación de las roturas del ADN bicatenario (por ejemplo, la separación de cromátidas hermanas o ADN escindido). Los ejemplos incluyen etopósido (VP-16, VePesid), paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (Taxotere), tenipósido (VM-26, Vumon), vinblastina, vincristina, vindesina, topotecán, e irinotecán. Los superantígenos pueden usarse en combinación con uno o más de los inhibidores mitóticos descritos a continuación en el presente documento.

60 a) Paclitaxel

El paclitaxel (TAXOL®) es un agente antimitótico experimental, aislado de la corteza del fresno, *Taxus brevifolia*. Se une a la tubulina (en un sitio distinto al usado por los alcaloides de la vinca) y promueve el ensamblaje de los microtúbulos. Se sabe que el paclitaxel tiene actividad alta contra el melanoma maligno y el carcinoma de ovario. Las dosis máximas son 30 mg/m² por día durante 5 días o de 210 a 250 mg/m² administrados una vez cada 3 semanas. Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de

estos valores sea útil en la invención.

En pacientes tratados con dosis de 135 y 175 mg/m² administrados como infusiones de 3 y 24 horas, la semivida varía de 3,0 a 52,7 horas y la eliminación corporal total varía de 11,6 a 24,0 l/h/m². El volumen de estado estacionario medio de distribución después de infusión de una sola dosis de 135 y 175 mg/m² varía de 198 a 688 l/m², lo que indica una distribución extravascular extensa y/o unión a tejidos. El volumen de distribución se reduce en sujetos femeninos. Después de 3 horas de infusión de 175 mg/m², la semivida terminal media se estima que es de 9,9 horas; la eliminación corporal total es de 12,4 l/h/m².

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con paclitaxel, por ejemplo, tratando en primer lugar con paclitaxel. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de paclitaxel en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

15 **b) Docetaxel**

El docetaxel (TAXOTERE®) se administra como tratamiento para algunos tipos de cáncer. Se usa más comúnmente para tratar el cáncer de mama y el carcinoma no microcítico de pulmón, pero puede usarse para otros tipos de cáncer. El docetaxel se administra mediante infusión IV durante un periodo de 1 hora en condiciones ambientales de temperatura e iluminación. La dosificación de docetaxel varía de 20 mg/m² a 115 mg/m². La semivida es de aproximadamente 13,5 +/- 7,5 horas.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con docetaxel, por ejemplo, tratando en primer lugar con docetaxel. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de docetaxel en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

30 **c) Vinblastina**

La vinblastina es otro ejemplo de alcaloide de plantas que puede usarse en combinación con un superantígeno para el tratamiento del cáncer y de precánceres. Cuando se incuban células con vinblastina, sucede la disolución de microtúbulos.

Se ha comunicado absorción impredecible después de la administración oral de vinblastina o vincristina. A las dosis clínicas habituales, la concentración máxima de cada fármaco en plasma es de aproximadamente 0,4 mM. La vinblastina y la vincristina se unen a proteínas plasmáticas. Están extensamente concentradas en plaquetas y en menor grado en leucocitos y eritrocitos.

Después de inyección intravenosa, la vinblastina tiene un patrón de eliminación plasmática multifásico; después de la distribución, el fármaco desaparece del plasma con semividas de aproximadamente 1 y 20 horas. La vinblastina se metaboliza en el hígado en su derivado biológicamente activo, desactilvinblastina. Se detecta aproximadamente un 15 % de una dosis administrada intacta en la orina y se recupera aproximadamente el 10 % en las heces después de su excreción biliar. Deben reducirse las dosis en pacientes con disfunción hepática. Está indicada una reducción de al menos un 50 % en la dosificación si la concentración plasmática de bilirrubina es mayor de 3 mg/dl (aproximadamente 50 mM).

El sulfato de vinblastina está disponible en preparaciones para inyección. El fármaco se administra por vía intravenosa; deben tomarse precauciones especiales contra la extravasación subcutánea, ya que esto puede causar una irritación y ulceración dolorosa. El fármaco no debe inyectarse en una extremidad con una insuficiencia circulatoria. Después de una sola dosis de 0,3 mg/kg de peso corporal, la mielosupresión alcanza su máximo a los 7 a 10 días. Si no se obtiene un nivel moderado de leucopenia (aproximadamente 3000 células/mm³), la dosis semanal tiene que aumentarse gradualmente en incrementos de 0,05 mg/kg de peso corporal. En regímenes diseñados para curar el cáncer testicular, la vinblastina se usa en dosis de 0,3 mg/kg cada 3 semanas independientemente de los recuentos de células sanguíneas o toxicidad.

El uso clínico más importante de la vinblastina es con bleomicina y con cisplatino en la terapia curativa de tumores testiculares metastásicos. Se han comunicado respuestas beneficiosas en diversos linfomas, en particular en la enfermedad de Hodgkin, donde puede observarse una mejora significativa en un 50 a un 90 % de los casos. La efectividad de la vinblastina en una elevada proporción de los linfomas no disminuye cuando la enfermedad es refractaria a agentes alquilantes. También es activa en el sarcoma de Kaposi, neuroblastoma y en la enfermedad de Letterer-Siwe (histiocitosis X), así como en el carcinoma de mama y en el coriocarcinoma en mujeres.

Las dosis de vinblastina se determinarán por el médico de acuerdo con las necesidades individuales del paciente. Pueden administrarse de 0,1 a 0,3 mg/kg o también pueden administrarse de 1,5 a 2 mg/m². Como alternativa, pueden administrarse 0,1 mg/m², 0,12 mg/m², 0,14 mg/m², 0,15 mg/m², 0,2 mg/m², 0,25 mg/m², 0,5 mg/m², 1,0 mg/m², 1,2 mg/m², 1,4 mg/m², 1,5 mg/m², 2,0 mg/m², 2,5 mg/m², 5,0 mg/m², 6 mg/m², 8 mg/m², 9 mg/m²,

10 mg/m², 20 mg/m². Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con vinblastina, por ejemplo, tratando en primer lugar con vinblastina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de vinblastina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

d) Vincristina

La vincristina bloquea la mitosis y produce la detención en metafase. Parece probable que la mayoría de las actividades biológicas de este fármaco puedan explicarse por su capacidad para unirse específicamente a tubulina y para bloquear la capacidad de la proteína para polimerizar en microtúbulos. Mediante la disrupción de los microtúbulos del aparato mitótico se detiene la división celular en la metafase. La incapacidad para segregar los cromosomas correctamente durante la mitosis da lugar presumiblemente a la muerte celular.

La toxicidad relativamente baja de la vincristina para las células de médula normales y células epiteliales hace que este agente sea infrecuente entre los fármacos antineoplásicos y a menudo se incluye en combinación con otros agentes mielosupresores.

Se ha comunicado absorción impredecible después de la administración oral de vinblastina o vincristina. A las dosis clínicas habituales, la concentración máxima de cada fármaco en plasma es de aproximadamente 0,4 mM.

La vinblastina y la vincristina se unen a proteínas plasmáticas. Están extensamente concentradas en plaquetas y en menor grado en leucocitos y eritrocitos.

La vincristina tiene un patrón de eliminación plasmática multifásico; la semivida terminal es de aproximadamente 24 horas. El fármaco se metaboliza en el hígado, pero no se han identificado derivados biológicamente activos. Deben reducirse las dosis en pacientes con disfunción hepática. Está indicada una reducción de al menos un 50 % en la dosificación si la concentración plasmática de bilirrubina es mayor de 3 mg/dl (aproximadamente 50 mM).

El sulfato de vincristina está disponible como una solución (1 mg/ml) para inyección intravenosa. La vincristina usada junto con corticoesteroides es actualmente el tratamiento de elección para inducir remisiones en la leucemia infantil; las dosis óptimas para estos fármacos parecen ser para vincristina, por vía intravenosa, 2 mg/m² de área de superficie corporal, semanalmente y para prednisona, por vía oral, 40 mg/m², diariamente. Los pacientes adultos con enfermedad de Hodgkin o linfomas no de Hodgkin reciben normalmente vincristina como parte de un protocolo complejo. Cuando se usa en el régimen MOPP, la dosis recomendada de vincristina es de 1,4 mg/m². Parece que se toleran mejor dosis altas de vincristina por niños con leucemia que por adultos, que pueden experimentar toxicidad neurológica grave. La administración del fármaco más frecuentemente que cada 7 días o a dosis mayores parece aumentar las manifestaciones tóxicas son mejora proporcional en la velocidad de respuesta. También deben tomarse precauciones para evitar la extravasación durante la administración intravenosa de vincristina. La vincristina (y la vinblastina) pueden infundirse en el suministro de sangre arterial de tumores en dosis varias veces mayores que aquellas que pueden administrarse por vía intravenosa con una toxicidad comparable.

La vincristina ha sido efectiva en la enfermedad de Hodgkin y en otros linfomas. Aunque parece ser algo menos beneficiosa que la vinblastina cuando se usa sola en la enfermedad de Hodgkin, cuando se usa con mecloretamina, prednisona y procarbazona (el régimen denominado MOPP), es el tratamiento preferido para los estadios avanzados (III y IV) de esta enfermedad. En linfomas no de Hodgkin, la vincristina es un agente importante, particularmente cuando se usa con ciclofosfamida, bleomicina, doxorubicina y prednisona. La vincristina es más útil que la vinblastina en la leucemia linfocítica. Se han comunicado respuestas beneficiosas en pacientes con varias otras neoplasias, particularmente tumor de Wilms, neuroblastoma, tumores cerebrales, rhabdomiosarcoma y carcinomas de mama, de vejiga y de los sistemas reproductivos masculinos y femeninos.

Las dosis de vincristina para su uso se determinarán por el médico de acuerdo con las necesidades individuales del paciente. Pueden administrarse de 0,01 a 0,03 mg/kg o de 0,4 a 1,4 mg/m² o también pueden administrarse de 1,5 a 2 mg/m². Como alternativa, pueden administrarse 0,02 mg/m², 0,05 mg/m², 0,06 mg/m², 0,07 mg/m², 0,08 mg/m², 0,1 mg/m², 0,12 mg/m², 0,14 mg/m², 0,15 mg/m², 0,2 mg/m², 0,25 mg/m² en forma de una infusión intravenosa constante. Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con vincristina, por ejemplo, tratando en primer lugar con vincristina. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de vincristina en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

e) Etopósido (VP16)

El VP16 también se conoce como etopósido y se usa principalmente para el tratamiento de tumores testiculares, en combinación con bleomicina y cisplatino y en combinación con cisplatino para carcinoma microcítico de pulmón. También es activo contra linfomas no de Hodgkin, leucemia no linfocítica aguda, carcinoma de mama y sarcoma de Kaposi asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

VP16 está disponible como una solución (20 mg/ml) para administración intravenosa y como cápsulas rellenas de 50 mg para uso oral. Para el carcinoma microcítico de pulmón, la dosis intravenosa (en terapia combinada) puede ser tan alta como 100 mg/m² o tan pequeña como 2 mg/m², normalmente de 35 mg/m², a diario durante 4 días, hasta 50 mg/m², a diario durante 5 días, que también se han usado. Cuando se administra por vía oral, debe duplicarse la dosis. Por lo tanto, las dosis para el carcinoma microcítico de pulmón deben ser tan altas como 200-250 mg/m². La dosis intravenosa para el cáncer testicular (en terapia combinada) es de 50 a 100 mg/m² a diario durante 5 días o de 100 mg/m² en días alternos, durante tres dosis. Los ciclos de terapia se repiten normalmente cada 3 a 4 semanas. El fármaco debe administrarse lentamente durante una infusión de 30 a 60 minutos para evitar la hipotensión y el broncoespasmo, que se deben probablemente a los disolventes usados en la formulación.

En administración intravenosa, la disposición de VP16 se describe mejor como un proceso bifásico con una semivida de distribución de aproximadamente 1,5 horas y una semivida de eliminación terminal que varía desde 4 hasta 11 horas. Los valores de eliminación corporal total varían desde 33 hasta 48 ml/min o de 16 a 36 ml/min/m² y, al igual que la semivida de eliminación terminal, son independientes de la dosis en un intervalo de 100-600 mg/m².

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con VP16, por ejemplo, tratando en primer lugar con VP16. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de VP16 en el paciente por debajo de un nivel inhibidor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

6. Compuestos basados en platino

Los compuestos basados en platino se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos disponibles más activos. Son eficaces contra una multitud de cánceres. Los agentes antineoplásicos que contienen platino, tales como carboplatino y cisplatino, parecen ejercer su efecto uniéndose al ADN, inhibiendo de este modo la síntesis de ADN. Los fármacos son inespecíficos de la fase del ciclo. El carboplatino y el cisplatino parecen actuar en células tumorales mediante los mismos mecanismos moleculares generales y, una vez unidos al ADN, tienen virtualmente la misma acción. Aunque el mecanismo de acción principal de los fármacos parece ser la inhibición de la síntesis de ADN, también están implicados otros mecanismos en su actividad antineoplásica. Los superantígenos pueden usarse en combinación con uno o más de los compuestos basados en platino descritos a continuación en el presente documento.

a) Cisplatino

El cisplatino se ha usado ampliamente para tratar cánceres, tales como testiculares metastásicos o carcinoma ovárico, cáncer de vejiga avanzado, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón u otros tumores. El cisplatino puede usarse solo o en combinación con otros agentes, usándose dosis eficaces en aplicaciones clínicas de 15-20 mg/m² durante 5 días cada tres semanas durante un total de tres ciclos. Las dosis ejemplares pueden ser 0,50 mg/m², 1,0 mg/m², 1,50 mg/m², 1,75 mg/m², 2,0 mg/m², 3,0 mg/m², 4,0 mg/m², 5,0 mg/m², 10 mg/m². Por supuesto, todas estas dosis son ejemplares y también se espera que cualquier dosificación entre medias de estos valores sea útil en la invención.

El cisplatino no se absorbe por vía oral y por lo tanto tiene que administrarse mediante inyección por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal.

Las concentraciones plasmáticas del cisplatino disminuyen monoexponencialmente con una semivida de aproximadamente 20 a 30 minutos después de la administración en bolo de dosis de 50 o 100 mg/m². La disminución monopotencial y las semividas plasmáticas de aproximadamente 0,5 horas también se observan después de dos horas o siete horas de infusiones de 100 mg/m².

Después de dosis de cisplatino de 20 a 120 mg/m², las concentraciones de platino son las más altas en el hígado, de próstata y el riñón, ligeramente más bajas en la vejiga, músculo, testículos, páncreas y bazo y más bajas en el intestino, adrenal, corazón, pulmón, cerebro y cerebelo. El platino está presente en tejidos durante hasta 180 días después de la última administración. Las concentraciones máximas de platino en glóbulos rojos se alcanzan a los 90 a 150 minutos después de una dosis de 100 mg/m² de cisplatino y disminuyen de manera bifásica con una semivida de 36 a 47 días.

En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con cisplatino, por ejemplo, tratando en primer lugar con cisplatino.

Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de cisplatino en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

b) Carboplatino

5 El carboplatino y el cisplatino se asocian con diferentes perfiles de toxicidad y el carboplatino puede ser eficaz en pacientes con tumores que responden al platino que son incapaces de tolerar el cisplatino debido a la insuficiencia renal, náuseas refractarias, dificultades auditivas o neuropatía. Se ha sugerido que aunque pueda preferirse el carboplatino en pacientes con insuficiencia renal o en pacientes en riesgo de ototoxicidad o neurotoxicidad, puede preferirse el cisplatino en pacientes que tengan reservas de médula ósea disminuidas, un riesgo elevado de septicemia o que requieran una terapia con anticoagulantes.

15 La dosis de carboplatino se basa en la respuesta clínica, renal y hematológica y en la tolerancia del paciente para obtener una respuesta terapéutica óptima con efectos adversos mínimos. Aunque las dosificaciones iniciales de carboplatino se basan en el área superficial del cuerpo, la dosificación puede calcularse más precisamente usando métodos de dosificación de formulaciones basándose en la función renal del paciente.

20 El carboplatino disminuye de manera bifásica después de una infusión intravenosa de 30 minutos de 300 a 500 mg/m². Se encontró que la semivida inicial en plasma (alfa) es de 1,1 a 2 horas (N = 6) y se encontró que la semivida en plasma postdistribución (beta) era de 2,6 a 5,9 horas (N = 6). La eliminación total del cuerpo, el volumen de distribución aparente y el tiempo medio de residencia para el carboplatino son de 4,4 l/hora, 16 l y 3,5 horas, respectivamente. El platino del carboplatino se une de manera irreversible a las proteínas plasmáticas y se elimina lentamente con una semivida de 5 días.

25 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con carboplatino, por ejemplo, tratando en primer lugar con carboplatino. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de carboplatino en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

30 c) Oxaliplatino

El oxaliplatino (Eloxatin®) complejo de organoplatino en el que el átomo de platino está en complejo con 1,2-diaminociclohexano (DACH) y con un ligando de oxalato como grupo saliente (Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. Mol Pharmacol. 1999;56:633-643).

35 El oxaliplatino se administra mediante infusión en vena durante al menos 2 horas por un profesional de la salud. Se administra típicamente como una dosis (85 mg/m²) cada 2 semanas, junto con otros fármacos (por ejemplo, 5-fluorouracilo y leucovorina). Este ciclo se repite cada 2 semanas. La dosis y frecuencia se basa en el recuento sanguíneo y en la respuesta a dosificaciones previas del sujeto. La semivida terminal es de aproximadamente 273 ± 19 h.

45 En la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con oxaliplatino, por ejemplo, tratando en primer lugar con oxaliplatino. Una vez que ha disminuido la concentración citostática eficaz de oxaliplatino en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional, puede administrarse el superantígeno al paciente.

B. Radioterapia

50 En realizaciones adicionales, se prevé que la terapia con superantígeno de la presente invención pueda usarse en combinación con radioterapia. Los rayos X, los rayos γ , y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales se han usado comúnmente para tratar enfermedades hiperproliferativas, más específicamente cáncer. Se sabe que estos factores causan daño sobre el ADN. Otras formas de factores que dañan al ADN también se contemplan, tales como microondas e irradiación UV. Es más probable que todos estos factores efectúen un amplio espectro de daño en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el montaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosis para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y del tipo de radiación emitida y de la captación por las células neoplásicas.

60 C. Cirugía

65 Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a una cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de determinación del estadio, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que puede usarse conjuntamente con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La terapia de

superantígeno de la presente invención puede usarse para el tratamiento de un paciente que se haya sometido a cirugía para tratar un cáncer.

5 La cirugía curativa incluye resección en la que la totalidad o parte del tejido canceroso se elimina físicamente, se extirpa y/o se destruye. La resección tumoral se refiere a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento mediante cirugía incluye la cirugía láser, la criocirugía, la electrocirugía y la cirugía controlada por microscopio (cirugía de Mohs).

10 Tras la escisión de una parte o de la totalidad de las células cancerosas, tejido o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede lograrse mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticáncer adicional. Puede repetirse dicho tratamiento, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de diversas dosis también.

15 **D. Moléculas dirigidas que incluyen anticuerpos**

En realizaciones adicionales, se prevé que la terapia con superantígeno de la presente invención pueda usarse en combinación con moléculas dirigidas que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo solo puede servir como efector de la terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la eliminación de células. El anticuerpo puede conjugarse a un fármaco o toxina (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un radionúclido, una cadena A de ricina, una toxina del cólera, una toxina de pertussis, etc.) y servir únicamente como agente de direccionamiento. Dichos conjugados de anticuerpos se denominan inmunotoxinas y se conocen bien en la técnica (véase la Patente de Estados Unidos 5.686.072, La Patente de Estados Unidos 5.578.706, La Patente de Estados Unidos 4.792.447, La Patente de Estados Unidos 5.045.451, La Patente de Estados Unidos 4.664.911 y la Patente de Estados Unidos 5.767.072.

30 Preferentemente, se emplean anticuerpos monoclonales humanos en inmunoterapia pasiva, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente. Por ejemplo, dichos anticuerpos se han desarrollado por ImClone Systems Incorporated. Los anticuerpos para factores de crecimiento incluyen IMC-11F8 (similar a ERBITUX™), C225 (ERBITUX™), Panitumumab, HERCEPTIN®, IMC-A12 (se dirige a receptor de factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R)), IMC-18F1 (se dirige al receptor de factor de crecimiento endotelial vascular-1 (VEGFR-1 o flt-1)). Los anticuerpos para inhibidores de la angiogénesis incluyen IMC-1121b (se dirige a receptor de factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) o avastina. Los anticuerpos para otras estructuras de la superficie celular incluyen Rituximab (se dirige a CD20).

40 En otro aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral tiene que portar algún marcador que sea susceptible de usarse como diana, es decir, que no esté presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y puede ser adecuado cualquiera de estos para usarse como diana en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumores urinarios, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

45 **E. Agentes de terapia génica**

La resistencia celular a agentes, tales como agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos, representa un problema importante en la oncología clínica. Una meta de la investigación actual del cáncer es encontrar formas de mejorar la eficacia de uno o más agentes anticáncer combinando dicho agente con terapia génica. Por ejemplo, el gen de la timidina cinasa del herpes simple (HS-tK), cuando se administra a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, indujo de manera satisfactoria la susceptibilidad al agente antivírico ganciclovir (Culver, et al., 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que pueda usarse la terapia génica de manera similar en conjunción con la terapia de superantígeno.

55 **F. Otros agentes anticáncer**

Se contempla que puedan usarse otros agentes en combinación con los superantígenos para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes de inmunoterapia, agentes que afectan a la regulación positiva de receptores de la superficie celular y de las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de tirosina cinasas, incluyendo inhibidores del receptor de factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de la adhesión celular o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores de la apoptosis. Los agentes inmunomoduladores incluyen factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2, linomida y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación positiva de los receptores de la superficie celular o sus ligandos, tales como ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL puedan potenciar las capacidades inductoras de la apoptosis de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en las células hiperproliferativas. El aumento de la señalización intercelular elevando el número de

uniones GAP podría aumentar los efectos antiproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas.

En otras realizaciones, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia anti-hiperproliferativa de los tratamientos. Los inhibidores de tirosina cinasas incluyen moléculas pequeñas que actúan como inhibidores de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tales como ZD1839 (IRESSA®), OSI-774 (TARCEVA™) y anticuerpos pasivos (también discutidos anteriormente como inmunoterapia) tales como anticuerpos C225 bloqueantes de EGFR (ERBITUX™) ABR-EGF, IMC-11F8 y HERCEPTIN®, inhibidores de la cinasa dividida, tales como PTK787/ZK 222584, SU11248, CP 549.632 y AG013736 y otros inhibidores de tirosina cinasa, tales como Imatinib (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC-412 (véase Laird y Cherrington (2003)). Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente invención. Los ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla además que puedan usarse otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento. Otros agentes incluyen OSI-7904, Lapatinib, VELCADE® y Sorafenib.

También puede usarse terapia hormonal en conjunción con la presente invención o en combinación con cualquier otra terapia para el cáncer descrita anteriormente. Puede emplearse el uso de hormonas en el tratamiento de determinados cánceres, tales como cáncer de mama, de próstata, de ovario o de cuello de útero para disminuir el nivel o bloquear los efectos de determinadas hormonas, tales como testosterona o estrógeno. Este tratamiento puede usarse en combinación con al terapia de superantígeno de la presente invención para reducir el riesgo de metástasis.

V. Terapia combinada de enfermedades hiperproliferativas

La presente invención describe el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, la reducción de una neoplasia o tumor, y/o la reducción de un tumor metastásico administrando a un sujeto que lo necesite un superantígeno en combinación con al menos un agente anticáncer, más preferentemente un agente quimioterapéutico.

