

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 194**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2009 PCT/US2009/040275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126934**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09729923 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2276509**

54 Título: **Detección y tratamiento de cáncer pancreático, de ovario y otros cánceres**

30 Prioridad:

11.04.2008 US 44457 P

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

31.10.2016

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

**RYAN, MAUREEN y
SMITH, MARIA, LEIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 588 194 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

Detección y tratamiento de cáncer pancreático, de ovario y otros cánceres

5 **Antecedentes**

CD70 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) de moléculas unidas a la membrana celular y secretadas que se expresa por una diversidad de tipos celulares normales y malignos. CD70 es una proteína transmembrana de tipo II con su extremo carboxilo expuesto hacia el exterior de las células y su extremo amino en el lado citosólico de la membrana plasmática (Bowman et al., 1994, J. Immunol. 152:1756-61; Goodwin et al., 1993, Cell 73:447-56). La proteína CD70 humana contiene un dominio citoplasmático de 20 aminoácidos, un dominio transmembrana de 18 AA y un dominio extracelular de 155 AA con dos posibles sitios de N-glicosilación (Bowman et al., supra; Goodwin et al., supra). La inmunoprecipitación específica de células que expresan CD70 marcadas con radioisótopos por anticuerpos anti-CD70 produce polipéptidos de 29 y 50 kDa (Goodwin et al., supra; Hintzen et al., 1994, J. Immunol. 152:1762-73). Basándose en su homología con el TNF-alfa y el TNF-beta, se predice una estructura trimérica para CD70 (Petsch et al., 1995, Mol. Immunol. 32:761-72).

La proteína CD70 tiene una expresión limitada en tejidos normales en seres humanos. Esto hace que CD70 sea una diana atractiva para las terapias para el cáncer. Sin embargo, la expresión de CD70 se ha identificado solo en un pequeño número de cánceres, tales como carcinoma de células renales, cáncer de colon, ciertos tipos de linfoma no de Hodgkin y mieloma múltiple. La expresión de CD70 en células cancerosas se detecta típicamente usando anticuerpos que se unen a la proteína CD70 nativa, tal como mediante inmunohistoquímica. El documento WO 2007/038637 divulga anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a CD70. La detección de la expresión de CD70 en muestras de pacientes fijadas ha resultado ser problemática, debido a la mala calidad de los anticuerpos que carecen de una especificidad suficiente por CD70. En particular, la reactividad cruzada y la tinción de fondo interfieren con la detección de CD70 en muestras fijadas. La presente invención soluciona esta y otras necesidades.

30 **Breve resumen**

Los presentes inventores describen métodos de diagnóstico, pronóstico, profilaxis y tratamiento y supervisión del tratamiento del cáncer de ovario, pancreático y de otros cánceres usando anticuerpos contra CD70. Los presentes inventores también describen métodos de diagnóstico, pronóstico, profilaxis y tratamiento y supervisión del tratamiento de cáncer de pulmón, de cabeza y cuello (laringe o faringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo de células claras y papilares, carcinoma colorrectal y carcinoma de vejiga.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD70 humana desnaturalizada en una muestra de células o tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina que expresan la proteína CD70 humana.

Los presentes inventores describen un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada con respecto a la unión a la proteína CD70 nativa. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada en una línea de células cancerosas SK-OV-3 de ovario o PANC-1 de páncreas, fijadas, con respecto a la unión a la proteína CD70 nativa. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Preferentemente, el anticuerpo se une a la proteína CD70 desnaturalizada en células o tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina con una unión específica que es igual o mejor que la del anticuerpo SG-21.1C1 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y con el número de registro asignado PTA-8734 o el anticuerpo SG-21.5D12 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y con el número de registro asignado PTA-8734. En particular, la reactividad cruzada no específica del anticuerpo es menor que la del anticuerpo SG-21.1C1 o la del anticuerpo SG-21.5D12. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede competir por la unión específica a la proteína CD70 desnaturalizada con el anticuerpo SG-21.1C1 o con el anticuerpo SG-21.5D12.

Los presentes inventores también describen un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada con respecto a la proteína CD70 nativa. En un aspecto relacionado, se proporciona un método para detectar la expresión de CD70 en una muestra de tejido de un paciente. La muestra de tejido puede proceder de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe, mama, riñón, cerebro, colon, sangre o piel del paciente. El tejido se fija y la proteína CD70 se desnaturaliza. La muestra de tejido fijado se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada con respecto a la proteína CD70 nativa y se detecta la unión del anticuerpo a la muestra de tejido fijado para determinar si CD70 se expresa en la muestra. La expresión de CD70 en la muestra de tejido fijado indica una probabilidad de que el paciente tenga un cáncer que expresa CD70. En algunas realizaciones, la muestra se fija con formalina y se incluye en parafina.

Los presentes inventores también describen un método para diagnosticar, pronosticar, determinar un protocolo de tratamiento o supervisar el tratamiento de un paciente que tiene cáncer de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe,

mama, o piel. El método incluye determinar la expresión de CD70 en células en una muestra de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe, mama o piel del paciente, en el que se usa la presencia de la expresión detectable de CD70 en el diagnóstico, pronóstico, determinación de un protocolo de tratamiento o supervisión del tratamiento del paciente.