A. Tipos de enfermedades hiperproliferativas

La invención se usa en el tratamiento y la prevención del cáncer. Una enfermedad hiperproliferativa es cualquier enfermedad o afección que tenga, como parte de su patología, un aumento anormal en el número de células. En dichas enfermedades se incluyen afecciones benignas, tales como hipertrofia benigna de próstata y quistes ováricos. También se incluyen lesiones premalignas, tales como hiperplasia escamosa. En el otro extremo del espectro de las enfermedades hiperproliferativas se encuentran los cánceres. Una enfermedad hiperproliferativa puede implicar células de cualquier tipo celular. La enfermedad hiperproliferativa puede asociarse o no con un aumento de tamaño de células individuales en comparación con células normales.

Otro tipo de enfermedad hiperproliferativa es una lesión hiperproliferativa, una lesión caracterizada por un aumento anormal en el número de células. Este aumento en el número de células puede asociarse o no con un aumento de tamaño de la lesión. Los ejemplos de lesiones hiperproliferativas que se contemplan para el tratamiento incluyen tumores benignos y lesiones premalignas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, lesiones hiperplásicas de células escamosas, lesiones epiteliales premalignas, lesiones psoriásicas, verrugas cutáneas, verrugas periunguales, verrugas anogenitales, epidermodisplasia verruciforme, lesiones neoplásicas intraepiteliales, hiperplasia epitelial focal, papiloma conjuntival, carcinoma conjuntival o lesión de carcinoma escamoso. La lesión puede implicar células de cualquier tipo celular. Los ejemplos incluyen queratinocitos, células epiteliales, células cutáneas y células mucosales.

Los estados preneoplásicos o hiperplásicos que pueden tratarse o prevenirse usando el tratamiento combinado de la presente invención incluyen, pero sin limitación estados preneoplásicos o hiperplásicos, tales como pólipos de colon, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesiones de mama y similares.

Los cánceres que pueden tratarse usando la composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, melanoma primario o metastásico, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células adenoescamosas, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de colon, mieloma múltiple, neuroblastoma, NPC, cáncer de vejiga, cáncer de cuello de útero y similares. Además, el cáncer que puede tratarse administrando un superantígeno dirigido y agente quimioterapéutico puede definirse basándose en la localización y/o sistema corporal, por ejemplo, pero sin limitación a huesos (por ejemplo, familia de tumores de Ewing, osteosarcoma); cerebro (por ejemplo, tumor cerebral de adultos, (por ejemplo, tumor cerebral de adultos, glioma del tallo cerebral (infancia), astrocitoma cerebelar (infancia), astrocitoma cerebral/glioma maligno (infancia), ependimoma (infancia), meduloblastoma (infancia), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma (infancia), glioma de la ruta visual e hipotalámico (infancia) y tumor cerebral de la infancia (otros)); mama (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de mama y embarazo, cáncer de mama en varones); digestivo/gastrointestinal (por ejemplo, cáncer anal, cáncer del conducto biliar (extrahepático), tumor

carcinoide (gastrointestinal), cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado (primario de adulto), cáncer de hígado (infancia), cáncer de páncreas, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico)); endocrino (por ejemplo, carcinoma adenocortical, tumor carcinoide (gastrointestinal), carcinoma de células de islote (endocrino de páncreas), cáncer paratiroideo, feocromocitoma, tumor pituitario, 5 cáncer de tiroides); ojo (por ejemplo, melanoma (intraocular), retinoblastoma); genitourinario (por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de la pelvis renal y de uréter (células transicionales), cáncer de testículo, cáncer de uretra, tumor de Wilms y otros tumores renales de la infancia); células germinales (por ejemplo, tumor de células germinales extracraneal (infancia), tumor de células germinales extragonadal, tumor de células germinales ováricas, cáncer testicular); ginecológico (por ejemplo, cáncer 10 de cuello de útero, cáncer de endometrio, tumor trofoblástico gestacional, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico de bajo potencial maligno, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar); cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer hipofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de cuello escamoso metastásico primario oculto, cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer del sinus paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de las glándulas salivales); pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico); linfoma (por ejemplo, linfoma relacionado con SIDA, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de Hodgkin (adulto), linfoma de Hodgkin (infancia), linfoma de Hodgkin durante el embarazo, micosis fungoide, linfoma no de Hodgkin (adulto), linfoma no de Hodgkin (infancia), linfoma no de Hodgkin durante el embarazo, linfoma primario del sistema nervioso central, síndrome de Sezary, linfoma de células T (cutáneo), macroglobulinemia de Waldenström); musculoesquelético (por ejemplo, familia de tumores de Ewing, 20 osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, rhabdomyosarcoma (infancia), sarcoma de tejidos blandos (adulto), sarcoma de tejidos blandos (infancia), sarcoma uterino); neurológico (por ejemplo, tumor cerebral de adultos, tumor cerebral de la infancia (por ejemplo, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma de la ruta visual e hipotalámico, otros tumores cerebrales), neuroblastoma, tumor pituitario, linfoma primario del sistema nervioso central); embarazo y cáncer (por ejemplo, cáncer de mama y embarazo, linfoma de Hodgkin durante el embarazo, linfoma no de Hodgkin durante el embarazo); respiratorio/torácico (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma maligno, timoma y carcinoma tímico); y piel (por ejemplo, linfoma cutáneo de linfocitos T, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoma de células de merkel, cáncer de piel).

Los cánceres que pueden tratarse usando la combinación de la presente invención (superantígeno dirigido y un agente quimioterapéutico) también puede definirse basándose en el agente quimioterapéutico que se conoce para tratar el cáncer, por ejemplo, pero sin limitación, agentes alquilantes (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfomas y determinados carcinomas de pulmón, de mama, de próstata y cáncer de ovario); nitrosoureas (por ejemplo, 35 tumores cerebrales, linfomas, mieloma múltiple y melanoma maligno); antimetabolitos (por ejemplo, coriocarcinoma y algunos tumores del tracto gastrointestinal, de mama, de pulmón, de riñón y de ovario); antibióticos antitumorales (por ejemplo, linfomas, de mama, de ovario, endometrio, próstata y gastrointestinal); inhibidores mitóticos (por ejemplo, determinados cánceres gastrointestinales, linfomas de Hodgkin y no de Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms y cánceres de pulmón, de mama, de próstata y de testículo); compuestos basados en platino (por ejemplo, 40 cáncer de pulmón, de mama, de ovario, de vejiga, de cabeza y cuello y determinados gastrointestinales) y dirigidos/otras terapias (renal, de próstata, gastrointestinal, linfomas, linfoma no de Hodgkin, de mama, de pulmón, melanoma).

Además, el cáncer puede incluir un tumor compuesto de células tumorales. Por ejemplo, las células tumorales pueden incluir, pero sin limitación, células de melanoma, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de estómago, una célula de cáncer testicular, una célula de cáncer renal, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer linfático, una célula de 45 cáncer de piel, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer óseo o una célula de cáncer de tejidos blandos.

Otras enfermedades hiperproliferativas que pueden tratarse usando el tratamiento combinado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, artrosis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, lesiones preneoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma *in situ*, leucoplasia vellosa oral o psoriasis. 55

En una realización preferida de la presente invención, la combinación del superantígeno dirigido a tumores y al menos un agente anticáncer, por ejemplo, un agente citostático o un agente radioterapéutico, se administran en una cantidad eficaz para disminuir, reducirá, inhibir o abrogar el crecimiento de un tumor sólido. Los ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen sarcomas y carcinomas, tales como, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, 60 cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas

5 papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

10 Además, los cánceres que es más probable que se traten en la presente invención son aquellos que metastatizan. Los expertos en la materia entenderán que la metástasis es la dispersión de células a partir de un tumor primario a un sitio no contiguo, normalmente a través del torrente sanguíneo o de los vasos linfáticos, que da como resultado el establecimiento de un crecimiento tumoral secundario. Los ejemplos de cánceres contemplados para el tratamiento incluyen, pero sin limitación, melanoma, de vejiga, de pulmón no microcítico, de pulmón microcítico, pulmón, hepatocarcinoma, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, neuroblastoma, de cabeza, de cuello, de mama, pancreático, encías, lengua, de próstata, renal, de huesos, testicular, de ovario, mesotelioma, de cuello de útero, linfoma gastrointestinal, de cerebro o cáncer de colon y cualesquiera otros tumores o neoplasias que pueden tratarse administrando un superantígeno dirigido a tumores en combinación y al menos un agente citostático.

15 Además, la presente invención puede usarse también para tratar tumores en vainas ("tecas") que envuelven órganos. Los ejemplos incluyen (1) efusión pleural debido a fluido en la vaina pleural que rodea al pulmón, (2) ascitis que se origina en fluido que se acumula en la membrana peritoneal y (3) edema cerebral debido a carcinomatosis metastásica de las meninges. Dichas efusiones y acumulaciones de fluido se desarrollan generalmente en un estadio avanzado de la enfermedad. La efusión pleural maligna ("MPE") es el prototipo de esta afección.

B. Cantidades terapéuticas

25 Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" o "dosis" o "dosis terapéutica" se definen como una cantidad del agente que disminuirá, reducirá, inhibirá o de otro modo abrogará el crecimiento o proliferación de una célula cancerosa, inducirá la apoptosis, inhibirá la angiogénesis de una célula tumoral, inhibir la metástasis o inducirá citotoxicidad en células. La cantidad eficaz de principios activos usados para poner en práctica la presente invención para el tratamiento terapéutico de neoplasias (por ejemplo, cáncer) varía dependiendo del modo de administración, de la edad, del peso corporal y de la salud general del sujeto. La determinación de la cantidad adecuada y de la pauta de dosificación por parte de un médico o veterinario tratante se encuentra dentro de las capacidades de la técnica. Dichas cantidades pueden citarse como cantidades "eficaces". Estas expresiones incluyen situaciones sinérgicas, tales como aquellas presentadas y descritas en la presente invención en las que un solo agente, tal como un superantígeno o un agente anticancerígeno, tal como un agente citostático, pueden actuar débilmente o en absoluto, pero que cuando se combinan entre sí, por ejemplo, pero sin limitación, mediante dosificación secuencial, dos o más agentes actúan para producir un resultado sinérgico.

35 En otros ejemplos ni limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable de los anteriores. En ejemplos ni limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc. basándose en los números descritos anteriormente.

40 En determinadas realizaciones, por ejemplo, pero sin limitación, administración de TTS, la cantidad eficaz o dosis del superantígeno que se administra es una cantidad en el intervalo de 0,01 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto, preferentemente de 0,1-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto y lo más preferentemente de 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto. En determinadas realizaciones donde se usan los superantígenos de tipo silvestre y/o superantígenos no conjugados/fusionados y/o no modificados, la cantidad eficaz o dosis del superantígeno que se va a administrar es una cantidad en el intervalo de 0,001 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del sujeto.

50 Se prevé que la cantidad eficaz o dosis del agente anticáncer (por ejemplo, un agente citostático y/o agente radioterapéutico) que se administra en combinación con el superantígeno es una dosis que da como resultado un efecto sinérgico antitumoral y no interfiere o inhibe el potenciamiento del sistema inmune o en la activación de células T. Por lo tanto, un experto en la materia será consciente de que la dosis y/o la sincronía de la dosis puede alterarse dependiendo del régimen terapéutico. Por ejemplo, la dosis del agente anticáncer (por ejemplo, agente citostático y/o agente radioterapéutico) puede considerarse una dosis elevada o "dosis antiproliferativa" y se administra antes de y/o después de la administración del superantígeno. Este tipo de régimen tiene en consideración

la semivida del agente anticáncer. Si el agente anticáncer se administra simultáneamente con el superantígeno, entonces puede administrarse el agente anticáncer en una dosis baja, de tal forma que no interfiere con el mecanismo de acción del superantígeno.

5 C. Regímenes de tratamiento

Los regímenes de tratamiento también pueden variar y a menudo dependen del tipo de tumor, de la localización del tumor, de la progresión de la enfermedad y de la salud y edad del paciente. Obviamente, determinados tipos de tumor requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que a la vez, determinados pacientes no pueden tolerar protocolos más tóxicos. El clínico a menudo puede ser más adecuada para tomar dichas decisiones basándose en su habilidad en la materia y de la eficacia y toxicidad conocida (en caso de haberla) de las formulaciones terapéuticas.

15 Preferentemente, los pacientes que se van a tratar tendrán una función de la médula ósea adecuada (definida como un recuento de granulocitos periféricos de $> 2.000/\text{mm}^3$ y un recuento de plaquetas de $100.000/\text{mm}^3$), una función hepática adecuada (bilirrubina $< 1,5 \text{ mg/dl}$) y una función renal adecuada (creatinina $< 1,5 \text{ mg/dl}$).

20 Para eliminar células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, disminuir el tamaño del tumor o tejido y de otro modo revertir o reducir el fenotipo maligno de las células tumorales, usando los métodos y composiciones de la presente invención, se pondrá generalmente en contacto una célula tumoral o neoplasia o célula cancerosa con una combinación de un superantígeno y al menos un agente anticáncer, tal como un agente citostático y/o un agente radioterapéutico. Las rutas de administración variarán, naturalmente, con la localización y naturaleza de la lesión, e incluyen, por ejemplo, administración y formulación intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intratecal, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, perfusión, lavado, inyección directa y oral.

25 En un aspecto de la presente invención, la célula tumoral o neoplasia o célula cancerosa tiene que portar algún marcador que sea susceptible de usarse como diana, por ejemplo, que no esté presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y puede ser adecuado cualquiera de estos para usarse como diana en el contexto de la presente invención. La selección de un marcador adecuado se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia. Los agentes de direccionamiento específicos de la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos. Los anticuerpos que se contemplan en la presente invención incluyen, pero sin limitación, el fragmento Fab. Los ejemplos del fragmento Fab incluyen C215Fab o 5T4Fab. Además de Fab, otros marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumores urinarios, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

40 En determinadas realizaciones, el régimen de tratamiento de la presente invención puede implicar poner en contacto la neoplasia o las células tumorales con el superantígeno y el agente citostático a la vez. Esto puede lograrse poniendo en contacto la célula con una sola composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, donde una composición incluye al superantígeno y la otra incluye al agente anticáncer, tal como un agente citostático.

45 Como alternativa, el superantígeno de la presente invención puede preceder o seguir al agente anticáncer en intervalos que oscilan desde minutos o días hasta semanas. En realizaciones donde el otro agente anticáncer y el superantígeno se aplican por separado a la célula, se podría asegurar que no pase un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de tal forma que el superantígeno y el agente anticáncer seguirá siendo capaz de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se pueda poner en contacto a la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-72 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, en los casos donde pasan varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

55 Pueden emplearse diversas combinaciones, el superantígeno es "A" y el agente anticáncer es "B":

A/B/A B/A/B BB/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B;
B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A;
BB/A/A B/AB/A B/A/AB A/A/AB B/A/A/A A/B/A/A; y A/A/B/A.

60 Las expresiones "puesta en contacto" y "expuesta", tal como se usa en el presente documento, significan cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual se administran un agente citostático o un agente radioterapéutico a una célula diana o se ponen en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la eliminación o estasis de la célula, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para eliminar a la célula o para evitar que se divida. Esta administración puede distribuirse secuencialmente tal como se describe en el presente documento.

65

La distribución temporal del régimen terapéutico puede relacionarse con la semivida del agente anticáncer, tal como un agente citostático. La semivida de un agente citostático puede determinarse usando la ecuación a continuación

$$\text{Semivida} = (0.693 \times V_d) / \text{CL}$$

5 CL se define como la eliminación del agente o la eliminación de fármaco, que es el volumen de plasma libre de fármaco por unidad de tiempo. V_d se define como el volumen de distribución, que es la cantidad o concentración del agente en el plasma o en la sangre en relación a la cantidad total en el cuerpo. La semivida puede usarse para determinar el tiempo para la administración secuencial de un agente citostático seguido de la terapia con superantígeno. Por lo tanto, en la práctica de la presente invención, un experto en la materia sabrá que la terapia con superantígeno puede administrarse secuencialmente en combinación con un citostático, por ejemplo, tratando en primer lugar con el agente citostático. Una vez que la concentración eficaz del agente haya disminuido en el paciente por debajo de un nivel inhibitor funcional basado en la semivida del agente, puede administrarse el superantígeno al paciente.

10 Además se prevé que la presente invención pueda usarse en combinación con una intervención quirúrgica. En caso de intervención quirúrgica, la presente invención puede usarse preoperativamente, por ejemplo, para hacer que un tumor inoperable pueda someterse a resección. Como alternativa, la presente invención puede usarse en paralelo a la cirugía, y/o posteriormente, para tratar la enfermedad residual o metastásica. Por ejemplo, puede inyectarse o perfusionarse en el lecho del tumor reseccionado una formulación que comprende el superantígeno dirigido a tumores y/o el agente anticáncer (por ejemplo, un agente citostático o un agente radioterapéutico). La perfusión puede continuar después de la resección, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía. También se prevé el tratamiento post-quirúrgico periódico.

15 También puede aplicarse administración continua en los casos en los que sea adecuado, por ejemplo, en los casos donde se extirpe el tumor y se trate el lecho tumoral para eliminar la enfermedad residual, microscópica. Se prefiere la administración mediante jeringa o cateterización. Dicha perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más después de iniciar el tratamiento. En general, la dosis de la composición terapéutica a través de perfusión continua será equivalente a la administrada por una sola o por múltiples inyecciones, ajustada a lo largo de un periodo de tiempo durante el cual tiene lugar la perfusión. Se contempla además que pueda usarse la perfusión en extremidades para administrar composiciones terapéuticas de la presente invención, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

20 En determinadas realizaciones, el tumor que se está tratando puede no ser, al menos inicialmente, reseccionable. Los tratamientos con superantígeno en combinación con al menos un agente anticáncer puede aumentar la posibilidad de resección del tumor debido a la reducción en los márgenes o mediante la eliminación de determinadas porciones particularmente invasivas. Después de los tratamientos, puede ser posible la resección. Los tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad residual en el sitio del tumor.

25 Un ciclo de tratamiento típico, para un tumor primario o para un lecho tumoral después de la escisión puede implicar múltiples dosis. El tratamiento de tumores primarios típico puede implicar una aplicación de 6 dosis durante un periodo de dos semanas. El régimen de dos semanas puede repetirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces. Durante el transcurso del tratamiento, puede volver a evaluarse la necesidad de completar las dosificaciones planeadas.

30 Los tratamientos pueden incluir varias "dosis unitarias". La dosis unitaria se define como aquella que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad que va a administrarse y la ruta y la formulación particulares se encuentran dentro de las capacidades de los expertos en la técnica clínica. Una dosis unitaria no se administra necesariamente como una sola inyección, pero puede comprender infusión continua durante un periodo de tiempo predeterminado.

35 Tal como se usa en la presente invención, un régimen de tratamiento combinado consiste en administrar un superantígeno y al menos un agente anticáncer, por ejemplo, un fármaco citostático o un agente radioterapéutico. Además, puede ser deseable combinar el régimen de tratamiento combinado con otros agentes eficaces para el tratamiento de enfermedades neoplásicas o cánceres, tales como otros agentes anticáncer, tales como otros, incluyendo agentes biológicas (bioterapia) y/o terapia hormonal, etc.

40 Dentro del alcance de la presente invención se incluye la administración sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) de los superantígenos, por ejemplo, TTS y/o agentes anticáncer, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, fármacos citostáticos. También se incluye la administración local (por ejemplo, mediante administración intratecal) de los superantígenos, por ejemplo, TTS y/o agentes anticáncer, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, fármacos citostáticos. También se incluye la combinación de administración local y sistémica de superantígenos, por ejemplo, TTS y/o agentes anticáncer, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, fármacos citostáticos (por ejemplo, administración

sistémica de superantígenos (por ejemplo, TTS) combinado con la administración local de un agente anticancerígeno (por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico) y viceversa).

VI. Terapia combinada

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dosificación secuencial" y la terminología relacionada se refiere a la administración de al menos un superantígeno, con al menos un agente anticancerígeno, por ejemplo, pero sin limitación a un agente quimioterapéutico, tal como, pero sin limitación, un fármaco quimioterapéutico, tal como, pero sin limitación, un fármaco quimioterapéutico citostático. Esta definición incluye dosis escalonadas de
10 estos agentes y variaciones en las cantidades de dosificación. Esto incluye que un agente se administre antes, solapante con (parcial o totalmente), después o totalmente separado de otro agente. Este término tiene en consideración generalmente la mejor pauta de administración para lograr una combinación sinérgica de al menos un superantígeno y al menos un agente anticancerígeno de al menos un superantígeno mientras se limita o elimina la generación de una respuesta de anticuerpos a un superantígeno. La determinación del plan de administración
15 secuencial de la dosificación se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia, a partir de los conocimientos básicos y las enseñanzas de la técnica y las de esta solicitud. Por ejemplo, un experto en la materia, por ejemplo, basándose en las semividas conocidas, es capaz de determinar cuándo un agente anticáncer o un agente citostático se encuentra por debajo de un nivel inhibitor funcional. Un nivel inhibitor funcional del agente anticancerígeno se determina basándose en la semivida del agente. Por lo tanto, un experto en la materia sabrá que para que sea eficaz la terapia de superantígeno, tiene que administrarse después de que el agente citostático se encuentre por debajo de un nivel inhibitor funcional.

Típicamente, un experto en la materia considera que la quimioterapia y la radioterapia tiene propiedades antiproliferativas y por lo tanto se esperará generalmente que interfiera con agentes estimulantes inmunitarios, tales como vacunas tumorales, modificadores de respuestas biológicas y superantígenos. La presente invención utiliza la combinación de estas terapias antiproliferativas conocidas en combinación con un agente estimulador o proliferativo inmunitario.
25

Está bien documentado que determinados fármacos también pueden tener propiedades estimuladoras inmunitarias cuando se administran a dosis bajas (subtóxicas) (revisado por Zagazdzon y Golab, 2001; Mitchell, 2003). Sin embargo, los inventores de la presente invención han proporcionado un tratamiento integrado de agente citostático a dosis alta/inmunoterapia. Los requisitos previos de un tratamiento integrado de un agente citostático a dosis alta/inmunoterapia se refieren a los distintos espacios de tiempo para la actividad de los agentes. El agente citostático debe actuar durante un espacio de tiempo determinado y lo mismo se necesita para la inmunoterapia.
30

La mayoría de fármacos citostáticos actúan durante un corto de elevada exposición al fármaco y la eliminación del fármaco sucede generalmente en las 24 horas después de la administración. Típicamente, las semividas séricas de los fármacos usados de manera común, gemcitabina y docetaxel son de 42-94 minutos y de 11,1 horas, respectivamente. Otras semividas y determinaciones de la semivida se han discutido anteriormente.
35

Sin embargo, la inmunoterapia depende generalmente de un largo periodo de activación inmunitaria con etapas no predichas de proliferación de linfocitos. Por lo tanto, el inicio de una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo, durante la vacunación, depende de una serie de procesos limitantes del tiempo, tales como el direccionamiento del antígeno a los órganos linfoides, la captación y presentación en células presentadoras de antígenos, etc. Asimismo, la duración de la respuesta puede variar considerablemente, dependiendo de la persistencia del antígeno en la circulación.
40

La inmunoterapia de superantígenos da como resultado una activación policlonal rápida (en horas) y potente de linfocitos T. Un ciclo de tratamiento con superantígeno incluye generalmente de 4 a 5 inyecciones diarias del fármaco por vía intravenosa. Dichos ciclos de tratamiento pueden administrarse en, por ejemplo, intervalos de 4 a 6 semanas. Ningún estudio clínico ha demostrado una activación y proliferación de linfocitos T prácticamente instantánea y una inflamación rápida por linfocitos T citotóxicos (CTL) en tejido tumoral como respuesta a la primera inyección de fármaco de superantígeno (Dohlsten et al., 1995). La inflamación con infiltración de CTL en el tumor es uno de los efectores principales de la terapéutica antitumoral de los superantígenos. Después de un corto periodo de activación masiva y de diferenciación de CTL, la respuesta de células T disminuye rápidamente (en 4-5 días) de nuevo a los niveles iniciales. Por lo tanto, el periodo de proliferación linfocitaria, durante el cual los fármacos citostáticos pueden interferir con el tratamiento de superantígeno es corto y está bien definido. Dicho margen de tiempo para la actividad solo es plausible con la terapia de superantígeno/agente anticancerígeno de la presente invención, permitiendo de este modo el nuevo tratamiento integrado de agente citostático a dosis alta/inmunoterapia.
45

Los fármacos citostáticos y los superantígenos de la inmunoterapia representan tipos de terapias antitumorales con distintos mecanismos de acción que puede no ser posible integrar en tiempo y por lo tanto no deben ser aditivos. Aunque sorprendentemente, al combinar fármacos citostáticos a dosis altas con superantígenos en pautas de tratamiento integradas se obtienen efectos antitumorales sinérgicos. Por lo tanto, en una pauta de terapia combinada, puede integrarse el tratamiento con superantígeno con una o más quimioterapias convencionales (a dosis convencionales bien establecidas) de tal forma que el superantígeno se administre poco después (por ejemplo,
50

a los 0 - 3 días o, por ejemplo, a los 0 - 6 días) antes o después de la administración del fármaco citostático.

La administración de la inmunoterapia de la presente invención a un paciente se efectuará según protocolos generales para la administración de agentes quimioterapéuticos. Se espera que los ciclos de tratamiento puedan repetirse según sea necesario. También se contempla que puedan aplicarse diversas terapias convencionales, así como intervención quirúrgica, en combinación con la terapia para células neoplásicas descrita.

Además de la combinación del superantígeno y del agente citostático que tiene un efecto antitumoral sinérgico, el agente citostático modula o inhibe la producción de anticuerpos para los superantígenos.

Las proteínas de fusión de superantígeno son inmunogénicas y se producen anticuerpos. Estos se unen a la proteína del superantígeno y son un obstáculo para la actividad del superantígeno. Las respuestas primarias de anticuerpos no son productivas hasta aproximadamente una semana después de la estimulación. Las respuestas de anticuerpos secundarias tienen normalmente su etapa proliferativa de células B máxima aproximadamente a los 5-7 días después de la estimulación.

Los anticuerpos que interfieren con las proteínas de superantígenos comprometen los efectos terapéuticos antitumorales. Por lo tanto, el presente tratamiento combinado que da como resultado ningún o menos anticuerpos anti-superantígeno en un paciente hace que sea posible el tratamiento con superantígeno multi-ciclo.

VII. Kits

La presente invención puede usarse en kits que comprenden, por ejemplo, un primer recipiente que tiene el superantígeno dirigido a tumores y un segundo envase que tiene al menos el agente citostático. Los kits son para su uso de acuerdo con las reivindicaciones.

Dicho kit también puede contener agentes adicionales, tales como, por ejemplo, un componente lipídico.

Los kits pueden comprender en alícuotas adecuadas, un superantígeno y/o un agente citostático y opcionalmente, composiciones de lípidos y/o agentes adicionales de la presente invención. Los componentes de los kits pueden envasarse bien en medio acuoso o en forma liofilizada. Los medios de envasado de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otros medios de envase, en los que puede introducirse un componente y preferentemente, separarse en alícuotas de manera adecuada. En los casos donde hay más de un componente en el kit, el kit contendrá generalmente además un segundo, tercer u otro envase adicional en el que puedan ponerse por separado los componentes adicionales. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en uno o más viales. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener al superantígeno y/o al agente citostático, lípido, agente adicional y cualquier otro envase de reactivo en confinamiento cerrado para su venta comercial. Dichos envases también incluyen envases de plástico inyectado o moldeado por soplado en los que se retienen los viales deseados.

Los kits terapéuticos de la presente invención contendrán generalmente, en medios de envase adecuados, una formulación farmacéuticamente aceptable de un superantígeno y un agente anticancerígeno en una formulación farmacéuticamente aceptable. El kit puede tener un solo medio de envase, y/o puede tener distintos medios de envase para cada compuesto.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, prefiriéndose particularmente una solución acuosa estéril. El superantígeno y el agente anticancerígeno también pueden formularse en una composición inyectable mediante jeringa. En dicho caso, los medios de envase pueden ser en sí una jeringuilla, pipeta, y/o otro aparato similar, a partir del cual puede aplicarse la formulación a una parte específica del cuerpo, inyectarse en un animal, y/o aplicarse y/o mezclarse con los otros componentes del kit.

Los componentes del kit pueden proporcionarse en forma de polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan en forma de polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otros medios de envase.

El envase incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/o otros para retener una muestra, en la que el superantígeno y/o el agente anticancerígeno se colocan, por ejemplo, se ubican adecuadamente. Los kits también pueden comprender otro envase para contener un tampón estéril farmacéuticamente aceptable y/o otro diluyente.

Los kits de la invención también pueden comprender, y/o envasarse con, un instrumento para asistir en la inyección/administración y/o ubicación de la composición terapéutica última, *por ejemplo*, un superantígeno y un agente citostático, en el cuerpo de un animal. Dicho instrumento puede ser una jeringuilla, pipeta, fórceps, y/o cualquier vehículo de administración médicamente aprobado.

VIII. Composiciones farmacéuticas

El superantígeno y los agentes anticáncer combinados de la presente invención pueden emplearse solos o en conjunción con otros compuestos, tales como vehículos u otros compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más superantígenos y uno o más agente anticáncer, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, tal como un agente citostático y también puede contener agentes adicionales, disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a sustancias, por ejemplo, composiciones, que no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un superantígeno y un agente anticancerígeno serán conocidas para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración animal (por ejemplo, a seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como requiere la Agencia de Estándares biológicos de la FDA.

Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, por ejemplo, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

Los superantígenos y fármacos citostáticos pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se van a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol y de si necesita ser estéril para dichas vías de administración tales como inyección. La presente invención puede administrarse posiblemente por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosal, oral, tópica, local, inhalatoria (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada en la que se baña directamente a las células diana, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores que se conozca por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990).

Los superantígenos y el fármaco citostático pueden formularse en una composición en una forma de base libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteinácea o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico o ácido mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivarse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán preferentemente de un modo compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como formuladas para administración parenteral, tales como soluciones inyectables o aerosoles para administración a los pulmones o formularse para administraciones alimentarias, tales como cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Además, de acuerdo con la presente invención, la composición de la presente invención adecuada para su administración se proporciona en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable e incluye vehículos líquidos, semisólidos, por ejemplo, pastas o vehículos sólidos. Excepto hasta el punto en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en esta, es adecuado su uso en la composición administrable para su uso en la práctica de los métodos de la presente invención. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender diversos antioxidantes para retrasar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de conservantes, tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitación parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, la composición se combina con, por ejemplo, un vehículo de cualquier modo conveniente y práctico, por ejemplo, mediante solución, suspensión, emulsionado, premezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son rutinarios para los expertos en la materia.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina y/o mezcla intensamente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede llevarse a cabo de cualquier modo convencional, tal como trituración. También pueden añadirse agentes estabilizantes en el proceso de mezclado para proteger a la composición de la pérdida de actividad terapéutica, por ejemplo, desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizantes para su uso en la composición incluyen tampones, aminoácidos, tales como glicina y lisina, carbohidratos, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc..

En realizaciones adicionales, la presente invención puede referirse al uso de composiciones farmacéuticas de vehículos lipídicos que pueden incluir superantígenos y/o agentes anticancerígenos, así como uno o más lípidos, en un disolvente acuoso. Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se definirá como inclusivo de cualquiera de un gran abanico de sustancias que son característicamente insolubles en agua y extraíbles con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos se conocen bien para los expertos en la materia y tal como se usa el término "lípidos" en el presente documento, no está limitado a cualquier estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (por ejemplo, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido es normalmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfatadas, lípidos con ácidos grasos enlazados con éter y éster y lípidos polimerizables y combinaciones de los mismos. Por supuesto, los compuestos distintos de aquellos específicamente descritos en el presente documento que se entienden como lípidos por un experto en la materia también están abarcados por las composiciones y métodos de la presente invención.

Los expertos en la materia están familiarizados con el abanico de técnicas que pueden emplearse para dispersar una composición en un vehículo lipídico. Por ejemplo, los superantígenos y/o los agentes anticancerígenos pueden dispersarse en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, contenerse en una suspensión en un lípido, contenerse o estar en complejo con una micela o liposoma o asociarse de otro modo con un lípido o estructura lipídica mediante cualquier medio conocido para los expertos habituales en la materia. La dispersión puede resultar o no en la formación de liposomas.

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente animal puede determinarse de manera rutinaria por un experto en la técnica mediante factores físicos y fisiológicos, tales como peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se esté tratando, intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, idiopatía del paciente y de la ruta de administración. Dependiendo de la dosificación y de la ruta de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de ingrediente activo (o ingredientes activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual. Dichas determinaciones se conocen y usan por los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente un 0,1 % de un principio activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 75 % del peso de la unidad o entre aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 60 %, por ejemplo y cualquier intervalo derivable de los anteriores. Naturalmente, la cantidad de compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal forma que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la materia de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas y como tales, pueden ser deseables una diversidad de dosificaciones y pautas de tratamiento. Dichas determinaciones se conocen y usan por los expertos en la materia.

A. Composiciones y formulaciones alimentarias

En algunas realizaciones de la presente invención, los superantígenos y/o agentes anticancerígenos, tales como un agente quimioterapéutico, tal como un fármaco citostático, pueden formularse para su administración a través de una vía alimentaria. Las vías alimentarias incluyen todas las posibles rutas de administración en las que la composición esté en contacto directo con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, bucal, rectal o sublingual. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina duras o blandas o pueden comprimirse para formar comprimidos o pueden incorporarse directamente con la comida de la dieta.

En determinadas realizaciones, los principios activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares (Patentes de Estados Unidos N° 5.641.515; 5.580.579 y 5.792.451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares pueden también contener lo siguiente: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato

dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, aroma de naranja, etc. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros varios materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambas. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos, tales como un vehículo líquido. Las cápsulas de gelatina, los comprimidos o píldoras pueden recubrirse entéricamente. Los recubrimientos entéricos evitan la desnaturalización de la composición en el estómago o en el intestino superior, donde el pH es ácido. Véase, por ejemplo, La Patente de Estados Unidos N° 5.629.001. Tras alcanzar al intestino delgado, el pH básico en este disuelve el recubrimiento y permite que la composición se libere y absorba por células especializadas, por ejemplo, enterocitos epiteliales y células M de la placa de Peyer. Un jarabe o elixir puede contener el principio activo sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromas, tales como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los principios activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Para administración oral, las composiciones de la presente invención pueden, como alternativa, incorporarse con uno o más excipientes en forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, spray oral o formulación administrada por vía oral sublingual. Por ejemplo, puede prepararse un enjuague bucal incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, tal como solución de borato de sodio (solución de Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse en una solución oral, tal como una que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de sodio o dispersarse en un dentífrico o añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes. Como alternativa, las composiciones pueden disponerse en forma de comprimido o solución que pueda ponerse debajo de la lengua o de otro modo disolverse en la boca.

Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración alimentaria incluyen supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólidas de diversos pesos y formas, normalmente medicadas, para su inserción en el recto. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, se funden o se disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para supositorios, los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el principio activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % y preferentemente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %.

B. Composiciones y formulaciones parenterales

En realizaciones adicionales, los superantígenos y/o agentes anticáncer (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, tal como un fármaco citostático) puede administrarse a través de una ruta parenteral. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye rutas que esquivan el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse, por ejemplo, pero sin limitación a por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, intratumoral, subcutánea o intraperitoneal Patentes de Estados Unidos N° 6.613.308, 5.466.468, 5.543.158; 5.641.515; 5.399.363 y la Publicación Internacional WO03094846.

Las soluciones de los principios activos en forma de bases libres o sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse en agua mezclados de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectables incluyen soluciones acuosas o dispersiones estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de Estados Unidos 5.466.468). En todos los casos, la forma tiene que ser estéril y tiene que ser fluido hasta el punto de que sea fácilmente inyectable. Tiene que ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tienen que conservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de

agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar tamponada de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará primeramente isotónico con suficiente suero salino o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. A este respecto, el medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, puede disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Será necesario efectuar alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del paciente que se esté tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como requiere la Agencia de Estándares biológicos de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes indicados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas secado al vacío y criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier otro ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Una composición en polvo se combina con un vehículo líquido, tal como, por ejemplo, agua o solución salina, con o sin un agente estabilizante.

C. Composiciones y formulaciones farmacéuticas misceláneas

En otras realizaciones de la invención, los superantígenos y/o agentes anticáncer (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, tal como un fármaco citostático) pueden formularse para su administración a través de diversas rutas misceláneas, por ejemplo, administración tópica (por ejemplo, transdérmica), administración mucosal (intranasal, vaginal, etc.) y/o inhalación.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir al principio activo formulado para una aplicación medicada, tal como una pomada, pasta, crema o polvo. Las pomadas incluyen todas las composiciones de base oleaginosa, de adsorción, emulsiones y solubles en agua para aplicación tópica, mientras que las cremas y las lociones son aquellas composiciones que incluyen únicamente una base de emulsión. Las medicaciones administradas por vía tópica pueden contener un potenciador de la penetración para facilitar la absorción de los principios activos a través de la piel. Los potenciadores de la penetración adecuados incluyen glicerina, alcoholes, sulfóxidos de alquil metilo, pirrolidonas y luarocapram. Las bases posibles para composiciones para aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema fría y vaselina, así como cualquier otra base de pomada de absorción, emulsión o soluble en agua. Las preparaciones tópicas también pueden contener emulsionantes, agentes gelificantes y conservantes antimicrobianos, según sea necesario, para conservar al principio activo y proporcionar una mezcla homogénea. La administración transdérmica de la presente invención también puede comprender el uso de un "parche". Por ejemplo, el parche puede suministrar una o más sustancias activas a una velocidad predeterminada y de manera continua durante un periodo de tiempo determinado.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante gotas oculares, pulverizadores intranasales, inhalación, y/o otros vehículos de administración de aerosol. Los métodos para administrar composiciones directamente a los pulmones a través de pulverizadores de aerosol nasales se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.756.353 y 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos usando resinas microparticuladas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de Estados Unidos N° 5.725.871) también se conocen bien en la técnica farmacéutica. Del mismo modo, la administración de fármacos transmucosal en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.780.045.

El término aerosol se refiere a un sistema coloidal o sólido finamente dividido de partículas líquidas dispersas en un propulsor de gas licuado o presurizado. El aerosol típico de la presente invención para inhalación consistirá en una suspensión de los principios activos en propulsor líquido o una mezcla de propulsor líquido y un disolvente adecuado. Los propulsores adecuados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Los envases adecuados variarán de acuerdo con los requerimientos de presión del propulsor. La administración del aerosol variará de acuerdo con la edad del sujeto, el peso y la gravedad y respuesta de los síntomas.

IX. Ejemplos

Ejemplo 1

5 Superantígenos dirigidos a tumores

La proteína de fusión C215Fab-SEA (SEC ID N° 5; una proteína de referencia) (en ocasiones citada en el presente documento como "ABR-214720"), que consiste en una enterotoxina A estafilocócica fusionada genéticamente al resto Fab de un anticuerpo (C215) que reconoce a un epítipo del antígeno asociado a tumores humanos EpCAM/GA733-2, se expresó en *E. coli* (Dohlsten et al., 1994) y se purificó tal como se describe por Forsberg et al., 1997. Otras proteínas de fusión que pueden usarse incluyen 5T4Fab-SEA/E-120 (SEC ID N° 7; de acuerdo con la invención) (en ocasiones citada en el presente documento como "ABR-217620") y 5T4Fab-SEA_{D227A} (SEC ID N° 6; una proteína de referencia), que se producen tal como se describe por Forsberg et al., 1997.

15 Ejemplo 2

Terapia combinada de agentes TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina, docetaxel, cisplatino): antitumoral *in vitro*

20 Se evaluó *in vitro* el efecto del tratamiento con superantígeno (TTS) (5T4FabSEA/E-120) en combinación con citostáticos sobre el crecimiento tumoral.

Líneas celulares y medios

25 Se cultivó la línea celular de cáncer humano Colo 205 en RPMI 1640 + FBS al 10 % (medio R10). Las células se prepararon desprendiéndolas con solución de disociación celular, se lavaron con BPS y se resuspendieron en medio R10. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes de sangre. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener líneas de células T efectoras.

30

Inhibición del crecimiento tumoral

Se midió la inhibición del crecimiento tumoral mediante TTS en combinación con gemcitabina (GEMZAR®), docetaxel (TAXOTERE®) y cisplatino mediante un ensayo de proliferación celular tumoral. El ensayo de proliferación mide la síntesis de ADN de las células tumorales mediante la incorporación de ³H-timidina. Se evitó que las células T efectoras proliferasen mediante pretratamiento con mitomicina C. Las células tumorales se incubaron en primer lugar con TTS y células T efectoras durante 4 horas *in vitro*. Se añadieron los citostáticos durante un tiempo total de incubación de 48 horas, seguido de mediciones de la timidina radioactiva incorporado mediante centelleo líquido. Se restó el nivel de fondo de la radioactividad incorporada de los pocillos de solo células T tratadas con mitomicina C (≤ 1 % de los niveles en cultivos de células tumorales no tratadas).

40

$$\% \text{ del control} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{fondo}}{\text{células tumorales no tratadas} - \text{fondo}} \times 100$$

Resultados

45 El tratamiento de las células tumorales humanas Colo 205 con células T activadas y ABR-217620 en la combinación con gemcitabina (GEMZAR®), docetaxel (TAXOTERE®) o cisplatino según se aplica posteriormente a la SADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y superantígeno) dio como resultado una inhibición potenciada del crecimiento de células tumorales. Las Tablas 2-4 ilustran la proliferación de células tumorales como % del control no tratado. El tratamiento con gemcitabina (GEMZAR®), docetaxel (TAXOTERE®) o cisplatino mostró una inhibición del crecimiento tumoral potenciada con ABR-217620.

50

Tabla 2. La gemcitabina (GEMZAR®) potencia la inhibición del crecimiento tumoral en la combinación con ABR-217620.

SADCC, 4 h	Quimio, 48 h	Efecto en la proliferación de células tumorales humanas (Colo 205), porcentaje del control
Vehículo	Vehículo	100
ABR-217620, 1 pM	Vehículo	47
Vehículo	gemcitabina, 10 ng/ml	16
ABR-217620, 1 pM	gemcitabina, 10 ng/ml	7

55

Tabla 3. El docetaxel (TAXOTERE®) potencia la inhibición del crecimiento tumoral en la combinación con ABR-217620.

SADCC, 4 h	Quimio, 48 h	Efecto en la proliferación de células tumorales humanas (Colo 205), porcentaje del control
Vehículo	Vehículo	100
ABR-217620, 1 pM	Vehículo	47
Vehículo	Docetaxel, 1 ng/ml	46
ABR-217620, 1 pM	Docetaxel, 1 ng/ml	28

Tabla 4. El cisplatino potencia la inhibición del crecimiento tumoral en la combinación con ABR-217620.

SADCC, 4 h	Quimio, 48 h	Efecto en la proliferación de células tumorales humanas (Colo 205), porcentaje del control
Vehículo	Vehículo	100
ABR-217620, 1 pM	Vehículo	47
Vehículo	Cisplatino, 1 µg/ml	25
ABR-217620, 1 pM	Cisplatino, 1 µg/ml	10

Los resultados anteriores demostraron que la combinación de los agentes quimioterapéuticos gemcitabina (GEMZAR®), docetaxel (TAXOTERE®) o cisplatino con TTS potenció la inhibición del crecimiento tumoral inducida por TTS.

Ejemplo 3

Terapia combinada de TTS - agente quimioterapéutico (por ejemplo, pemetrexed): antitumoral *in vitro*

Se evaluó *in vitro* el efecto del tratamiento con superantígeno (TTS) (5T4FabSEA/E-120) en combinación con citostáticos sobre el crecimiento tumoral.

Líneas celulares y medios

Se cultivó la línea celular de cáncer humano Colo 205 en RPMI 1640 + FBS al 10 % (medio R10). Las células se prepararon desprendiéndolas con solución de disociación celular, se lavaron con BPS y se resuspendieron en medio R10. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes de sangre. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener líneas de células T efectoras.

Inhibición del crecimiento tumoral

La inhibición del crecimiento tumoral mediante TTS y pemetrexed (ALIMTA®) y la combinación se midió mediante una prueba de viabilidad celular. La prueba de viabilidad celular midió la cantidad de ATP en las células tumorales usando un ensayo basado en luciferasa. Las células tumorales se incubaron en primer lugar con TTS y células T efectoras durante 4 horas *in vitro*. Entonces se añadió pemetrexed durante un tiempo total de incubación de 48 horas, seguido de mediciones del contenido de ATP en los cultivos de células tumorales. Se restó el nivel de fondo de ATP de los pocillos de solo células T tratadas con mitomicina C ($\leq 1\%$ de los niveles en cultivos de células tumorales no tratadas).

$$\% \text{ del control} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{fondo}}{\text{células tumorales no tratadas} - \text{fondo}} \times 100$$

Resultados

El tratamiento de las células tumorales humanas Colo 205 con células T activadas y ABR-217620 en la combinación con pemetrexed (ALIMTA®) según se aplica posteriormente a la SADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y superantígeno) dio como resultado una inhibición potenciada del crecimiento de células tumorales. La Tabla 5 ilustra la viabilidad de células tumorales como % del control no tratado. El tratamiento con pemetrexed (ALIMTA®) mostró una inhibición del crecimiento tumoral potenciada en la combinación con ABR-217620.

Tabla 5. El pemetrexed (ALIMTA®) potencia la inhibición del crecimiento tumoral en la combinación con ABR-217620.

SADCC, 4h	Quimio, 48 h	Efecto en la viabilidad de células tumorales humanas (Colo 205), porcentaje del control
Vehículo	Vehículo	100
ABR-217620, 1 pM	Vehículo	79
Vehículo	Pemetrexed, 40 ng/ml	78

SADCC, 4h	Quimio, 48 h	Efecto en la viabilidad de células tumorales humanas (Colo 205), porcentaje del control
ABR-217620, 1 pM	Pemetrexed, 40 ng/ml	60

Los resultados anteriores demostraron que la combinación del agente quimioterapéutico pemetrexed (ALIMTA®) con TTS potenció la inhibición del crecimiento tumoral inducida mediante TTS.

5 Ejemplo 4

Terapia combinada de TTS - agente quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): antitumoral *in vitro*

Se evaluó *in vitro* el efecto del tratamiento con superantígeno (TTS) (5T4FabSEA/E-120) en combinación con citostáticos sobre la eliminación de células tumorales.

Líneas celulares y medios

Se cultivó la línea celular de cáncer humano Colo 205 en RPMI 1640 + FBS al 10 % (medio R10). Las células se prepararon desprendiéndolas con solución de disociación celular, se lavaron con BPS y se resuspendieron en medio R10. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes de sangre. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener líneas de células T efectoras.

20 Eliminación de células tumorales mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y superantígeno; SADCC

Para analizar la actividad antitumoral de las combinaciones de TTS (ABR-217620) y docetaxel (TAXOTERE®) *in vitro* se aplicó un ensayo de liberación de cromo. Las células diana en el ensayo de citotoxicidad, células tumorales humanas Colo 205, se pretrataron en primer lugar con varias concentraciones de docetaxel durante 16 horas, se lavaron en medio y después se marcaron con $(\text{Na})_2^{51}\text{CrO}_4$. La citotoxicidad antitumoral (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y superantígeno; SADCC) se midió entonces en presencia de TTS y de células T efectoras humanas activadas en un ensayo de liberación de cromo convencional usando placas de 96 pocillos. Se calculó el porcentaje de lisis específica de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación total} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

Resultados

El pretratamiento de las células tumorales humanas Colo 205 con docetaxel (TAXOTERE®) indujo una sensibilidad potenciada a células T activadas y a ABR-217620, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y superantígeno; SADCC. La FIG. 4 ilustra la eliminación de células tumorales como % de lisis específica con diversas concentraciones de ABR-217620 y células T activadas. El pretratamiento con docetaxel (TAXOTERE®) mostró una eliminación de células tumorales potenciada en comparación con las células tumorales de control.

Los resultados demostraron que la combinación del agente quimioterapéutico docetaxel (TAXOTERE®) como pretratamiento secuencial junto con TTS potenció la eliminación de células tumorales inducida por TTS.

45 Ejemplo 5

Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina): ejemplos *in vivo* de activación inmunitaria sistémica en ratones

La respuesta inmunitaria sistémica se evaluó en ratones C57BV6 después de tratamiento con C215Fab-SEA, una proteína de referencia, en combinación con el agente quimioterapéutico gemcitabina.

Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Líneas celulares y medios

Se mantuvo la línea celular de linfoma de células B murino A20 (ATCC, TIB-208) en RPMI 1640 con ultraglutamina suplementado con FCS al 10 %, piruvato sódico 1 mM, β -mercaptoetanol 50 μM y gentamicina 0,1 mg/ml.

Tratamiento de los ratones

El tratamiento con C215Fab-SEA se administró como inyecciones i.v. diarias (10 µg/ratón, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) durante 3 días consecutivos. Para los estudios de combinación, se inyectaron cuatro dosis de gemcitabina por vía i.p. con un intervalo de tres días antes de la terapia con C215Fab-SEA. Se incluyeron tres ratones en cada grupo del experimento. 48 horas después de la última inyección de C215Fab-SEA se sacrificó a los ratones y se extirparon los bazo para el análisis de la dinámica celular y de actividad citotóxica.

Citometría de flujo

Se prepararon suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratones inyectados con las sustancias indicadas. Se eliminaron los eritrocitos mediante choque hipotónico usando solución de Gey. Los linfocitos restantes se tiñeron para expresión de antígenos de la superficie celular durante 30 min sobre hielo después del bloqueo de los receptores Fc mediante anticuerpos de CD32/CD16. En los casos donde se usaron mAAb biotinilados, las células se tiñeron con estreptavidina-tricolor. Las células se lavaron dos veces en PBS + BSA al 1 % después de cada etapa de tinción. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSsort.

Ensayos de citotoxicidad

Los ratones tratados con las sustancias indicadas se sacrificaron 48 h después de la última inyección y se extirparon los bazo. La citotoxicidad de los esplenocitos en bruto se midió contra células A20 recubiertas con SEA (1 µg/ml) usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional (Dohlstien et al., 1990; Hedlund et al, 1993). La relación de células efectoras a diana fue de 100:1. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación total} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

Resultados

El pretratamiento con el quimioterapéutico (gemcitabina) no interfiere negativamente con la activación de células T inducida por SEA

El tratamiento convencional de ratones C57B1/6 sin tumores con gemcitabina (cuatro dosis a intervalos de tres días) a diversas dosis se siguió por 3 inyecciones diarias de C215Fab-SEA comenzando 6 días después de la última inyección de gemcitabina. Los esplenocitos se prepararon 48 horas después de la última inyección y se midió la citotoxicidad celular dependiente de superantígeno (SDCC) frente a células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional. Se detectó actividad citotóxica sustancial en todos los grupos tratados con Fab-SEA independientemente de la terapia anterior con gemcitabina (FIG. 5). El análisis por citometría de flujo mostró que la expansión de células T CD8-Vβ3 inducida por SEA aumentó mediante el tratamiento con gemcitabina (FIG. 6C). No se observó una activación de células T o de SDCC significativa en los ratones tratados solo con gemcitabina en cualquier dosis (FIG. 6).

Para investigar el efecto del tratamiento prolongado con gemcitabina en la actividad inmune inducida por SEA, se administró a los ratones 7 inyecciones de gemcitabina con un intervalo de 3 días, seguido de tratamiento con C215Fab-SEA comenzando 6 días después de la última inyección de gemcitabina. Tal como se muestra en las FIG. 7 y 8, esta pauta de tratamiento prolongado no alteró significativamente la capacidad de respuesta a SEA.

A continuación, se evaluó el impacto de la duración del periodo libre de tratamiento entre la terapia con gemcitabina y el tratamiento con TTS en la activación de células T inducida por SEA. Después de la terapia convencional con gemcitabina a 2,4 mg/ratón, se administraron tres inyecciones diarias de C215Fab-SEA, comenzando tras 1, 3 o 6 días después de la última administración de gemcitabina. Se extirparon los bazo 48 horas después del tratamiento y se analizaron los esplenocitos respecto a la activación de células T y funciones efectoras (SDCC). Interesantemente, el acortamiento del periodo de descanso entre tratamientos dio como resultado características de expansión de células T específicas de Vβ3 de una respuesta inmune inducida por SEA (FIG. 9). Esto se vio acompañado por una actividad de CTL potenciada de esplenocitos contra células A20 recubiertas con SEA (FIG. 10).

Estos resultados indicaron que el pretratamiento con gemcitabina no interfirió con la terapia de TTS y pueden incluso actuar para mejorar las funciones efectoras inducidas por SEA.

Ejemplo 6**Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): *in vivo*, activación inmunitaria sistémica en ratones**

La respuesta inmunitaria sistémica se evaluó en ratones C57B1/6 después de tratamiento con C215Fab-SEA, una proteína de referencia, en combinación con el agente citostático docetaxel.

Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Líneas celulares y medios

Se mantuvo la línea celular de linfoma de células B murino A20 (ATCC, TIB-208) en RPMI 1640 con ultraglutamina suplementado con FCS al 10 %, piruvato sódico 1 mM, β -mercaptoetanol 50 μ M y gentamicina 0,1 mg/ml.

Tratamiento de los ratones

El tratamiento con C215Fab-SEA se administró como inyecciones i.v. diarias (10 μ g/ratón, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) durante 3 días consecutivos. En los estudios de combinación, se administró una inyección i.p. de docetaxel (en 0,2 ml de solución de tampón que contenía polisorbato (0,1 - 10,9 %), etanol (0,1 - 10,1 %) y NaCl (0,45 - 0,9 %) bien antes o simultáneamente con terapia de C215Fab-SEA. Se incluyeron tres ratones en cada grupo del experimento. 48 horas después de la última inyección de C215Fab-SEA, se sacrificó a los ratones y se extirparon los bazos para el análisis de dinámica de células T y de actividad citotóxica.

Citometría de flujo

Se prepararon suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratones inyectados con las sustancias indicadas. Se eliminaron los eritrocitos mediante choque hipotónico usando solución de Gey. Los linfocitos restantes se tiñeron para expresión de antígenos de la superficie celular durante 30 min sobre hielo después del bloqueo de los receptores Fc mediante anticuerpos de CD32/CD16. En los casos donde se usaron mA b biotinilados, las células se tiñeron con estreptavidina-tricolor. Las células se lavaron dos veces en PBS + BSA al 1 % después de cada etapa de tinción. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSort.

Ensayos de citotoxicidad

Los ratones tratados con las sustancias indicadas se sacrificaron 48 h después de la última inyección y se extirparon los bazos. La citotoxicidad de los esplenocitos en bruto se midió contra células A20 recubiertas con SEA (1 μ g/ml) usando un ensayo de liberación de 51 Cr convencional (Dohlstien et al., 1990; Hedlund et al, 1993). La relación de células efectoras a diana fue de 100:1. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación total} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

Resultados**El pretratamiento con quimioterapéutico (docetaxel) no interfiere negativamente con la activación de células T inducida por SEA**

Al tratamiento de ratones C57B1/6 con diversas dosis de docetaxel en el día 1 le siguieron 3 inyecciones diarias de C215Fab-SEA comenzando en el día 2. Los esplenocitos se prepararon 48 horas después de la última inyección y se midió la citotoxicidad celular dependiente de superantígeno (SDCC) frente a células A20 recubiertas con SEA en un ensayo de liberación de 51 Cr convencional. Se detectaron una actividad citotóxica (FIG. 11) y expansión de células T específica de $V_{\beta}3$ (FIG. 12) sustanciales en todos los grupos tratados con Fab-SEA independientemente de la terapia anterior con docetaxel. Por lo tanto, el tratamiento citostático antes de la terapia con TTS no interfirió aparentemente con la activación inmunitaria mediada por SEA. En cambio, la administración de dosis terapéuticas de docetaxel (1 mg/animal) poco antes del tratamiento con TTS dio como resultado una potenciación de la activación de células T inducida por SEA, según se midió mediante la SDCC (FIG. 11). No se registró activación significativa de células T o SDCC en los ratones tratados solo con docetaxel a cualquier dosis. La dosis más alta de docetaxel usada en este experimento (1 mg) fue suficiente para inducir efectos antitumorales significativos en animales portadores de tumores cuando se administró solo y para aumentar el efecto de la terapia de TTS cuando se combina con C215Fab-SEA.

Ejemplo 7**Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina): efectos sinérgicos *in vivo* en ratones**

C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con gemcitabina se investigó respecto a la eficacia de la terapia tumoral en ratones C57B1/6. Se inoculó a los ratones por vía i.v. células de melanoma B16C215 para inducir tumores de pulmón en los estudios de terapia. Se administró gemcitabina después del primer ciclo de terapia con C215Fab-SEA.

Células

Se cultivó la línea celular de melanoma B16 murina (obtenida de la ATCC) transfectada con el antígeno humano C215 en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón C57B1/6 al 1 %.

Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Terapia tumoral en ratones C57B1/6: Número de tumores de pulmón

Se inoculó a grupos de ocho ratones C57B1/6 por vía i.v. con $1,75 \times 10^5$ células de melanoma B16 transfectadas con el antígeno tumoral humano C215 (Dohlsten, M. et al., 1994) en la vena caudal, en 0,2 ml de vehículo para inducir tumores pulmonares. El agente quimioterapéutico se inyectó por vía i.p. en varios días en 0,2 ml de vehículo. Para cada ciclo de tratamiento se inyectó ABR-214720 por vía i.v. con cuatro inyecciones diarias en 0,2 ml de vehículo. De tres a 6 semanas después se sacrificó a los ratones y se extirparon los tumores. Después de fijarlos en solución de Bouins durante al menos 24 h, se contó el número de tumores pulmonares.

Regímenes de tratamiento

Se administraron $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de ABR-214720 en los días 3-6 y 18-21 y se administraron 2,4 mg/ratón de gemcitabina en los días 2, 5, 8 y 11 (solo monoterapia) o en los días 8, 11, 14 y 17 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados

Tal como se muestra en la Tabla 6, la administración de 2,4 mg de gemcitabina por animal en los días 2, 5, 8 y 11 fue activa como agente único en este modelo, demostrando la sensibilidad *in vivo* de células tumorales B16 a la gemcitabina.

Tabla 6. Terapia de metástasis tumorales: Número de tumores pulmonares por animal después del tratamiento con gemcitabina.

Tratamiento	Número medio de metástasis pulmonares en el día 21
Control*	147
Gemcitabina 2,4 mg/ratón	49,5

*animales inoculados con tumor no tratados

Tal como se ilustra en la Tabla 7, una terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con la monoterapia de gemcitabina o TTS, en la reducción del número de metástasis pulmonares. La monoterapia con TTS dio como resultado un efecto antitumoral significativo. La gemcitabina se administró desde el día 8 después de la inoculación del tumor a una dosis que se había demostrado inhibidora del crecimiento tumoral en ratones con la enfermedad menos pronunciada, pero no ejerció ningún efecto antitumoral individualmente en este tumor de rápido crecimiento en este estadio. Se seleccionaron dosis de TTS y gemcitabina para ejercer efectos antitumorales máximos.

Tabla 7. Terapia de metástasis tumorales: Número de tumores pulmonares por animal después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación

Tratamiento	Número medio de metástasis pulmonares en el día 28	Número medio de metástasis pulmonares en el día 40
Control*	117	Todos los animales muertos
TTS	23	21
Gemcitabina	141	Todos los animales muertos

Tratamiento	Número medio de metástasis pulmonares en el día 28	Número medio de metástasis pulmonares en el día 40
TTS + gemcitabina	11	10
*animales inoculados con tumor no tratados		

Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, gemcitabina dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usó secuencialmente y comenzando con TTS.

5 Ejemplo 8

Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): efectos sinérgicos *in vivo* en ratones

10 C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con docetaxel se investigó respecto a la eficacia de la terapia tumoral en ratones C57B1/6. Se inoculó a los ratones por vía i.v. células de melanoma B16C215 para inducir tumores de pulmón en los estudios de terapia. El docetaxel se administró antes y después así como durante el ciclo de terapia con C215Fab-SEA.

15 Células

Se cultivó la línea celular de melanoma B16 murina (obtenida de la ATCC) transfectada con el antígeno humano C215 en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón C57B1/6 al 1 %.

Animales

25 Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Terapia tumoral en ratones C57B1/6: Número de tumores de pulmón

30 Se inoculó a grupos de ocho ratones C57B1/6 por vía i.v. con $1,75 \times 10^5$ células de melanoma B16 transfectadas con el antígeno tumoral humano C215 (Dohlsten, M. et al., 1994) en la vena caudal, en 0,2 ml de vehículo para inducir tumores pulmonares. El agente quimioterapéutico se inyectó por vía i.p. en varios días en 0,2 ml de vehículo. Para cada ciclo de tratamiento se inyectó ABR-214720 por vía i.v. con cuatro inyecciones diarias en 0,2 ml de vehículo. De tres a 6 semanas después se sacrificó a los ratones y se extirparon los tumores. Después de fijarlos en solución de Bouins durante al menos 24 h, se contó el número de tumores pulmonares.

Regímenes de tratamiento

40 Se administraron diez μg /ratón de ABR-214720 en los días 3-6 y se administró 1,0 mg/ratón de docetaxel en los días 2 y 9 o en el día 5 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados

45 Como puede observarse a partir de la Tabla 8, la terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con docetaxel (días 2 y 9) o con TTS solos en la reducción del número de metástasis pulmonares. El tratamiento con TTS o docetaxel solos dio como resultado efectos antitumorales significativos. Sin embargo, el tratamiento con TTS en combinación con docetaxel ejerció efectos antitumorales máximos.

Tabla 8. Terapia de metástasis tumorales: Número de tumores pulmonares por animal después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Número medio de metástasis pulmonares en el día 21
Control*	137
TTS	19
Docetaxel	48
TTS + Docetaxel	1
*animales inoculados con tumor no tratados	

50 Como puede observarse a partir de la Tabla 9, la terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con docetaxel (día 5) o con TTS solos en la reducción del número de metástasis pulmonares. El tratamiento con TTS solo dio como resultado efectos antitumorales significativos. Sin embargo, el tratamiento con TTS en combinación con docetaxel ejerció efectos antitumorales máximos.

55

Tabla 9. Terapia de metástasis tumorales: Número de tumores pulmonares por animal después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Número medio de metástasis pulmonares en el día 21
Control*	73
TTS	14
Docetaxel	93
TTS + Docetaxel	6
*animales inoculados con tumor no tratados	

5 Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel, dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usaron secuencialmente con TTS así como integrados en el tercer día del ciclo de TTS.

Ejemplo 9

10 Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): efectos sinérgicos *in vivo* en ratones

15 C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con docetaxel se investigó respecto a la eficacia de la terapia tumoral en ratones C57B1/6 medida mediante la supervivencia. Se inoculó a los ratones por vía i.v. células de melanoma B16C215 para inducir tumores de pulmón en los estudios de terapia. Se administró docetaxel antes o antes y después del ciclo de terapia con C215Fab-SEA.

Células

20 Se cultivó la línea celular de melanoma B16 murina (obtenida de la ATCC) transfectada con el antígeno humano C215 en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón C57B1/6 al 1 %.

25 Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

30 Terapia tumoral en ratones C57B1/6: supervivencia

35 Se inoculó a grupos de 8 a 20 ratones C57B1/6 por vía i.v. con $1,75 \times 10^5$ células de melanoma B16 transfectadas con el antígeno tumoral humano C215 (Dohlsten, M., et al. 1994) en la vena caudal, en 0,2 ml de vehículo para inducir tumores pulmonares. El agente quimioterapéutico se inyectó por vía i.p. en varios días en 0,2 ml de vehículo. Para cada ciclo de tratamiento se inyectó ABR-214720 por vía i.v. con cuatro inyecciones diarias en 0,2 ml de vehículo. Cuando los ratones mostraron signos de morbilidad en el día 90 o 120, se sacrificaron y se llevó a cabo la autopsia.

40 Regímenes de tratamiento

Se administraron diez $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de ABR-214720 en los días 3-6 y se administró 1,0 mg/ratón de docetaxel en el día 2 o en los días 2 y 9 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

45 Resultados

50 Tal como se ilustra en la Tabla 10, una terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con la monoterapia de docetaxel o TTS, en el aumento de la longevidad. La monoterapia con TTS o docetaxel dio como resultado efectos antitumorales significativos. Se seleccionaron dosis de TTS y docetaxel para ejercer efectos antitumorales máximos.

Tabla 10. Terapia de metástasis tumorales: Mediana de tiempo de supervivencia de ratones con metástasis de tumor pulmonar después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Mediana de tiempo de supervivencia (días)
Control*	33
TTS	41,5
Docetaxel (día 2)	38
Docetaxel (días 2 y 9)	37,5
TTS + Docetaxel (día 2)	66
TTS + Docetaxel (días 2 y 9)	>90

Tratamiento	Mediana de tiempo de supervivencia (días)
*animales inoculados con tumor no tratados	

Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usó secuencialmente y comenzando con el agente quimioterapéutico.

5 Ejemplo 10

Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): efectos sinérgicos *in vivo* en ratones

10 C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con docetaxel se investigó respecto a la eficacia de la terapia tumoral en ratones C57B1/6 medida mediante la supervivencia. Se inoculó a los ratones por vía i.v. células de melanoma B16C215 para inducir tumores de pulmón en los estudios de terapia. Se administró docetaxel después de los ciclos de terapia con C215Fab-SEA.

15 Células

Se cultivó la línea celular de melanoma B16 murina (obtenida de la ATCC) transfectada con el antígeno humano C215 en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón C57B1/6 al 1 %.

Animales

25 Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Terapia tumoral en ratones C57B1/6: supervivencia

30 Se inoculó a grupos de 8 a 20 ratones C57B1/6 por vía i.v. con $1,75 \times 10^5$ células de melanoma B16 transfectadas con el antígeno tumoral humano C215 (Dohlsten, M., et al. 1994) en la vena caudal, en 0,2 ml de vehículo para inducir tumores pulmonares. El agente quimioterapéutico se inyectó por vía i.p. en varios días en 0,2 ml de vehículo. Para cada ciclo de tratamiento se inyectó ABR-214720 por vía i.v. con cuatro inyecciones diarias en 0,2 ml de vehículo. Cuando los ratones mostraron signos de morbilidad en el día 90 o 120, se sacrificaron y se llevó a cabo la autopsia.

Regímenes de tratamiento

40 Se administraron $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de ABR-214720 en los días 3-6 y 31-34 y se administraron 2,0 mg/ratón de docetaxel en los días 8, 22, 36 y 50 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados

45 Tal como se ilustra en la Tabla 11, una terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con la monoterapia de docetaxel o TTS, en el aumento de la longevidad. La monoterapia con TTS o docetaxel dio como resultado efectos antitumorales significativos. Se seleccionaron dosis de TTS y docetaxel para ejercer efectos antitumorales máximos.

Tabla 11. Terapia de metástasis tumorales: Mediana de tiempo de supervivencia de ratones con metástasis de tumor pulmonar después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Mediana de tiempo de supervivencia (días)
Control*	31,5
TTS	48
Docetaxel	50
TTS + Docetaxel	75
*animales inoculados con tumor no tratados	

50 Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usó secuencialmente y comenzando con TTS.

Ejemplo 11**Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): efectos sinérgicos *in vivo* en ratones**

C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con docetaxel se investigó respecto a la eficacia de la terapia tumoral en ratones C57B1/6 medida mediante la supervivencia. Se inoculó a los ratones por vía i.v. células de melanoma B16C215 para inducir tumores de pulmón en los estudios de terapia. Se administró docetaxel el día inmediatamente posterior al último día de los ciclos de terapia con C215Fab-SEA.

Células

Se cultivó la línea celular de melanoma B16 murina (obtenida de la ATCC) transfectada con el antígeno humano C215 en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón C57B1/6 al 1 %.

Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Terapia tumoral en ratones C57B/6: supervivencia

Se inoculó a grupos de 8 a 20 ratones C57B1/6 por vía i.v. con $1,75 \times 10^5$ células de melanoma B16 transfectadas con el antígeno tumoral humano C215 (Dohlstien, M., et al. 1994) en la vena caudal, en 0,2 ml de vehículo para inducir tumores pulmonares. El agente quimioterapéutico se inyectó por vía i.p. en varios días en 0,2 ml de vehículo. Para cada ciclo de tratamiento se inyectó ABR-214720 por vía i.v. con cuatro inyecciones diarias en 0,2 ml de vehículo. Cuando los ratones mostraron signos de morbilidad en el día 90 o 120, se sacrificaron y se llevó a cabo la autopsia.

Regímenes de tratamiento

Se administraron diez $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de ABR-214720 en los días 3-6, 17-20, 45-48 y 59-62 y se administraron 2,0 $\text{mg}/\text{ratón}$ de docetaxel en los días 7, 21, 35, 49, 63 y 77 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados

Tal como se ilustra en la Tabla 12, una terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con la monoterapia de docetaxel o TTS, en el aumento de la longevidad. La monoterapia con TTS o docetaxel dio como resultado efectos antitumorales significativos. Se seleccionaron dosis de TTS y docetaxel para ejercer efectos antitumorales máximos.

Tabla 12. Terapia de metástasis tumorales: Mediana de tiempo de supervivencia de ratones con metástasis de tumor pulmonar después del tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Tiempo de supervivencia medio (días)
Control*	35
TTS	75
Docetaxel	61
TTS + Docetaxel	>120
*animales inoculados con tumor no tratados	

Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usaron secuencialmente y comenzando con TTS y administrando el agente quimioterapéutico en el día inmediatamente posterior al último día de los ciclos de tratamiento con TTS.

Ejemplo 12**Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina): modelo de ratón SCID humanizado *in vivo***

Se evaluó el efecto del tratamiento con TTS (5T4Fab-SEA/E-120, ABR-217620) en combinación con el agente quimioterapéutico gemcitabina sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor humano experimental. Se trasplantó a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con linfocitos humanos y células tumorales humanas creciendo intraperitonealmente como tumores sólidos. ABR-217620 es un TTS desarrollado para uso en

seres humanos y por lo tanto se ensayó en el modelo de SCID humanizado. Los efectos antitumorales del TTS son dependientes de linfocitos humanos activados.

Células

5 Se cultivó la línea celular de tumor humano Colo 205 (obtenida a través de la ATCC) en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes de sangre en el Hospital Universitario de Lund. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener linfocitos T efectores activados. Los linfocitos T se prepararon desprendiendo las células cultivadas *in vitro*, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %.

15 Animales

Se usaron ratones SCID hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron dieta para roedores granulada estéril y agua estéril a voluntad.

20 Terapia tumoral en ratones SCID: Masa tumoral intraperitoneal

Se inyectó a de siete a 8 ratones SCID por grupo de tratamiento por vía intraperitoneal con células tumorales humanas en 0,2 ml de vehículo. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal con linfocitos activados en 0,2 ml de vehículo y recibieron adicionalmente 4-5 inyecciones intravenosas con sustancia de ensayo de TTS en 0,2 ml de vehículo, la primera inyección se administró a la vez que los linfocitos activados. El tratamiento con TTS se combinó con inyecciones intraperitoneales (i.p.) o intravenosas (i.v.) del agente quimioterapéutico. Después de 3-10 semanas, se sacrificó a los ratones mediante dislocación del cuello y se determinó la masa tumoral.

30 Regímenes de tratamiento

Se administraron cincuenta µg/ratón de ABR-217620 en los días 2-6 después de la inyección del tumor y se administraron 2,0 mg/ratón de docetaxel por vía i.v. en los días 3, 5 y 8 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

35 Resultados

Como puede observarse a partir de la Tabla 13, la terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con gemcitabina o con TTS solos en la reducción de la masa tumoral. El tratamiento con TTS solo dio como resultado efectos antitumorales significativos. Sin embargo, el tratamiento con TTS en combinación con gemcitabina ejerció efectos antitumorales máximos.

Tabla 13. Terapia de tumores humanos: Masa tumoral por animal después de tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Media/mediana de masa tumoral (mg)
Control*	403/362
TTS	133/79
Gemcitabina	303/300
TTS + gemcitabina	60/43
*animales inoculados con tumor no tratados	

45 Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, gemcitabina, dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usó integrada, comenzando poco antes del ciclo de TTS.

Ejemplo 13

50 Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): modelo de ratón SCID humanizado *in vivo*

55 Se evaluó el efecto del tratamiento con TTS (5T4Fab-SEAE-120, ABR-217620) en combinación con el agente quimioterapéutico docetaxel sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor humano experimental. Se trasplantó a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con linfocitos humanos y células tumorales humanas creciendo intraperitonealmente como tumores sólidos. ABR-217620 es un TTS desarrollado para uso en seres humanos y por lo tanto se ensayó en el modelo de SCID humanizado. Los efectos antitumorales del TTS son dependientes de linfocitos humanos activados.

Células

Se cultivó la línea celular de tumor humano Colo 205 (obtenida a través de la ATCC) en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes de sangre en el Hospital Universitario de Lund. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener linfocitos T efectores activados. Los linfocitos T se prepararon desprendiendo las células cultivadas *in vitro*, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %.

Animales

Se usaron ratones SCID hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron dieta para roedores granulada estéril y agua estéril a voluntad.

Terapia tumoral en ratones SCID: Masa tumoral intraperitoneal

Se inyectó a de siete a 8 ratones SCID por grupo de tratamiento por vía intraperitoneal con células tumorales humanas en 0,2 ml de vehículo. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal con linfocitos activados en 0,2 ml de vehículo y recibieron adicionalmente 4-5 inyecciones intravenosas con sustancia de ensayo de TTS en 0,2 ml de vehículo, la primera inyección se administró a la vez que los linfocitos activados. El tratamiento con TTS se combinó con inyecciones intraperitoneales (i.p.) o intravenosas (i.v.) del agente quimioterapéutico. Después de 3-10 semanas, se sacrificó a los ratones mediante dislocación del cuello y se determinó la masa tumoral.

Regímenes de tratamiento

Se administraron cincuenta $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de ABR-217620 en los días 6-10 después de la inyección del tumor y se administraron 0,2 mg/ratón de docetaxel por vía i.p. en el día 4 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados

Como puede observarse a partir de la Tabla 14, la terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con docetaxel o con TTS solos en la reducción de la masa tumoral. El tratamiento con docetaxel solo dio como resultado efectos antitumorales significativos. Sin embargo, el tratamiento con TTS en combinación con gemcitabina ejerció efectos antitumorales máximos.

Tabla 14. Terapia de tumores humanos: Masa tumoral por animal después de tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Media/mediana de masa tumoral (mg)
Control*	321/282
TTS	315/316
Docetaxel	176/103
TTS + Docetaxel	52/46
*animales inoculados con tumor no tratados	

Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usa el agente quimioterapéutico justo antes del ciclo de TTS.

Ejemplo 14

Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico (por ejemplo, docetaxel): modelo de ratón SCID humanizado *in vivo*

Se evaluó el efecto del tratamiento con TTS (ST4Fab-SEAVE-120, ABR-217620) en combinación con el agente quimioterapéutico docetaxel sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor humano experimental. Se trasplantó a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con linfocitos humanos y células tumorales humanas creciendo intraperitonealmente como tumores sólidos. ABR-217620 es un TTS desarrollado para uso en seres humanos y por lo tanto se ensayó en el modelo de SCID humanizado. Los efectos antitumorales del TTS son dependientes de linfocitos humanos activados.

Células

Se cultivó la línea celular de tumor humano Calu-1 (obtenida a través de la ATCC) en medio de crecimiento celular. La línea celular se preparó mediante el desprendimiento de células cultivadas *in vitro* con solución de disociación

celular, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes de sangre en el Hospital Universitario de Lund. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Paque. Las células se cultivaron entonces en medio R10 y se estimularon con TTS para obtener linfocitos T efectores activados. Los linfocitos T se prepararon desprendiendo las células cultivadas *in vitro*, se resuspendieron en PBS, se contaron y se diluyeron en PBS con suero de ratón SCID al 1 %.

Animales

Se usaron ratones SCID hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron dieta para roedores granulada estéril y agua estéril a voluntad.

Terapia tumoral en ratones SCID: Masa tumoral intraperitoneal

Se inyectó a de siete a 8 ratones SCID por grupo de tratamiento por vía intraperitoneal con células tumorales humanas en 0,2 ml de vehículo. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal con linfocitos activados en 0,2 ml de vehículo y recibieron adicionalmente 4-5 inyecciones intravenosas con sustancia de ensayo de TTS en 0,2 ml de vehículo, la primera inyección se administró a la vez que los linfocitos activados. El tratamiento con TTS se combinó con inyecciones intraperitoneales (i.p.) o intravenosas (i.v.) del agente quimioterapéutico. Después de 3-10 semanas, se sacrificó a los ratones mediante dislocación del cuello y se determinó la masa tumoral.

Regímenes de tratamiento

Se administraron cincuenta µg/ratón de ABR-217620 en los días 2-6 después de la inyección del tumor y se administraron 0,2 mg/ratón de docetaxel por vía i.p. en el día 7 como monoterapias o en combinación, respectivamente.

Resultados y discusión

Como puede observarse a partir de la Tabla 15, la terapia combinada fue superior y sinérgica en comparación con el tratamiento con docetaxel o con TTS solos en la reducción de la masa tumoral. El tratamiento con docetaxel solo dio como resultado efectos antitumorales significativos. Sin embargo, el tratamiento con TTS en combinación con gemcitabina ejerció efectos antitumorales máximos.

Tabla 15. Terapia de tumores humanos: Masa tumoral por animal después de tratamiento con los fármacos solos o en combinación.

Tratamiento	Media/mediana de masa tumoral (mg)
Control*	156/39
TTS	221/79
Docetaxel	31/29
TTS + Docetaxel	9/5

*animales inoculados con tumor no tratados

Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel dio como resultado efectos antitumorales sinérgicos cuando se usa el agente quimioterapéutico justo después del ciclo de TTS.

Ejemplo 15

Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico: inhibición *in vivo* de formación de anticuerpos anti-TTS

Es de vital importancia que no se desarrollen títulos elevados de anticuerpo y neutralicen al fármaco de TTS. C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con gemcitabina se investigó con respecto a la modulación de la respuesta de anticuerpos anti-SEA en ratones C57B1/6. La respuesta de anticuerpos anti-SEA primaria se indujo mediante inmunización con SEA. El tratamiento con ABR-214720 se administró como 4 inyecciones por vía i.v. diarias. Para los estudios de combinación, se inyectó gemcitabina cuatro veces a intervalos de tres días comenzando bien después de completar la terapia con TTS o justo después de la inyección de ABR-214720.

Animales

Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Determinación de anticuerpos anti-SEA de ratón

Se determinó la concentración de anticuerpos anti-SEA en las muestras de plasma de ratón mediante la técnica de ELISA. El ensayo se llevó a cabo con adición de reactivo, incubación y lavado de manera secuencial. En la primera etapa, las placas de microtitulación se recubrieron con 1 µg/ml (200 ng/pocillo) de SEA recombinante en NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6. Los pocillos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (p/v) en PBS 10 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 % (p/v) (PBST). Se añadieron las muestras y los patrones de anticuerpos anti-SEA de ratón purificados por afinidad, se diluyeron en BSA al 1 % en PBST. Se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario. A continuación, se añadió un anticuerpo de conejo biotinilado anti-IgG de cabra. A continuación, se dejó que se uniese estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante a los grupos de biotina del anticuerpo terciario. La etapa final fue la adición de un sustrato enzimático. La reacción enzimática se detuvo con H₂SO₄ 1 N y después se controló la absorbancia a 450 nm, con 650 nm como longitud de onda de referencia en un espectrofotómetro de ELISA. Se ajustó una función de cuatro parámetros a los valores de concentración/absorbancia obtenidos de los patrones y se determina la concentración desconocida de anticuerpos anti-SEA en las muestras a partir de la curva patrón. El intervalo de medición se estimó como 0,40 - 50 ng/ml. La dilución de la muestra fue al menos 1:100, es decir, el límite de cuantificación (LDC) en plasma fue de 40 ng/ml.

Inducción de anticuerpos anti-SEA y tratamiento con agentes quimioterapéuticos en ratones C57B1/6

Para la inducción de una respuesta primaria anti-SEA, se administró a los ratones 4 inyecciones intravenosas de SEA no conjugado (3 µg/ratón/inyección, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) en los días 1, 5, 9 y 13. Comenzando en el día 29 después del cebado, el tratamiento con ABR-214720 se administró como inyecciones i.v. diarias (10 µg/ratón/inyección, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) en 4 días consecutivos. Se inyectó gemcitabina (2,4 mg/ratón/inyección i.p. en 0,2 ml de NaCl 0,15 M) cuatro veces a intervalos de tres días, comenzando en los instantes indicados durante o después de completar el tratamiento con ABR-214720. En los momentos indicados se extrajeron muestras de sangre a través de la vena safena o de la vena cava para la preparación del plasma. Se incluyeron ocho ratones en cada grupo del experimento.

Resultados

Tal como se ilustra en la Tabla 16, la terapia combinada fue superior en comparación con el tratamiento solamente con TTS para el mantenimiento de un título bajo de anticuerpos anti-SEA. Los tratamientos solo con TTS dieron como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA significativos. La gemcitabina se administró al comienzo, durante o después del ciclo de tratamiento con TTS. Se demostró claramente que el tratamiento combinado comenzando tanto durante como después del ciclo de TTS dio como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA de respuesta secundaria mucho más bajos en comparación con solo tratamiento de TTS (grupos 4-7 en comparación con grupo 3).

Tabla 16. Inhibición de anticuerpos anti-SEA mediante combinación con quimioterapia

Grupo N°	SEA (i.v.) Días 1, 5, 9, 13	C215Fab-SEA (i.v.) Días 29, 30, 31, 32	Gemcitabina (i.p) Día de inicio	Anti-SEA día 28 (ng/ml) Respuesta primaria	Anti-SEA día 46 (ng/ml) Respuesta secundaria	Proporción respuesta secundaria/primaria
1	Vehículo	Vehículo	Vehículo, d 34	59	97	1,6
2	SEA	Vehículo	Vehículo, d 34	1073	337	0,3
3	SEA	C215Fab-SEA	Vehículo, d 34	333	6648	20,0
4	SEA	C215Fab-SEA	Gemcitabina, 30	749	166	0,2
5	SEA	C215Fab-SEA	Gemcitabina, 32	353	197	0,5
6	SEA	C215Fab-SEA	Gemcitabina, 33	797	747	0,9
7	SEA	C215Fab-SEA	Gemcitabina, 34	1139	4084	3,6

El comienzo del tratamiento con gemcitabina antes de las inyecciones integradas de TTS así como después de las inyecciones de TTS dio como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA de respuesta secundaria mucho menores en comparación con el tratamiento de solo TTS. Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, gemcitabina, dio como resultado niveles disminuidos de anticuerpos anti-superantígeno (anti-sag) después de los ciclos de tratamiento con TTS. Por lo tanto pueden administrarse ciclos de tratamiento con TTS adicionales sin interferencia de anticuerpos anti-sag neutralizantes de título elevado.

Ejemplo 16**Terapia combinada de TTS - quimioterapéutico: inhibición *in vivo* de formación de anticuerpos anti-TTS**

5 Es de vital importancia que no se desarrollen títulos elevados de anticuerpo y neutralicen al fármaco de TTS. C215Fab-SEA (ABR-214720), una proteína de referencia, en combinación con docetaxel se investigó con respecto a la modulación de la respuesta de anticuerpos anti-SEA en ratones C57B1/6. La respuesta de anticuerpos anti-SEA primaria se indujo mediante inmunización con SEA. El tratamiento con ABR-214720 se administró como 4 inyecciones por vía i.v. diarias. Para los estudios de combinación, el docetaxel se inyectó bien antes de completar la
10 terapia con TTS o poco después de la última inyección de ABR-214720.

Animales

15 Se usaron ratones C57B1/6 hembra. Los ratones se usaron de manera rutinaria a la edad de 8 a 12 semanas y recibieron alimento y agua a voluntad.

Determinación de anticuerpos anti-SEA de ratón

20 Se determinó la concentración de anticuerpos anti-SEA en las muestras de plasma de ratón mediante la técnica de ELISA. El ensayo se llevó a cabo con adición de reactivo, incubación y lavado de manera secuencial. En la primera etapa, las placas de microtitulación se recubrieron con 1 µg/ml (200 ng/pocillo) de SEA recombinante en NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6. Los pocillos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (p/v) en PBS 10 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 % (p/v) (PBST). Se añadieron las muestras y los patrones de anticuerpos anti-SEA de ratón
25 purificados por afinidad, se diluyeron en BSA al 1 % en PBST. Se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario. A continuación, se añadió un anticuerpo de conejo biotinilado anti-IgG de cabra. A continuación, se dejó que se uniese estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante a los grupos de biotina del anticuerpo terciario. La etapa final fue la adición de un sustrato enzimático. La reacción enzimática se detuvo con H₂SO₄ 1 N y después se controló la absorbancia a 450 nm, con 650 nm como longitud de onda de referencia en un espectrofotómetro de ELISA. Se ajustó una función de cuatro parámetros a los valores de
30 concentración/absorbancia obtenidos de los patrones y se determina la concentración desconocida de anticuerpos anti-SEA en las muestras a partir de la curva patrón. El intervalo de medición se estimó como 0,40 - 50 ng/ml. La dilución de la muestra fue al menos 1:100, es decir, el límite de cuantificación (LDC) en plasma fue de 40 ng/ml.

Inducción de anticuerpos anti-SEA y tratamiento con agentes quimioterapéuticos en ratones C57B1/6

35 Para la inducción de una respuesta primaria anti-SEA, se administró a los ratones 4 inyecciones intravenosas de SEA no conjugado (3 µg/ratón/inyección, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) en los días 1, 5, 9 y 13. Comenzando en el día 29 después del cebado, el tratamiento con ABR-214720 se administró como inyecciones i.v. diarias (10 µg/ratón/inyección, en 0,2 ml de PBS que contenía suero de ratón al 1 %) en 4 días consecutivos. Se
40 inyectó docetaxel (1 o 2 mg/ratón/inyección i.p. en 0,2 ml de polisorbato 80 al 10,9-21,7 %, etanol al 5,1-10,2 % y NaCl al 0-0,45 %) una vez durante el tratamiento de ABR-214720 o después de completar el tratamiento con ABR-214720. En los momentos indicados se extrajeron muestras de sangre mediante aspiración a través de la vena safena (día 26) o de la vena cava (día 46) para la preparación del plasma. Se incluyeron de once a diecisiete ratones en cada grupo experimental.
45

Resultados

50 Tal como se ilustra en la Tabla 17, la terapia combinada fue superior en comparación con el tratamiento solamente con TTS, para el mantenimiento de un título bajo de anticuerpos anti-SEA. Los tratamientos solo con TTS dieron como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA significativos. El docetaxel se administró durante o después del ciclo de tratamiento con TTS. Se demostró claramente que el tratamiento combinado tanto durante como después del ciclo de TTS dio como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA de respuesta secundaria mucho más bajos en comparación con solo tratamiento de TTS (grupos 2-7 en comparación con grupo 1).
55

Tabla 17. Inhibición de anticuerpos anti-SEA mediante combinación con quimioterapia

Grupo N°	SEA (i.v.) Días 1, 5, 9, 13	C215Fab- SEA (i.v.) Días 29, 30, 31, 32	Docetaxel 1 o 2 mg (i.p.) Día	Anti-SEA día 26 (ng/ml) Respuesta primaria	Anti-SEA día 46 (ng/ml) Respuesta secundaria	Proporción respuesta secundaria/primaria
1	SEA	C215Fab- SEA	Vehículo, d 30	1290	27700	21,5
2	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 29 (1 mg)	572	7350	12,8

Grupo N°	SEA (i.v.) Días 1, 5, 9, 13	C215Fab- SEA (i.v.) Días 29, 30, 31, 32	Docetaxel 1 o 2 mg (i.p.) Día	Anti-SEA día 26 (ng/ml) Respuesta primaria	Anti-SEA día 46 (ng/ml) Respuesta secundaria	Proporción respuesta secundaria/primaria
3	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 30 (1 mg)	1290	23700	18,4
4	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 31 (1 mg)	898	4280	4,8
5	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 32 (1 mg)	813	4570	5,6
6	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 33 (1 mg)	1240	12300	9,9
7	SEA	C215Fab- SEA	Docetaxel, d 33 (2 mg)	657	7340	11,2

La administración de docetaxel antes de las inyecciones integradas de TTS dio como resultado títulos de anticuerpo anti-SEA de respuesta secundaria menores en comparación con el tratamiento de TTS solo. Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, docetaxel, dio como resultado niveles disminuidos de anticuerpos anti-superantígeno (anti-sag) después de los ciclos de tratamiento con TTS. Por lo tanto pueden administrarse ciclos de tratamiento con TTS adicionales sin interferencia de anticuerpos anti-sag neutralizantes de título elevado.

Ejemplo 17

Régimen de tratamiento combinado de superantígeno para monos

Los animales (monos cinomolgos, criados para este fin, de aproximadamente 15 meses de edad y un peso de 2,5-3,2 kg) se asignaron a tratamiento. Los volúmenes de dosis individuales se basaron en el peso corporal individual.

Se administró a los animales 5T4FabFab-SEA_{D227A}, una proteína de referencia, en forma de inyecciones intravenosas (en bolo) y gemcitabina en forma de inyecciones intravenosas (30 min). La duración total del estudio fue de 35 días. Se administró 5T4Fab-SEA_{D227A} en dos ciclos de tratamiento, cada uno de 5 días (días 1-5 y 29-33) y gemcitabina en tres ocasiones (días 8, 15 y 22).

Tabla 18. Tratamiento: Una combinación secuencial de 5T4Fab-SEA_{D227A} (i.v.) y gemcitabina (infusión i.v. durante 30 min) a monos cinomolgos.

Tratamiento	Grupo			
	1	2	3	4
5T4Fab-SEA _{D227A} (µg/kg/ocasión)	18	0	6	18
Gemcitabina (mg/kg/ocasión)	0	65	65	65
N° de animal y sexo	761M	757M	759M	755M
	766F	762F	764F	760F

Determinación de la concentración de anticuerpos anti-SEA después del régimen de tratamiento combinado

Se recogieron muestras de sangre a través de una vena adecuada (diferente de la usada para dosificación) en tubos que contenían heparina litiada y se pusieron inmediatamente en un baño de hielo-agua o Criorack. Las muestras de sangre se usaron para determinar la concentración de anticuerpos anti-SEA.

Se usó un método ELISA para determinar la concentración de anticuerpos anti-SEA en las muestras de plasma. Los pocillos de la placa de microtitulación se recubrieron con SEA en tampón de recubrimiento. Entonces se bloquearon los pocillos con albúmina sérica bovina en suero salino tamponado con fosfato que contenía Tween 20. Se añadieron las muestras y los patrones en el intervalo de 1-250 ng/ml. Se usaron anticuerpos de conejo anti-IgG de mono como anticuerpo secundario y en una etapa posterior se añadió un anticuerpo de cerdo anti-IgG de conejo biotinilado. A continuación, se dejó que se uniese estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante a los grupos de biotina del anticuerpo terciario. La etapa final fue la adición de un sustrato enzimático para la peroxidasa de rábano picante. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de ácido oxálico al 2 % y después se

controló la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de ELISA. Se determinó la concentración desconocida de anticuerpos anti-SEA en las muestras a partir de la curva patrón de IgG anti-SEA de mono purificada por afinidad. El límite de cuantificación del método fue 0,8 µg/ml (5 pmol/ml) a una dilución de la muestra de 1:100.

5 Los resultados de los niveles de anticuerpo anti-SEA en plasma se presentan en la Tabla 19. En el día 1, los niveles de anticuerpo anti-SEA en todos los animales estaban por debajo o ligeramente por encima del LDC (0,80 mg/l). En el día 29, los niveles de anticuerpo anti-SEA estaban elevados en los animales que recibieron solo 5T4Fab-SEA_{D227A} (Grupo 1). En los grupos 3 y 4 (la combinación secuencial de 5T4Fab-SEA_{D227A} y gemcitabina), no se observaron cambios o solo una elevación menor en el nivel de anticuerpos anti-SEA en el día 29. Por lo tanto, esto demostró
10 que la administración de gemcitabina en combinación con TTS redujo la concentración de producción de anticuerpos anti-SEA en los animales desde el día 1 hasta el día 29.

Tabla 19. Niveles de anticuerpos anti-SEA en muestras de plasma obtenidas de monos cinomolgos después de la administración de 5T4Fab-SEA_{D227A} (días 1-5, días 29-33) solo o en combinación secuencial con gemcitabina (días 8, 15, 22).

Nº de grupo	Administración		Nº de animal y sexo	Niveles de anticuerpo anti-SEA (mg/l)			
	5T4Fab-SEA _{D227A}	Gemcitabina		Día 1	Día 14	Día 21	Día 29
1	18 µg/kg	-	761M 766F	<LDC 0,96	30,3 58,8	20,7 73,1	18,3 41,0
2	-	65 mg/kg	757M 762F	<LDC <LDC	<LDC <LDC	<LDC 0,87	<LDC <LDC
3	6 µg/kg	65 mg/kg	759M 764F	<LDC <LDC	<LDC 22,0	<LDC 8,04	<LDC 6,86
4	18 µg/kg	65 mg/kg	755M 760F	<LDC 2,05	<LDC 14,2	<LDC 7,80	<LDC 5,94

Determinación de la concentración de TTS después del régimen de tratamiento combinado

20 Se recogieron muestras de sangre a través de una vena adecuada (diferente de la usada para dosificación) en tubos que contenían heparina litiada y se pusieron inmediatamente en un baño de hielo-agua o Criorack. Las muestras de sangre se usaron para determinar la concentración de 5T4Fab-SEA_{D227A}.

25 Se usó un método ELISA para determinar la concentración de 5T4Fab-SEA_{D227A} en muestras de plasma. El método se basó en el hecho de que una parte de 5T4Fab-SEA_{D227A} es el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal de ratón y la otra parte es el superantígeno estafilocócico SEA.

30 Se recubrieron placas de microtitulación con un anticuerpo de cabra anti-kappa de ratón en 50 mM NaHCO₃, pH 9,6. Las placas se lavaron en suero salino tamponado con fosfato que contenía Tween 20 entre cada etapa de incubación. Después de bloquear los pocillos con albúmina sérica bovina, se añadieron las muestras diluidas y los patrones en el intervalo de 0,024-6,25 ng/ml. La etapa siguiente fue la adición de un anticuerpo biotinilado de conejo anti-SEA. En la etapa posterior, se añadió peroxidasa de rábano picante y estreptavidina conjugada a una estructura de dextrano. La etapa final fue la adición de sustrato, kit de sustrato EIA de peroxidasa TBM. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 N y se controló la absorbancia a 450 nm mediante un espectrofotómetro de ELISA. Las muestras se cuantificaron a partir de la curva patrón de 5T4Fab-SEA_{D227A}.

35 Los resultados del bioanálisis de la concentración de 5T4FAB-SEA_{D227A} en plasma se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones de 5T4Fab-SEA_{D227A} en muestras de plasma obtenidas de monos cinomolgos después de la administración de 5T4Fab-SEA_{D227A} (Días 1-5, días 29-33) solo o en combinación secuencial con gemcitabina (días 8, 15, 22).

5T4Fab-SEA _{D227A}		18 µg/kg		0 µg/kg		6 µg/kg		18 µg/kg	
Grupo de gemcitabina		0 mg/kg 1		65 mg/kg 2		65 mg/kg 3		65 mg/kg 4	
Nº de animal y sexo		761M	766F	757M	762F	759M	764F	755M	760F
Día	Tiempo (h)	Concentración de 5T4Fab-SEA _{D227A} (µg/l) en plasma							
1	0	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC
	0,083	385	399	< LDC	< LDC	159	158	392	255
	1	284	309	n.a.	n.a.	110	123	293	244
	3	239	276	n.a.	n.a.	70,6	89,0	204	231
	8	97,0	74,9	n.a.	n.a.	25,7	46,6	71,5	200
5	0	21,2	10,2	< LDC	< LDC	3,42	32,2	10,7	255
	0,083	418	399	< LDC	< LDC	156	165	436	590
	1	314	266	n.a.	n.a.	118	142	293	501

5T4Fab-SEA _{D227A} Grupo de gemcitabina		18 µg/kg 0 mg/kg 1		0 µg/kg 65 mg/kg 2		6 µg/kg 65 mg/kg 3		18 µg/kg 65 mg/kg 4	
Nº de animal y sexo		761M	766F	757M	762F	759M	764F	755M	760F
Día	Tiempo (h)	Concentración de 5T4Fab-SEA _{D227A} (µg/l) en plasma							
	3	269	154	n.a.	n.a.	73,2	112	213	434
	8	94,8	57,6	n.a.	n.a.	24,7	70,4	64,9	398
29	0	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC
	0,083	0,82	< LDC	< LDC	< LDC	144	84,8	433	236
	1	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	107	70,8	275	215
	3	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	72,0	50,8	224	179
	8	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	24,9	30,1	70,8	126
33	0	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	1,98	4,10	14,3	57,4
	0,083	< LDC	< LDC	< LDC	< LDC	97,1	48,3	449	542
	1	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	60,7	22,1	312	499
	3	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	24,7	10,8	252	464
	8	< LDC	< LDC	n.a.	n.a.	6,23	5,09	77,7	352

n.a. no analizado

5 En los días 1 y 5 se obtuvieron niveles similares de 5T4Fab-SEA_{D227A} en todos los animales que recibieron 5T4Fab-SEA_{D227A} (grupos 1, 3 y 4). En los días 29 y 33, 5T4Fab-SEA_{D227A} estaba por debajo del LDC (límite de cuantificación, que es 0,5 µg/l) en los animales que recibieron solo 5T4Fab-SEA_{D227A} (grupo 1). Sin embargo, en los días 29 y 33, los niveles de 5T4Fab-SEA_{D227A} en los animales pertenecientes a los grupos 3 y 4 fueron similares a los niveles de 5T4Fab-SEA_{D227A} hallados en los días 1 y 5.

10 Por lo tanto, la combinación de TTS con agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, gemcitabina, dio como resultado niveles disminuidos de anticuerpos anti-superantígeno (anti-sag) después de los ciclos de tratamiento con TTS. Por lo tanto pueden administrarse ciclos de tratamiento con TTS adicionales sin interferencia de anticuerpos anti-sag neutralizantes de título elevado.

REFERENCIAS

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

- 20 Patente de Estados Unidos Nº 4.554.101
- Patente de Estados Unidos Nº 5.220.007
- Patente de Estados Unidos Nº 5.284.760
- Patente de Estados Unidos Nº 5.284.760
- Patente de Estados Unidos Nº 5.354.670
- Patente de Estados Unidos Nº 5.366.878
- Patente de Estados Unidos Nº 5.389.514
- 25 Patente de Estados Unidos Nº 5.399.363
- Patente de Estados Unidos Nº 5.440.013
- Patente de Estados Unidos Nº 5.446.128
- Patente de Estados Unidos Nº 5.466.468
- 30 Patente de Estados Unidos Nº 5.475.085
- Patente de Estados Unidos Nº 5.519.114
- Patente de Estados Unidos Nº 5.543.158
- Patente de Estados Unidos Nº 5.545.716
- Patente de Estados Unidos Nº 5.629.001
- 35 Patente de Estados Unidos Nº 5.561.515
- Patente de Estados Unidos Nº 5.618.914
- Patente de Estados Unidos Nº 5.635.377
- Patente de Estados Unidos Nº 5.641.515
- Patente de Estados Unidos Nº 5.670.155
- 40 Patente de Estados Unidos Nº 5.672.681
- Patente de Estados Unidos Nº 5.674.976
- Patente de Estados Unidos Nº 5.710.245
- Patente de Estados Unidos Nº 5.725.871
- Patente de Estados Unidos Nº 5.728.388
- Patente de Estados Unidos Nº 5.756.353
- 45 Patente de Estados Unidos Nº 5.780.045
- Patente de Estados Unidos Nº 5.792.451
- Patente de Estados Unidos Nº 5.580.579
- Patente de Estados Unidos Nº 5.804.212

- Patente de Estados Unidos N° 5.840.833
 Patente de Estados Unidos N° 5.858.363
 Patente de Estados Unidos N° 5.859.184
 Patente de Estados Unidos N° 5.859.207
 5 Patente de Estados Unidos N° 5.929.237
 Patente de Estados Unidos N° 6.042.837
 Patente de Estados Unidos N° 6.126.945
 Patente de Estados Unidos N° 6.180.097
 Patente de Estados Unidos N° 6.197.299
 10 Patente de Estados Unidos N° 6.221.351
 Patente de Estados Unidos N° 6.251.385
 Patente de Estados Unidos N° 6.338.845
 Patente de Estados Unidos N° 6.340.461
 Patente de Estados Unidos N° 6.399.332
 15 Patente de Estados Unidos N° 6.447.777
 Patente de Estados Unidos N° 6.514.498
 Patente de Estados Unidos N° 6.623.308
 Patente de Estados Unidos N° 6.632.640
 Patente de Estados Unidos N° 6.632.441
 20 Patente de Estados Unidos N° 6.692.746
 Patente de Estados Unidos N° 6.713.284
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040126379
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040142464
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030092894
 25 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030039655
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030124142
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030157113
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030175212
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030144474
 30 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030036644
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030009015
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020142389
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002119149
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020177551
 35 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020141981
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020115190
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020086813
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020058032
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020051765
 40 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020039585
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020028211
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020018781
 Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20010046501
 Publicación Internacional N° WO9201470
 45 Publicación Internacional N° WO9601650
 Publicación Internacional N° WO03002143
 Publicación Internacional N° WO03020763
 Publicación Internacional N° WO04050705
 Publicación Internacional N° WO03002143
 50 Publicación Internacional N° WO9960120
 Publicación Internacional N° WO9960119
 Publicación Internacional N° WO9301303
 Publicación Internacional N° WO8907947
 Solicitud Europea N° 610179
 55 Solicitud Europea N° 766566
 Abrahmsen L., et al. EMBO J. 14:2978-86, 1995.
 Alpaugh R. K., et al. Clin Cancer Res. 4:1903-14, 1998.
 Antonsson P., et al. J Immunol 158:4245-51, 1997.
 Bangham et al., J. Mol. Biol., 13:238-252, 1965.
 60 Bird et al., Science. 21 oct 1988; 242(4877):423-6.
 Bird et al., Science. 242:423-6, 1988.
 Braisted et al, Proc Natl Acad Sci USA. 93(12):5688-92, 1996.
 Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94(2):412-7, 1997.
 Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977.
 65 Cavallin A., et al. J Biol Chem. 275:1665-72, 2000.
 Chan, O.T.M. y Yang, L.-X. (2000) Cancer Immunol. Immunother. 49:181-185.

- Chen (2003) *Expert Opin. Ther. Patents*. 13:1787-1799.
 Cunningham et al., *Science*. 244(4908):1081-5, 1989.
 Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986
 5 Dohlsten, M., et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9287-91.
 Dohlsten, M., et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8495-8949.
 Dohlsten, M., et al., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9791-5.
 DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed. (1979) págs. 287-341.
 Erlandsson et al., (2003) *J Mol Biol*. 333:893-905.
 Forsberg, G., et al., (1997) *J. Biol. Chem*. 272:12430-12436.
 10 Gibbs, T. (2005) *Scientific American*, Ago. 2005, 79-83.
 Gomez, G.G., et al., (2001) *Cancer Treat. Rev*. 27:375-402.
 Hakansson, M. et al. *J Mol Biol*. 302:527-37, 2000.
 Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988.
 Johannesson et al., *J. Med. Chem*. 42:601-608, 1999.
 15 Johannesson et al., *J Med Chem*. 25 de feb de 1999; 42(4):601-8.
 Johnson et al., *Annu Rev Biochem*. 1993; 62:685-713.
 Kaneda et al., *J Biol Chem.*, 264(21):12126-12129, 1989.
 Kato et al., *J Biol Chem.*, 266(6):3361-3364, 1991.
 Laird y Cherrington, (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs* 12(1):51-64.
 20 Le Poole et al., (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs*. 12:971-981.
 Maguire, H.C.J. y Ettore, V.L. (1967) *J. Invest. Dermatol* 48:39-43.
 Marrack y Kappler, *Science*. 1 de junio de 1990; 248(4959):1066.
 Mitchell, M.S: (2003) *Cancer Immunol. Immunother*. 52:686-692.
 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
 25 Papageorgiou A. C. et al. *Trends in Microbiology* 8: 369-375, 2000.
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15ª Edición, Capítulo 61, páginas 1035-1038 y 1570-1580.
 Sambrook et. al., En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., 1989.
 Schad E. M., et al. *EMBO J*. 14:3292-3301, 1995.
 Short et al., *J Biol Chem*. 270(48):28541-50, 1995.
 30 Smith y Rutledge, *Natl Cancer Inst Monogr*. Oct 1975;42:169-72.
 Sundström M, et al. *EMBO J*. 15:6832-40, 1996.
 Sundström M., et al. *J Biol Chem* 271:32212-16, 1996.
 Szoka y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 7,5:4194-4198, 1978.
 Tester y Mora, *Expert Opin Investig Drugs*. Junio de 2001; 10(6): 1021-32.
 35 Ujhazy, P., et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother*. 52:463-472.
 Vita et al., *Biopolymers* 47:93-100, 1998.
 Vita et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 3 de jul de 1995; 92(14):6404-8.
 Warren et al., *Biochemistry* 35(27):8855-62, 1996.
 Weisshoff et al., *Eur J Biochem*. Feb 1999; 259(3):776-88.
 40 Weisshoff et al. *Eur. J. Biochem*. 259:776-788, 1999.
 Wells et al., *Methods*. 10(1):126-34, 1996:
 Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
 Yelton et al., *J Immunol*. 155(4):1994-2004, 1995.
 Young et al., *N Engl J Med*. 7 dic 1978; 299(23):1261-6.
 45 Zagozdzon, R. y Golab, J. (2001) *Int. J. Oncol*. 18:417-424.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Active Biotech AB HEDLUND, Gunnar FORSBERG, Göran WALLÉN-ÖHMAN, Marie
 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS CON SUPERANTÍGENOS EN
 COMBINACIÓN CON OTRO AGENTE ANTICÁNCER
 <130> PC-21020269
 55 <150> SE 0402025-1
 <151> 13-08-2004
 <150> US 60/601.548
 60 <151> 13/08/2004
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.3
 65 <210> 1

ES 2 547 348 T3

<211> 233
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp

5

<400> 1
 Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Arg Asn Ala Leu Ser Asn Leu Arg Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Glu Lys Ala Ile Thr Glu Asn Lys Glu Ser Asp Asp Gln Phe Leu
 35 40 45
 Glu Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr
 50 55 60
 Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Lys Asp Ala Thr Asn Lys Tyr
 65 70 75 80
 Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
 100 105 110
 Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
 115 120 125
 Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
 145 150 155 160
 His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe Gly
 165 170 175
 Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly Ser
 180 185 190
 Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp Thr
 195 200 205
 Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Leu
 210 215 220
 His Ile Asp Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr
 225 230

10

<210> 2
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp

15

<400> 2

ES 2 547 348 T3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
1 5 10 15
Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu
35 40 45
Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr
50 55 60
Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr
65 70 75 80
Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
100 105 110
Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
115 120 125
Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys
130 135 140
Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
145 150 155 160
Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp
165 170 175
Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro
180 185 190
Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr
195 200 205
Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met
210 215 220
His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser
225 230

5 <210> 3
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Proteína quimérica
<400> 3

ES 2 547 348 T3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ser Ser Glu Lys Ser Ala Asp Gln Phe Leu
 35 40 45
 Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr
 50 55 60
 Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
 100 105 110
 Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
 115 120 125
 Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
 145 150 155 160
 His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe Gly
 165 170 175
 Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly Ser
 180 185 190
 Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp Thr
 195 200 205
 Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ser Ser Thr Ser Leu
 210 215 220
 Ser Ile Ser Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr
 225 230

- 5 <210> 4
- <211> 233
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- < 223> Proteína mutada
- <400> 4

ES 2 547 348 T3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
1 5 10 15
Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu
35 40 45
Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr
50 55 60
Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr
65 70 75 80
Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
100 105 110
Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
115 120 125
Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys
130 135 140
Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
145 150 155 160
Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp
165 170 175
Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro
180 185 190
Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr
195 200 205
Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met
210 215 220
His Ile Ala Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser
225 230

- 5 <210> 5
- <211> 679
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Proteína conjugada
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 15 <222> (460)..(679)
- <223> Cadena ligera
- <400> 5

ES 2 547 348 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Tyr Ile Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Pro Tyr Gly Tyr Asp Glu Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125
 Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val

ES 2 547 348 T3

130		135		140											
Thr 145	Leu	Gly	Cys	Leu	Val 150	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro 155	Glu	Pro	Val	Thr	Val 160
Thr	Trp	Asn	Ser	Gly 165	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly 170	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala 175
Val	Leu	Gln	Ser 180	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu 185	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro 190
Ser	Ser	Thr 195	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr 200	Val	Thr	Cys	Asn	Val 205	Ala	His	Pro
Ala	Ser 210	Ser	Thr	Lys	Val	Asp 215	Lys	Lys	Ile	Val	Pro 220	Arg	Asp	Ser	Gly
Gly 225	Pro	Ser	Glu	Lys	Ser 230	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu 235	Lys	Asp	Leu	Arg	Lys 240
Lys	Ser	Glu	Leu	Gln 245	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly 250	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile 255	Tyr
Tyr	Tyr	Asn	Glu 260	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu 265	Asn	Lys	Glu	Ser	His 270	Asp	Gln
Phe	Leu	Gln 275	His	Thr	Ile	Leu	Phe 280	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr 285	Asp	His	Ser
Trp	Tyr 290	Asn	Asp	Leu	Leu	Val 295	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys 300	Asp	Ile	Val	Asp
Lys 305	Tyr	Lys	Gly	Lys	Lys 310	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly 315	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr 320
Gln	Cys	Ala	Gly	Gly 325	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr 330	Ala	Cys	Met	Tyr	Gly 335	Gly
Val	Thr	Leu	His 340	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu 345	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys 350	Val	Pro
Ile	Asn	Leu 355	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys 360	Gln	Asn	Thr	Val	Pro 365	Leu	Glu	Thr
Val	Lys 370	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn 375	Val	Thr	Val	Gln	Glu 380	Leu	Asp	Leu	Gln
Ala 385	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gln 390	Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu 395	Tyr	Asn	Ser	Asp	Val 400
Phe	Asp	Gly	Lys	Val 405	Gln	Arg	Gly	Leu	Ile 410	Val	Phe	His	Thr	Ser 415	Thr

ES 2 547 348 T3

Glu Pro Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser
 420 425
 Asn Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu
 435 440
 Asn Met His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser Asp Ile Val Met Thr
 450 455 460
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met
 465 470 475 480
 Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Asn Gln Lys Asn
 485 490 495
 Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 500 505 510
 Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr
 515 520 525
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln
 530 535 540
 Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Val Tyr Pro
 545 550 555 560
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala
 565 570 575
 Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 580 585 590
 Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 595 600 605
 Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 610 615 620
 Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 625 630 635 640
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 645 650 655
 Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 660 665 670
 Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 675

<210> 6
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína mutada y conjugada

<220>
 <221> MISC_FEATURE

5

10

ES 2 547 348 T3

<222> (459)..(672)
 <223> Cadena ligera

<400> 6

5

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

ES 2 547 348 T3

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Ser Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys
 225 230 235 240
 Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe
 260 265 270
 Leu Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp
 275 280 285
 Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys
 290 295 300
 Tyr Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln
 305 310 315 320
 Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val
 325 330 335
 Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile
 340 345 350
 Asn Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val
 355 360 365
 Lys Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala
 370 375 380
 Arg Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe
 385 390 395 400
 Asp Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu
 405 410 415
 Pro Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn
 420 425 430
 Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn
 435 440 445
 Met His Ile Ala Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser Ser Ile Val Met Thr Gln
 450 455 460
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 465 470 475 480
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln

ES 2 547 348 T3

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

<210> 7

5

<211> 672

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Proteína conjugada

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (449)..(672)

15

<223> Cadena ligera

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 ser val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

20

ES 2 547 348 T3

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Ser Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys
 225 230 235 240
 Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Tyr Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ser Ser Glu Lys Ser Ala Asp Gln Phe
 260 265 270
 Leu Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp
 275 280 285
 Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu
 290 295 300

ES 2 547 348 T3

Tyr Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln
 305 310 315 320
 Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val
 325 330 335
 Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile
 340 345 350
 Asn Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val
 355 360 365
 Lys Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala
 370 375 380
 Arg His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly
 405 410 415
 Ser Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp
 420 425 430
 Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ser Ser Thr Ser
 435 440 445
 Leu Ser Ile Ser Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr Ser Ile Val Met Thr Gln
 450 455 460
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 465 470 475 480
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 485 490 495
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg
 500 505 510
 Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp
 515 520 525
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr
 530 535 540
 Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 545 550 555 560
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 565 570 575

ES 2 547 348 T3

```

3652 GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCcgggatctgctgcccactaac 3711
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGTTTTGCTGTGGGGGTAGACAGATAGGTGACCGggccctagacgacgggtttgattg

a      A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N -

3712 tccatggTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC 3771
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
agGTACCCTGGGACCCTACGGACCAGTTCCTGATAAAGGGACTCGGTCACTGTCACCTGG

a      S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T -

3772 TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCCTGCAGTCTGAC 3831
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTTGAGACCTAGGGACAGGTGCGCCACACGTGTGGAAGGGTTCGACAGGACGTCAGACTG

a      W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D -

3832 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC 3891
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATGTGAGACTCGTCGAGTCACTGACAGGGGAGGTCGTGGACCGGGTTCGCTCTGGCAG

a      L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V -

3892 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG 3951
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGACGTTGCAACGGGTGGCCGGTCTGTCGTGGTCCACCTGTTCCTTTAACACGGGTCC

a      T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R -

3952 GACTcgGGcgggtccgAGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATGAAAAAGATTTGCGAAAAAAG 4011
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTgAgcCCgcccaggctCGCTCTTTTCGCTTCTTTATTTACTTTTCTAAACGCTTTTTTC

a      D S G G P S E K S E E I N E K D L R K K -

4012 TCTGAATTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAACAAATCTATTATTACAATGAAAAA 4071
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACTTAACGTCCCTTGTGAAATCCGTTAGAAATTTGTTTAGATAATAATGTTACTTTTT

a      S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N E K -

4072 GCTAAAACGAAAATAAAGAGAGTCAAGATCAATTTTTACAGCATACTATATTGTTTAAA 4131
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATTTTGACTTTTATTTCTCTCAGTGCTAGTTAAAAATGTCGTATGATATAACAAATTT

a      A K T E N K E S H D Q F L Q H T I L F K -

4132 GGCTTTTTTACAGATCATTGCGGTATAACGATTTATTAGTAGATTTTGATTCAAAGGAT 4191
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGAAAAAATGTCTAGTAAGCACCATATTGCTAAATAATCATCTAAAACCTAAGTTTCCTA

a      G F F T D H S W Y N D L L V D F D S K D -

4192 ATTGTTGATAAATATAAAGGGAAAAAAGTAGACTTGTATGGTGCTTATTATGGTTATCAA 4251
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACAACCTATTATATTTCCCTTTTTCATCTGAACATACCACGAATAATACCAATAGTT

a      I V D K Y K G K K V D L Y G A Y Y G Y Q -

4252 TGTGCGGGTGGTACACCAAAACAAACAGCTTGTATGTATGGTGGTGAACGTTACATGAT 4311
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACGCCACCATGTGGTTTGTGTTTGTGGAACATACATACCACCACATTGCAATGTACTA

a      C A G G T P N K T A C M Y G G V T L H D -

4312 AATAATCGATTGACCGAAGAGAAAAAAGTGCCGATCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAA 4371
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTATTAGCTAACTGGCTTCTCTTTTTTTCACGGCTAGTTAAATACCGATCTGCCATTTGTT

```

ES 2 547 348 T3

```

a      N N R L T E E K K V P I N L W L D G K Q -
4372  AATACAGTACCTTTGGAACGGTTAAAACGAATAAGAAAAATGTAAGTTCAGGAGTTG 4431
      TTATGTCATGGAAACCTTTGCCAATTTGCTTATTCTTTTACATTGACAAGTCCCTCAAC
a      N T V P L E T V K T N K K N V T V Q E L -
4432  GATCTTCAAGCAAGACGTTATTTACAGGAAAAATATAATTTATATAACTCTGATGTTTTT 4491
      CTAGAAGTTCGTTCTGCAATAAATGTCCTTTTTATATTAATATATTGAGACTACAAAAA
a      D L Q A R R Y L Q E K Y N L Y N S D V F -
4492  GATGGGAAGGTTTCAGAGGGGATTAATCGTGTTCATACCTTCTACAGAACCTTCGGTTAAT 4551
      CTACCCCTTCCAAGTCTCCCTAATTAGCACAAAGTATGAAGATGCTTGGGAAGCCAATTA
a      D G K V Q R G L I V F H T S T E P S V N -
4552  TACGATTTATTTGGTGCTCAAGGACAGTATCAAATACACTATTAAGAATATATAGAGAT 4611
      ATGCTAAATAAACCCACGAGTTCCTGTCATAAGTTTATGTGATAAATCTTATATATCTCTA
a      Y D L F G A Q G Q Y S N T L L R I Y R D -
4612  AATAAAACGATTAAGTCTGAAAACATGCATATTGCTATATATTTATATACTagttaataa 4671
      TTATTTTGCTAATTGAGACTTTTGTACGTATAACgATATATAAATATATGatcaattatt
a      N K T I N S E N M H I A I Y L Y T S * * -
4672  gaattaagcttggcgtatagggcactttacaataacatacagggggtattaatTTGAAA 4731
      ctttaattcgaaccggcatatccgggtgaaatgtttatgtatgtcccccataattaACTTT
a
4732  AAGACCATGGCACTCATCCTTGCGTCTATTCTTGTTTTTTCTTTGGTAACCAATGCATAC 4791
      TTCTGGTACCGTGAGTAGGAACGCAGATAAGAACAACAAAAAGAAACCATTGGTTACGTATG
4792  GCGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCactagtCTGCTTGTTCAGCAGGAGACAGGGTT 4851
      CGCTCATAACACTACTGGGTCTGAGGGTgatcaGACGAACAAAGTCGTCTCTGTCCCAA
a      S I V M T Q T P T S L L V S A G D R V -
4852  ACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAG 4911
      TGGTATTGGACGTTCCGGTCAGTCTCACACTCATTACTACATCGAACCATGGTTGTCTTC
a      T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K -
4912  CCAGGGCAGTCTCCTAagCTGCTCATATCCTATACATCCAGTCGCTACGCTGGAGTCCCT 4971
      GGTCCCGTCAGAGGATtcGACGAGTATAGGATATGTAGGTCAGCGATGCGACCTCAGGGA
a      P G Q S P K L L I S Y T S S R Y A G V P -
4972  GATCGCTTCagcGGCAGTGGgTccGGGACGGATTTCACTcTgACgATatCCAgTgTaCAG 5031
      CTAGCGAAGTcgCCGTACCCAggCCCTGCCTAAAGTGAgACTGCTATagGTcACATGTC

```

ES 2 547 348 T3

```

a      D R F S G S G S G T D F T L T I S S V Q -
5032  GCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTGTCAGCAAGATTATAATTCTCCTCCGACGTTCCGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACTTCTGGACCGTCAAATAAAGACAGTCGTTCTAATATTAAGAGGAGGCTGCAAGCCA 5091
a      A E D L A V Y F C Q Q D Y N S P P T F G -
5092  GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCGGCgCCAAGTGTATCCATCTTCCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCCGTTGGTTCGACCTTTAGTTTGCCCGACTACGCCGCGGTTGACATAGGTAGAAGGGT 5151
a      G G T K L E I K R A D A A P T V S I F P -
5152  CCATCCagtgcagcagttAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTAGGtcactcgtcaaTTGTAGACCTCCACGGAGTCAGCACACGAAGAACTTGTGAAG 5211
a      P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F -
5212  TACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGGGTTTTCTGTAGTTACAGTTCACCTTCTAACTACCGTCACTTGCTGTTTTACCGCAG 5271
a      Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V -
5272  CTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTGTCAACCTGACTAGTCTGTGCTTTCTGTGCTGGATGTGCTACTCGTCTGTTGGGAG 5331
a      L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L -
5332  ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAACTGGTTCCTGCTCATACTTGTGTATTGTGCGATATGGACACTCCGGTGAGTGTTC 5391
a      T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K -
5392  ACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACcGtaATGAG 5433
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTAGTTGAAGTGGGTAACAGTTCTCGAAGTTGgCaTTACTC

```

<210> 9
 <211> 5621
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp (C215FabSEA)

5

<400> 9

```

3459  CAGGTcCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCAgGTTGACGTCGTCGGACCCCGACTTGACCACTCCGGACCCCGAAGTCACTTCGAC 3518
a      Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L -
3519  TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATAAaCTGGGTGAAGCAGAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACGTTCCGAAGACCGATGTGGAAGTGGTTGATGACCTATTtGACCCACTTCGTCTCC 3578
a      S C K A S G Y T F T N Y W I N W V K Q R -
3579  CCTGGaCAAGGCCTTGAGTGGaTCGGAAATATTTATCCTTCTTATATTTATACTAACTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACctGTTCCGGAAGTCACTAGCCTTTATAAATAGGAAGAATATAAATATGATTGATG 3638

```

10

ES 2 547 348 T3

```

a      P G Q G L E W I G N I Y P S Y I Y T N Y -
3639  AATCAAGAGTTCAAGGACAAGGTCACATTGACTGTAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTAC 3698
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTAGTTCTCAAGTTCTGTTCAGTGTAAGTGCATCTGCTTAGGAGGTCGTGTCGGATG

a      N Q E F K D K V T L T V D E S S S T A Y -
3699  ATGCAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCCCT 3758
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TACGTCGAGTCGTGCGGGCTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATAATGACATGTTCTAGGGGA

a      M Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R S P -
3759  TATGGTTACGACGAGTATGGTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC 3818
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ATACCAATGCTGCTCATACCAGACCTGATGACCCAGTTCCCTGGAGTCAGTGGCAGAGG

a      Y G Y D E Y G L D Y W G Q G T S V T V S -
3819  TCAGCCAAAACAACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCgggatctgctgcccact 3878
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      AGTCGGTTTTTGTGTgGGGTAGaCAGATAGGTGACCGGGgcccctagacgacgggttga

a      S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T -
3879  aactccatGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTG 3938
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ttgagGTACCACTGGGACCCTACGGACCAGTTCCCGATAAAGGGACTCGGTCACTGTAC

a      N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V ~
3939  ACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTGCAGTCT 3998
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TGGACCTTGAGACCTAGGGACAGGTGCGCCACACGTGTGGAAGGGTCGACAGGACGTCAGA

a      T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S -
3999  GACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACC 4058
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CTGGAGATGTGAGACTCGTCGAGTCACTGACAGGGGAGGTGCTGGACCGGGTCGCTCTGG

a      D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T -
4059  GTCACCTGCAACGTTGCCACCCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCC 4118
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CAGTGGACGTTGCAACGGGTGGGCCGGTCTGCTGTTCCACCTGTCTTTTAAACACGGG

a      V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P -
4119  AGGGACTcgGGcgggtccgAGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATGAAAAAGATTTGCGAAAA 4178
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TCCCTgAgCCCgccaggeTCGCTCTTTTCGCTTCTTTATTTACTTTTTCTAAACGCTTTT

a      R D S G G P S E K S E E I N E K D L R K -
4179  AAGTCTGAATTGCAGGGAACAGCTTAGGCAATCTTAAACAAATCTATTATTACAATGAA 4238
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTCAGACTTAACGTCCCTTGTGCGAAATCCGTTAGAAATTTGTTTAGATAATAATGTTACTT

a      K S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N E -
4239  AAAGCTAAAACCTGAAAATAAAGAGAGTCAACGATCAATTTTTACAGCATACTATATTGTTT 4298
      +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTTGATTTTGACTTTTTATTTCTCTCAGTGCTAGTTAAAAATGTCGTATGATATAACAAA

a      K A K T E N K E S H D Q F L Q H T I L F ~

```


ES 2 547 348 T3

```

3292 GAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA 3351
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCAGGTCGAAGTCGTCAGACCTGGACTGGACCACTTCGGACCCCGAAGTCACTTCTAT
a   E V Q L Q Q S G P D L V K P G A S V K I -

3352 TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAGCAGAGC 3411
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACGTTCCGAAGACCAATGAGTAAGTGACCGATGATGTACGTGACCCACTTCGTCTCG
a   S C K A S G Y S F T G Y Y M H W V K Q S -

3412 CcgGGAAAagGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTACTCTCTAC 3471
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GgcCCCTTtccGGAACCTCACCTAACCTGCATAATTAGGATTGTTACCACAATGAGAGATG
a   P G K G L E W I G R I N P N N G V T L Y -

3472 AACCAGAAATTCAAGGACAAGGCCACgTTAACTGTAGACAAGTCATCCACCACAGCCTAC 3531
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGTCITTAAGTTCCTGTTCCGGTgCAATTGACATCTGTTCAGTAGGTGGTGTCCGGATG
a   N Q K F K D K A T L T V D K S S T T A Y -

3532 ATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTACT 3591
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTCGAGGCGTCCGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATAATGACACGTTCTAGATGA
a   M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R S T -

3592 ATGATTACGAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGgGACgTCAGTCACCGTCTCCTCA 3651
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTAATGCTTGATACAATACCTGATGACCCCAAGTTCcctGcAGTCAGTGGCAGAGGAGT
a   M I T N Y V M D Y W G Q G T S V T V S S -

3652 GCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCcgggatctgctgccccaaactaac 3711
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGTTTTGCTGTGGGGTAGACAGATAGGTGACCCGGgcccctagacgacgggtttgatg
a   A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N -

3712 tccATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC 3771
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
agGTACCACTGGGACCCTACGGACCAGTTCcCGATAAAGGGACTCGGTCACTGTCACTGG
a   S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T -

3772 TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGAC 3831
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTTGAGACCTAGGGACAGGTCGCCACACGTGTGGAAGGGTCGACAGGACGTCAGACTG
a   W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D -

3832 CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCcAGCGAGACCGTC 3891
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

ES 2 547 348 T3

```

GAGATGTGAGACTCGTCGAGTCACTGACAGGGGAGGTCGTGGACCGGGTCGCTCTGGCAG
a   L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V -
3892 ACCTGCAACGTTGCCACCCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG 3951
      TGGACGTTGCAACGGGTGGGCCGGTCGTCGTGGTTCACCTGTTCTTTAAACACGGGTCC
a   T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R -
3952 GACTcgGGGcgggtccgtccgagaagagcgaagaataaatgaaaaagATCTGCGAAAAAAG 4011
      CTgAgcCCgccaggcaggctcttctcgcttcttttacttttttCTAgACGCTTTTTTC
a   D S G G P S E K S E E I N E K D L R K K -
4012 TCTGAGctCCAAGGTACCGCCCTAGGCAATCTtAAgCAAATTTATTATTATAATagcAAA 4071
      AGACTcgAgGTTCCATGGCGGGATCCGTTAGAAATTcGTTTAAATAATAATATTAtcgTTT
a   S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N S K -
4072 GCTATAACTagcAgCgAAaAGAGTgCgGATCAGTTTctcacGAATACTTTGTTATTAAAA 4131
      CGATATTGATcgTcGcTTtTCTCACgcCTAGTCAAAGAgTgCTTATGAAACAATAAATTT
a   A I T S S E K S A D Q F L T N T L L F K -
4132 GGTTTTTTTCACAGGTcATCCATGGTATAACGACTTACTAGTgGATCTTGGTTCAACCgCg 4191
      CCAAAAAAGTGTCCAGTAGGTACCATATTGCTgAATgATCacCTAGAACCAAGTTggCgc
a   G F F T G H P W Y N D L L V D L G S T A -
4192 GCTACTAgcGAAATATgAAGGGAgTAgTGTAGAtcTATATGGTGCTTATTATGGATATCAA 4251
      CGATGATcgCTTATAcTTCCCTcaTcaCATCTAgATATACCACGAATAATACCTATAGTT
a   A T S E Y E G S S V D L Y G A Y Y G Y Q -
4252 TGTGCTGGAGGCACACCAAATAAAACAGCATGTATGTACGGGGGTGTAACATTACATGAT 4311
      ACACGACCTCCGTGTGGTTTATTTTGTGCTACATACATGCCCCACATTGTAATGTACTA
a   C A G G T P N K T A C M Y G G V T L H D -
4312 AATAATCGATTGACCGAAGAAAAAAGTACCAATTAAC TTGTGGATAGACGGAAAAACAA 4371
      TTATTaGCTAACTGGCTTCTTTTTTTTCATGGTTAATTGAACACCTAICTGCCITTTGTT
a   N N R L T E E K K V P I N L W I D G K Q -
4372 ACTACAGTACCTATAGATAAAGTTAAAAACAAGCAAAAAAGAAGTAAC TTTCAAGAGCTA 4431
      TGATGTCATGGATATCTATTTCAATTTTGTTCGTTTTTTCTTCATTGACAAGTTCTCGAT
a   T T V P I D K V K T S K K E V T V Q E L -
4432 GACCTTCAGGCgCGcCATTATTTACACGGAAAAATTTGGTTTATATAACTCAGACAGCTTT 4491
      CTgGAAGTCCGcGcGTAATAATGTGCTTTTTAAACCAATATATTGAGTCTGTcGAAA
a   D L Q A R H Y L H G K F G L Y N S D S F -
4492 GCGGTAAGGTGCAAAGAGGCTTGATTGTGTTTcATTCTTCTGAAGGGTCCACGGTAAGT 4551
      CCGCCATTCCACGTTTCTCCGAAC TAACAAAAGTAAGAAGACTTCCCAGGTGCCATTCA
a   G G K V Q R G L I V F H S S E G S T V S -

```

ES 2 547 348 T3

```

4552 TATGATTTGTTTGGATGCTCAAGGGCAATATCCAGATACATTAActCCGgattTACAGAGAT 4611
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATACTAAACAAACTACGAGTTCCCGTTATAGGTCTATGTAATgAGGCctaaATGTCTCTA

a      Y D L F D A Q G Q Y P D T L L R I Y R D -

4612 AATaccACTATTtCGTctacGagCCTCagcATTAgCTTGTATTTgTACACAACtTAagc 4670
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTATggTGATAAagcAGatgCtcGGAGtcgTAAatcgAACATAAACATGTGTTGAATtCG

a      N T T I S S T S L S I S L Y L Y T T * -

4732 CACTCATCCtTGCgTCTATTCTTGTTTTTCTTTGGTAACCAATGCATACGCGAGTATTG 4791
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGAGTAGGAACGCAGATAAGAACAaaaaAGAAACCATTGGTTACGTATGCGCTCATAAC

c                                          S I V -

4792 TGATGACCCAGACTCCCACTagTCTGCTTGTtTctGCAGGAGACAGGGTTACCATAACCT 4851
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTACTGGGTCTGAGGGTgatcaGACGAACAAAGaCGTCCTCTGTCCCAATGGTATTGGA

c      M T Q T P T S L L V S A G D R V T I T C -

4852 GCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGT 4911
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTTCCGGTCAGTCTCACTCATTACTACATCGAACCATGGTGTCTTCCGGTCCCGTCA

c      K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q S -

4912 CTCCTAagCTGCTCATATCCTATACATCCAGTCGCTACGCTGGAGTCCCTGATCGCTTCA 4971
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGATtCGACGAGTATAGGATATGTAGGTcAGCGATGCGACCTCAGGGACTAGCGAAGT

c      P K L L I S Y T S S R Y A G V P D R F S -

4972 gcGGCAGTGGgTacGGGACGGATTTCACTcTgACgATatcCAgTgTaCAGGCTGAAGACg 5031
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
cgCCGTCACCCatgCCCTGCCTAAAGTGAgACTGcTatagGTcACatGTCCGACTTCTGc

c      G S G Y G T D F T L T I S S V Q A E D A -

5032 caGcAGTTTATTTCTGTcAGCAAGATTATAATTCTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCA 5091
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gtCGTCAAATAAAGACAGTCGTTCTAATATTAAGAGGAGGCTGCAAGCCACCTCCGTGGT

c      A V Y F C Q Q D Y N S P P T F G G G T K -

5092 AGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCGGcGCCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCagtg 5151
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCGACCTTTAGTTTGCCTGACTACGCCGCGGTTGACATAGGTAGAAGGGTGGTAGGtcac

c      L E I K R A D A A P T V S I F P P S S E -

5152 agcagttAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACtTCTACCCCAAAG 5211
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tcgtcaaTTGTAGACCTCCACGGAGTCAGCACACGAAGAActTGTGAAGATGGGGTTTC

c      Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D -

5212 ACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTT 5271
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTAGTTACAGTTCACCTTCTAACTACCGTCACTTGTCTGTTTTACCGCAGGACTTGTCAA

c      I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W -

GGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCA

```

ES 2 547 348 T3

```
5272 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5331
      CCTGACTAGTCCTGTCGTTTTCTGTCGTGGATGTCGTA CTGTCGTGGGAGTGCAACTGGT
c      T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K -
      AGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTT
5332 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5391
      TCCTGCTCATACTTGCTGTATTGTCGATATGGACACTCCGGTGAGTGTTCTGTAGTTGAA
c      D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S -
      CACCCATTGTCAAGAGCTTCAACCGTAATGAG
5392 -----+-----+-----+-----+ 5423
      GTGGGTAACAGTTCTCGAAGTTGgCaTTACTC
c      P I V K S F N R N E -
25564709.1      - 27 -
```

REIVINDICACIONES

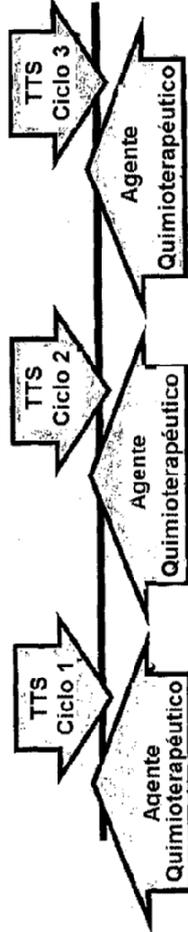
- 5 1. El uso de un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para la producción de una preparación farmacéutica para reducir la respuesta de un anticuerpo al superantígeno dirigido a tumores en un mamífero en comparación con la administración del superantígeno solo, a la vez que no se inhibe o incluso se potencia la respuesta de células T del superantígeno dirigido a tumores en el mamífero, donde dicha preparación farmacéutica es para el tratamiento del cáncer.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fármaco citostático se selecciona entre el grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, antibióticos antitumorales y compuestos basados en platino.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco citostático es un agente alquilante seleccionado entre el grupo que consiste en busulfán, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, carmustina y lomustina.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco citostático es un antimetabolito seleccionado entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, gemcitabina y pemetrexed.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco citostático es un antibiótico antitumoral seleccionado entre el grupo que consiste en doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina, actinomicina D y bleomicina.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco citostático es un inhibidor de la mitosis seleccionado entre el grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina y etopósido.
- 30 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco citostático es un compuesto basado en platino seleccionado entre el grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata.
- 35 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el mamífero es un ser humano.
- 40 10. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso en el tratamiento del cáncer, donde la administración combinada del superantígeno dirigido a tumores y del fármaco citostático reduce una respuesta de anticuerpos al superantígeno dirigido a tumores en un mamífero en comparación con la administración del superantígeno solo, a la vez que no se inhibe o incluso se potencia la respuesta de células T del superantígeno dirigido a tumores en el mamífero.
- 45 11. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el fármaco citostático se selecciona entre el grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, antibióticos antitumorales y compuestos basados en platino.
- 50 12. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fármaco citostático es un agente alquilante seleccionado entre el grupo que consiste en busulfán, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, carmustina y lomustina.
- 55 13. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fármaco citostático es un antimetabolito seleccionado entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo, gemcitabina y pemetrexed.
- 60 14. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fármaco citostático es un antibiótico antitumoral seleccionado entre el grupo que consiste en doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina, actinomicina D y bleomicina.
- 65 15. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fármaco citostático es un inhibidor de la mitosis seleccionado entre el grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina y etopósido.
16. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el fármaco citostático es un compuesto basado en platino seleccionado entre el grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

17. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-16, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, de mama, de colon, de riñón, pancreático, de ovario, de estómago, de cuello de útero y de próstata.

5

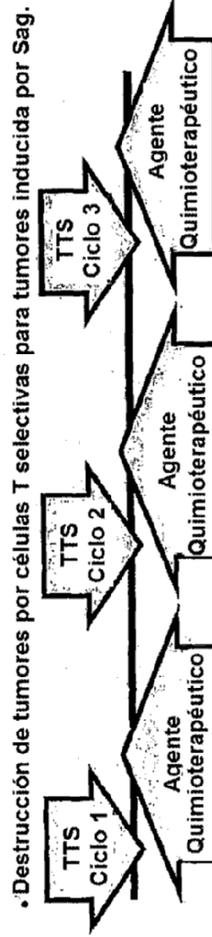
18. Un superantígeno dirigido a tumores que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 y un fármaco citostático para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-17, en el que el mamífero es un ser humano.

A Agente quimioterápico / Estrategia de tratamiento TTS
Inflamación por células T selectiva inducida por Sag e inflamación y destrucción de tumores por células T selectiva para tumores inducidos por Sag



- Inhibición de respuesta de células B selectiva de Sag.
- Efecto antitumoral citostático directo.

B TTS / Estrategia de tratamiento de agente quimioterápico



- Destrucción de tumores por células T selectivas para tumores inducida por Sag.
- Inhibición de respuesta de células B selectiva de Sag.
- Efecto antitumoral citostático directo.

FIG. 1

Agente quimioterapéutico / Estrategia de tratamiento TTS

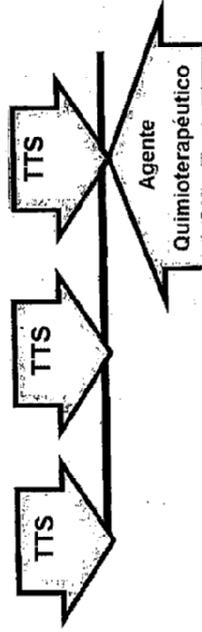
C. Destrucción de tumores por células T selectivas para tumores inducida por Sag



- Inhibición de respuesta de células B selectiva de Sag.
- Efecto antitumoral citostático directo

Agente quimioterapéutico / Estrategia de tratamiento TTS

D. Destrucción de tumores por células T selectivas para tumores inducida por Sag.



- Inhibición de respuesta de células B selectiva de Sag.
- Efecto antitumoral citostático directo

FIG. 1

TTS / Estrategia de tratamiento de agente quimioterapéutico (La variante 4/1)

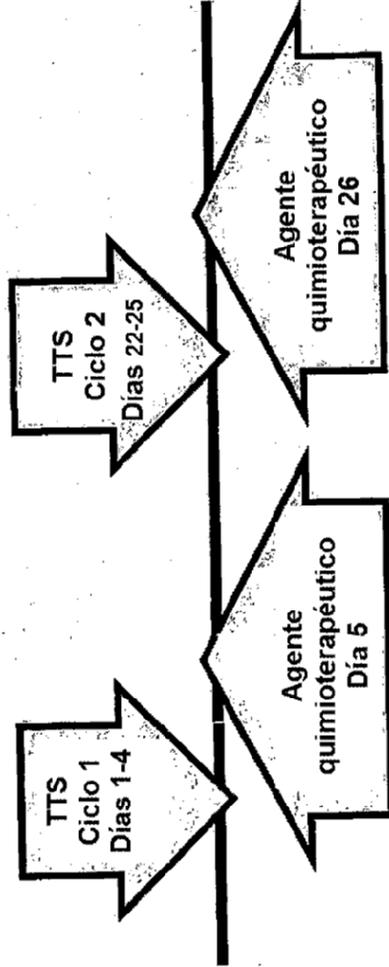


FIG. 2

	A	B	
SEA/E-120	SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYNSKAITSEKSAEQFLNTLLFKGFFTG		60
SEE	SEKSEINEKDLRKKSELQRNALSNLRQIYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTG		60
SEA	SEKSEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYNEKAKTENKESHQDFLQHTILFKGFFTD		60
	*****	*****	*****
	C		
SEA/E-120	HPWYNDLLVDLGSTAAATSEYEGSSVDLYGAYVYQCAGGTPNKTCMYGGVTLHDNRRLT		120
SEE	HPWYNDLLVDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYVYQCAGGTPNKTCMYGGVTLHDNRRLT		120
SEA	HSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYVYQCAGGTPNKTCMYGGVTLHDNRRLT		120
	*****	*****	*****
SEA/E-120	EEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		180
SEE	EEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		180
SEA	EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTKNKNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFDGKVQ		180
	*****	*****	*****
	D	E	
SEA/E-120	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQYPTLLRIYRDN ^T TISSTLSISL ^L LYTT		233
SEE	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQYPTLLRIYRDN ^T INSENHIDL ^L LYTT		233
SEA	RGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQYSNTLLRIYRDN ^T INSENHIDI ^L LYTS		233
	*****	*****	*****

FIG. 3

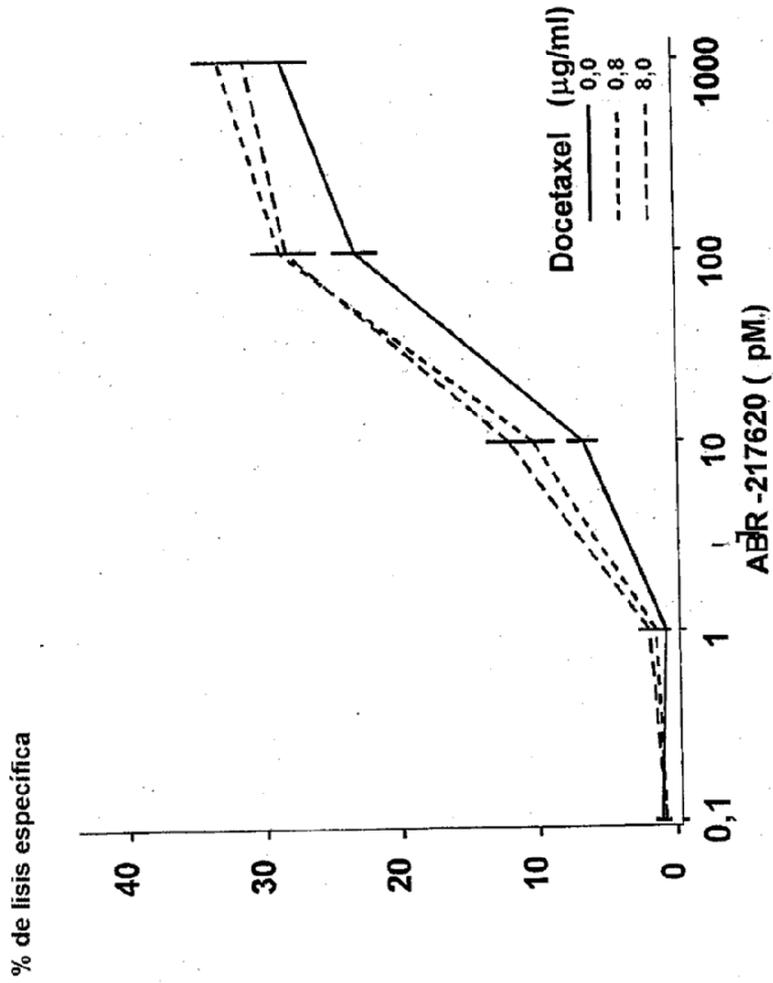


FIG. 4

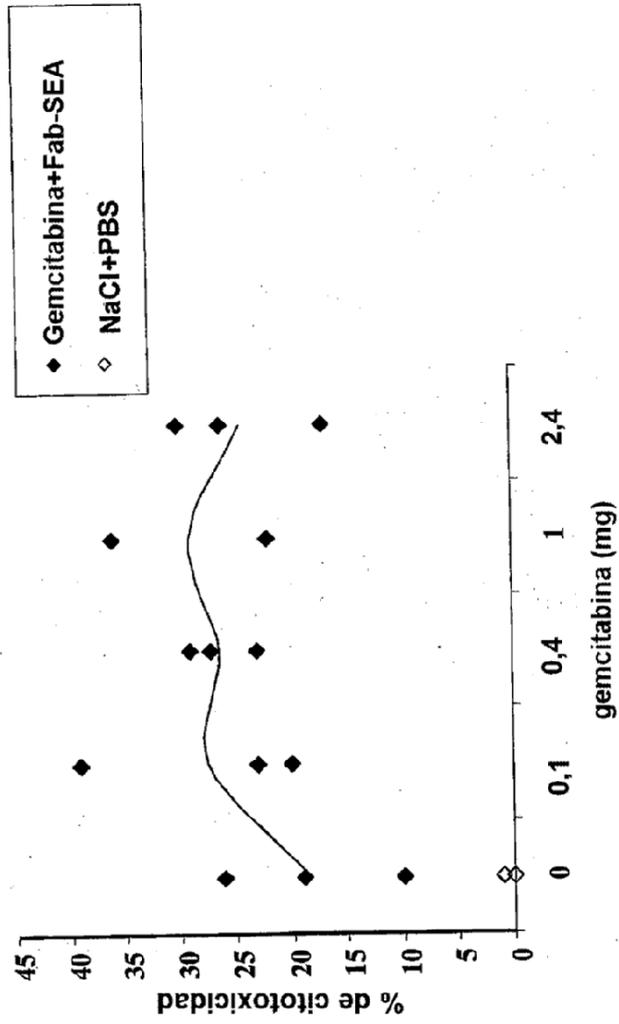


FIG. 5

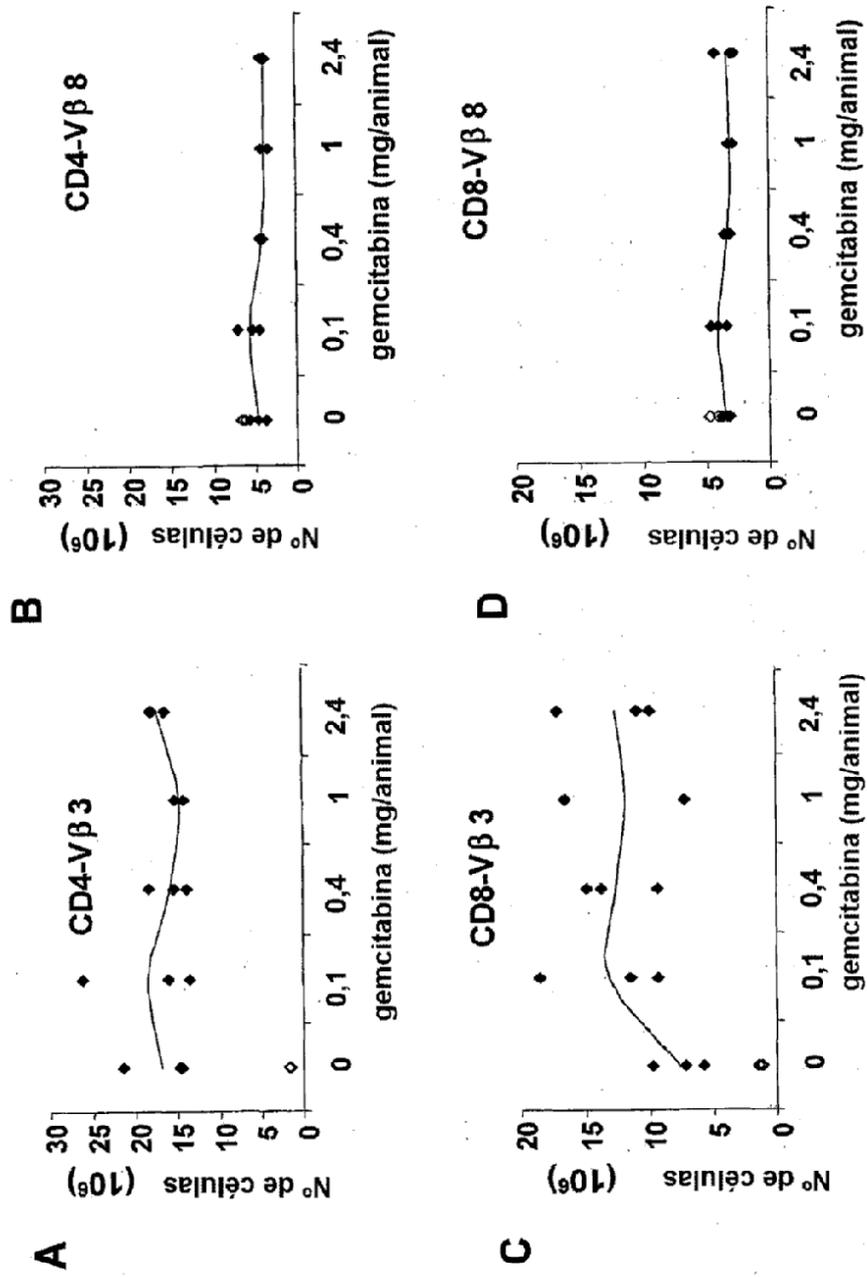


FIG. 6

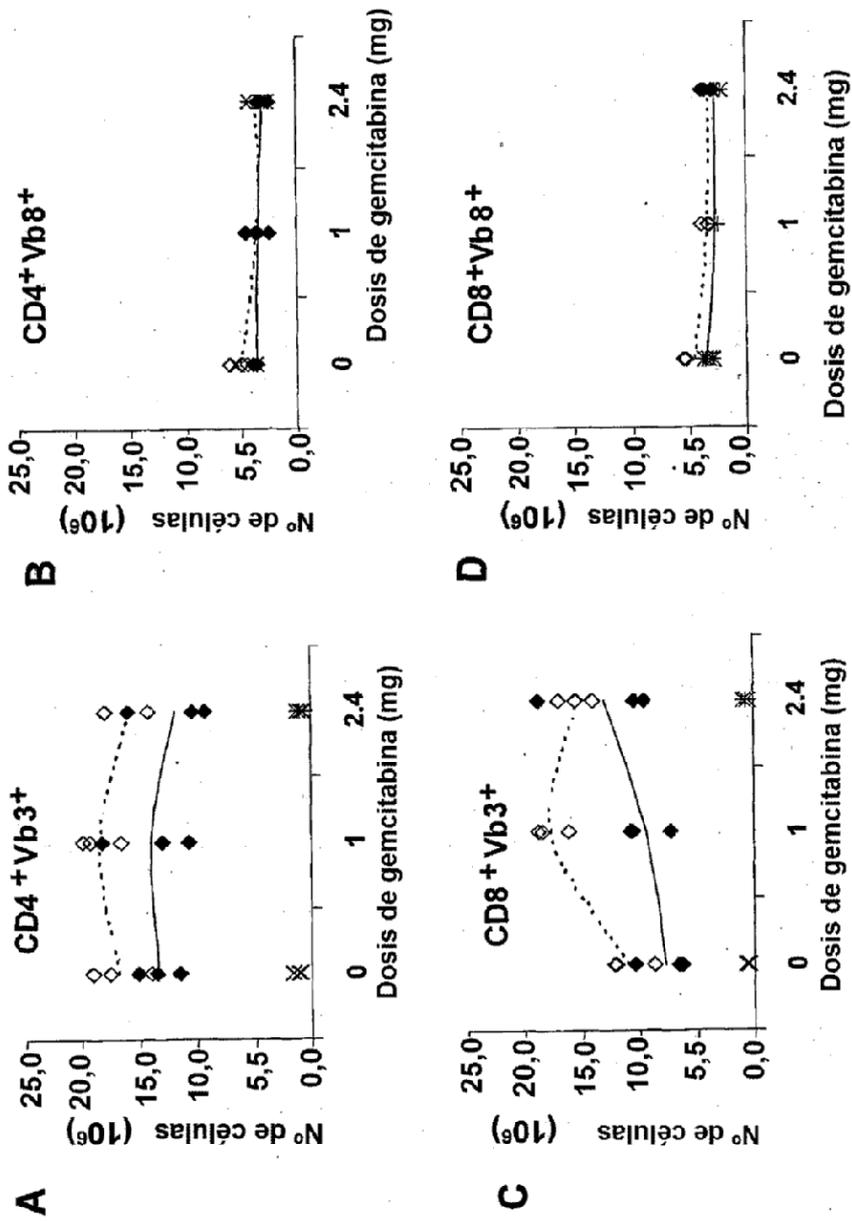


FIG. 7

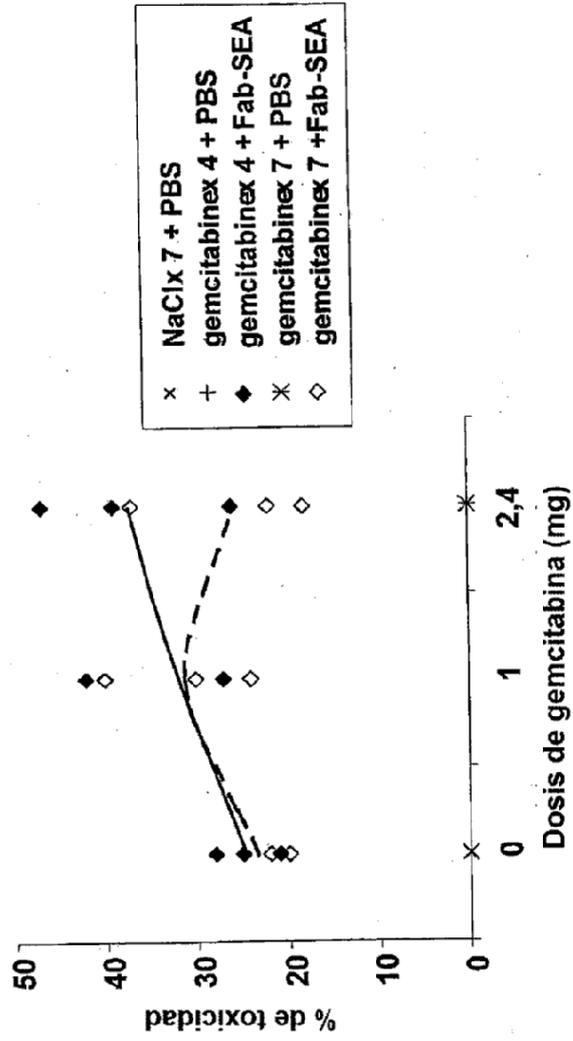


FIG. 8

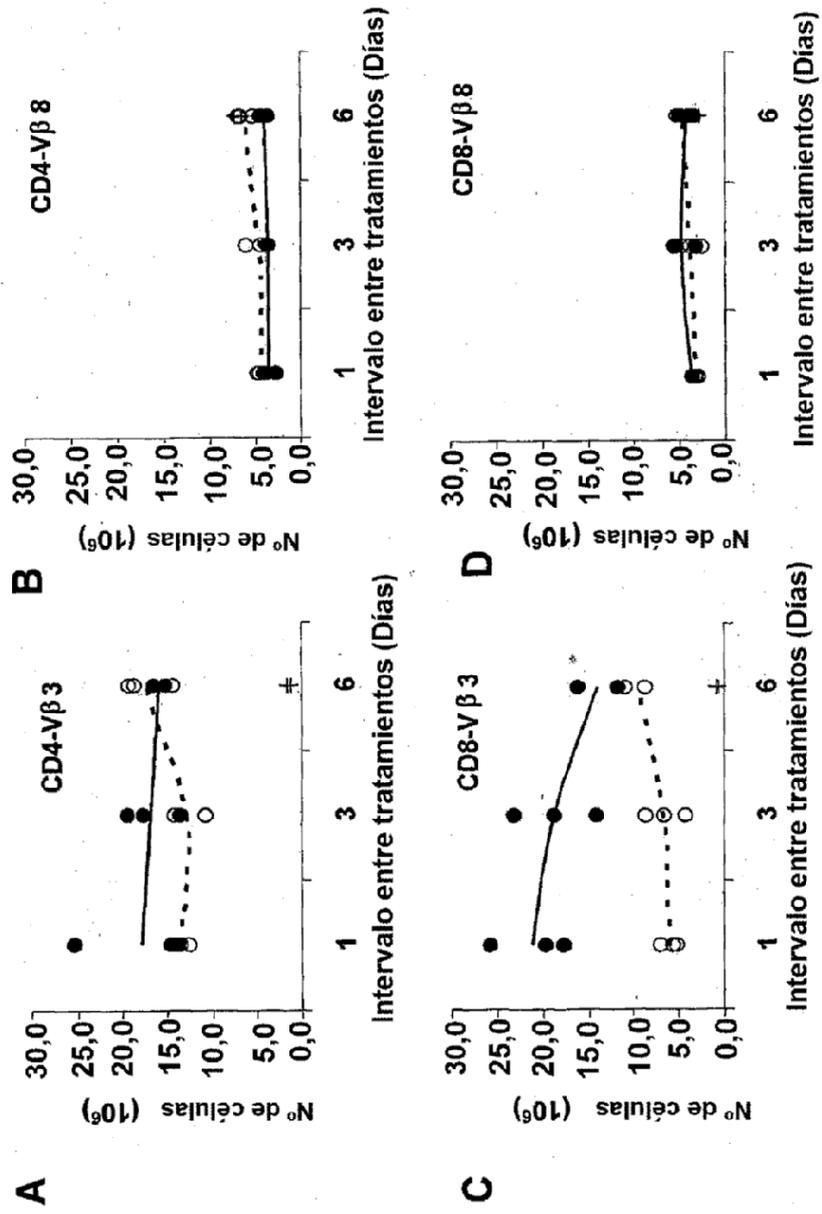


FIG. 9

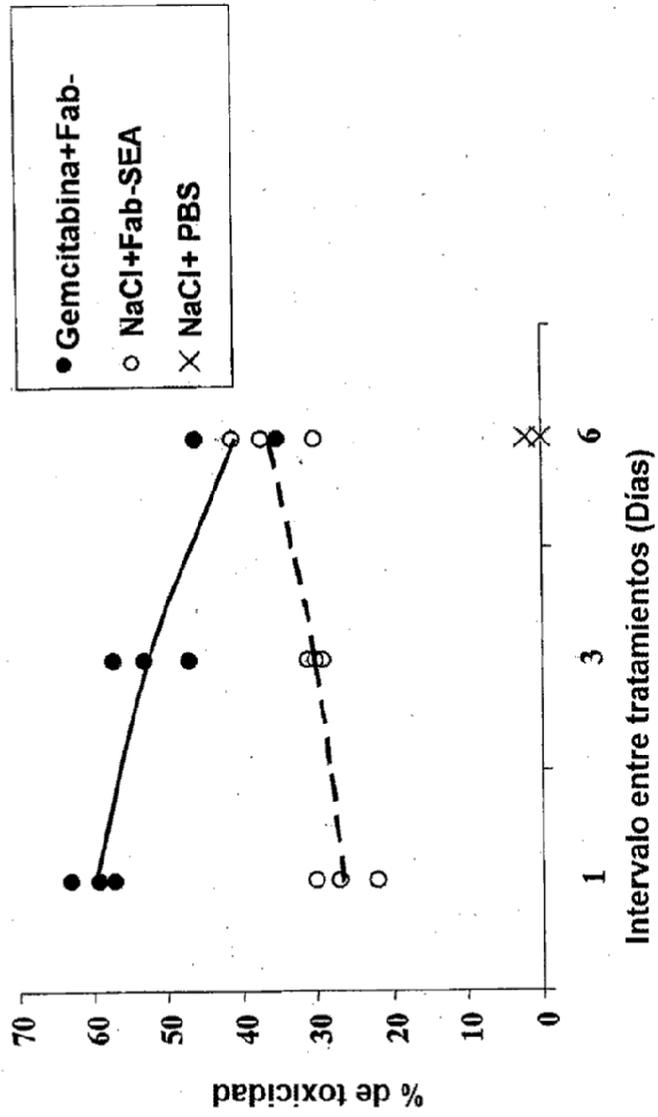


FIG. 10

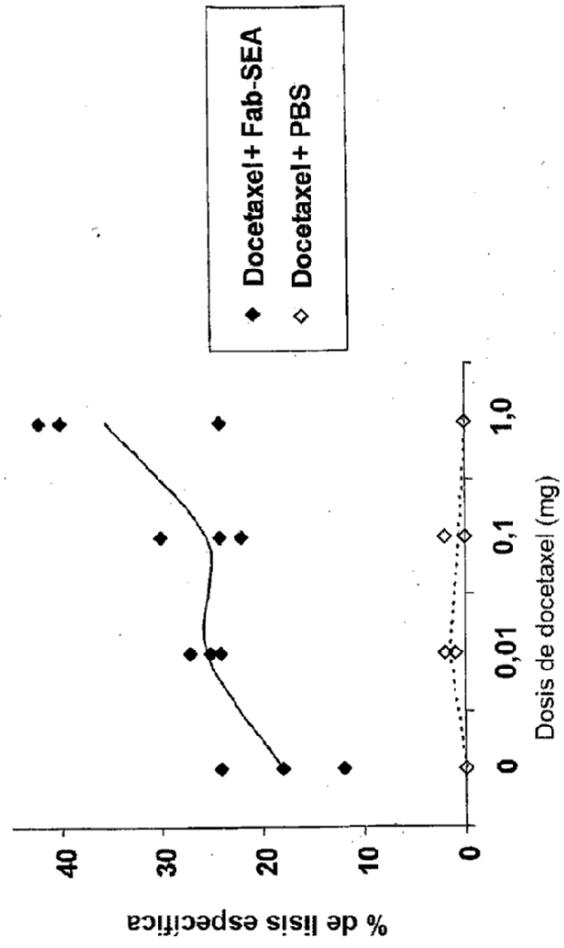


FIG. 11

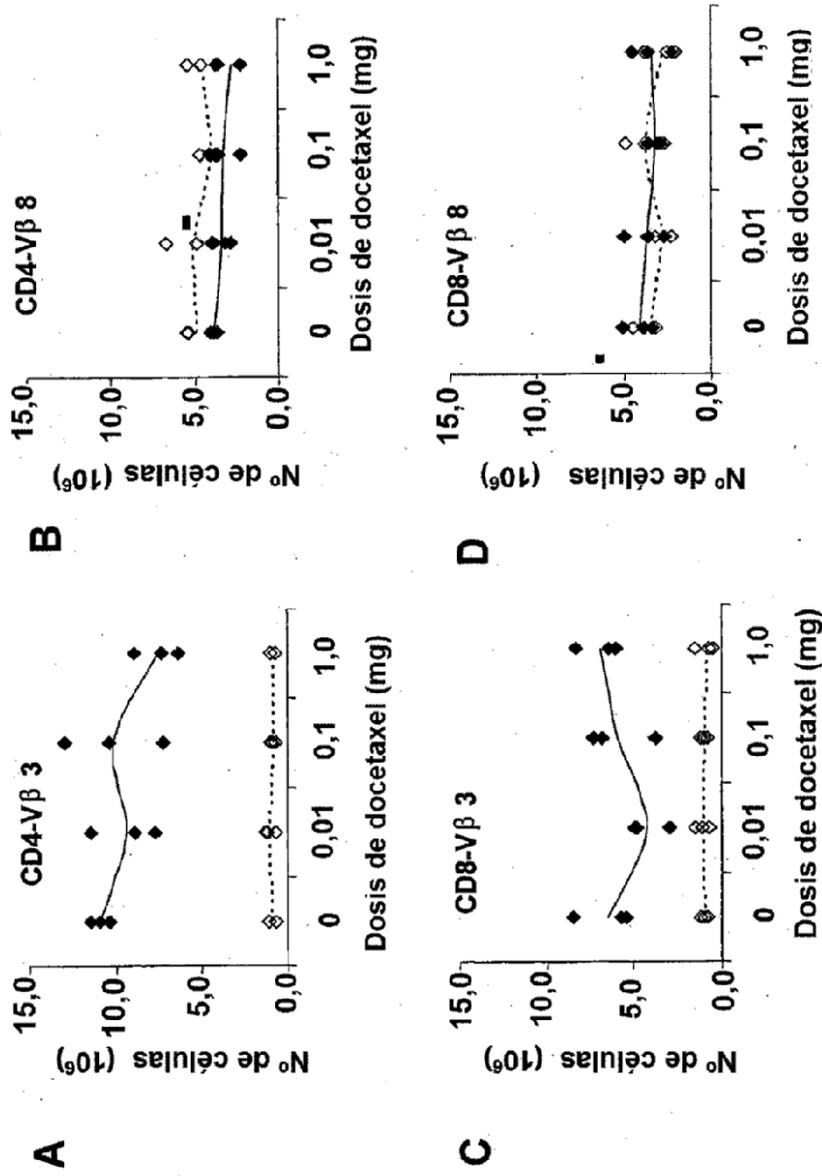


FIG. 12