5 La muestra puede ser una muestra fijada con formalina e incluida en parafina. El método puede incluir además administrar un régimen eficaz de un anticuerpo contra CD70 o un conjugado de fármaco y anticuerpo contra CD70 al paciente si la etapa de determinación indica un nivel detectable de CD70.

10 Los presentes inventores también describen un método para tratar un cáncer positivo para CD70. El método incluye administrar un régimen eficaz de un agente de unión a CD70 a un paciente que tiene cáncer de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe, mama o piel que tiene una expresión detectable de CD70, dónde el agente de unión es un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o un conjugado de fármaco y anticuerpo. El anticuerpo puede tener una función efectora. El paciente puede haberse sometido previamente a un tratamiento por cirugía, radiación y/o quimioterapia con un agente no dirigido a CD70 sin inducir la remisión del cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, tal como una forma quimérica o humanizada del anticuerpo monoclonal 15 1F6 o 2F2. El conjugado de fármaco y anticuerpo puede incluir un agente citotóxico, tal como un agente anti-tubulina, un agente de unión al surco menor del ADN, o un agente alquilante del surco menor del ADN. El anticuerpo en el conjugado de fármaco y anticuerpo puede estar conjugado con el agente citotóxico o citostático mediante un enlazador, tal como un enlazador que se puede escindir en condiciones intracelulares.

20 Los presentes inventores también describen un kit de combinación, de diagnóstico y farmacéutico que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada, para su uso en diagnóstico y un anticuerpo que se une específicamente a un dominio extracelular de la proteína CD70 nativa para su uso en terapia.

25 Los aspectos de la invención se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones ejemplares, consideradas conjuntamente con los dibujos, figuras y tablas adjuntas.

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no esté dentro de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra una transferencia de Western de extractos de proteína usando anticuerpos SG-21.1C1 y SG-21.5D12 para detectar CD70 desnaturalizada en extractos de proteína de células transfectadas con 786-O, 35 293F:CD70 y células 293F no transfectadas.

La figura 2 muestra la expresión de la proteína CD70 en la línea de células pancreáticas PANC-1 fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFP) usando el anticuerpo SG21.101.

40 La figura 3 muestra la expresión de la proteína CD70 en líneas celulares de ovario Ovar-3, SK-OV-3, Ca-Ov-3 y TOV-21G usando el anticuerpo SG21.1C1.

La figura 4 muestra la expresión de la proteína CD70 en muestras de tumor pancreático, detectada por los anticuerpos SG-21.1C1 o SG-21.5D12 frente a mIgG de control.

45 La figura 5 muestra la expresión de la proteína CD70 en células pancreáticas normales en células de tumor pancreático, detectada por el anticuerpo SG-21.1C1 usando el cromógeno Fast Red (color más oscuro).

La figura 6 muestra una evaluación de la expresión de la proteína CD70 en células de cáncer pancreático. El eje x indica la intensidad de tinción de CD70 y el eje y indica el porcentaje del área que es positiva para CD70.

50 La figura 7 muestra una evaluación de la expresión de la proteína CD70 en tumores de ovario. El eje x indica la intensidad de tinción de CD70 y el eje y indica el porcentaje de área que es positiva para CD70.

55 La figura 8 muestra una evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de diversos conjugados de fármaco y anticuerpo 1F6 humanizado contra una línea celular de cáncer de ovario, SKOV-3.

60 Las figuras 9A-C muestran evaluaciones de la actividad citotóxica *in vitro* de un conjugado de fármaco y anticuerpo 1F6 humanizado en las siguientes líneas celulares: (A) una línea de células pancreáticas transfectada con CD70, HPAFII; (B) una línea de células pancreáticas PANC-1 transfectada con CD70; (C) una línea celular MiaPaCa-2 transfectada con CD70.

La figura 10 muestra una evaluación de la eficacia *in vivo* de un conjugado de fármaco y anticuerpo 1F6 humanizado en tumores de carcinoma pancreático MiaPaCa transfectados con CD70 en ratones desnudos.

Definiciones

A menos que se indique otra cosa, se pretende que los siguientes términos y frases como se usan en el presente documento tengan los siguientes significados.

5 El término "anticuerpo" se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmunespecífica a un antígeno específico (por ejemplo CD70) o a (b) derivados sustituidos de forma conservativa de dichos polipéptidos de inmunoglobulina o
10 fragmentos que se unen de forma inmunespecífica al antígeno (por ejemplo, CD70). Los anticuerpos se definen en líneas generales en, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). A menos que sea evidente por el contexto, la referencia a un anticuerpo también incluye derivados de anticuerpo o conjugados con fármaco como se describe con más detalle más adelante.

15 Un "derivado de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, que se ha modificado por unión covalente de una molécula heteróloga, tal como, por ejemplo, por unión de un polipéptido heterólogo o por glicosilación, desglicosilación, acetilación o fosforilación no asociada normalmente con el anticuerpo, y similares.

20 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que procede de un clon de una sola célula, incluyendo cualquier clon de células eucariotas o procariontas o un clon de fago y no al método mediante el cual se produce. De esta manera, la expresión "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma.

25 Un "antígeno" es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo.

El término "inhibir" o "inhibición de" se refiere a una reducción en una cantidad medible o a la prevención total.

30 El término "agente" significa un elemento, compuesto o entidad molecular que incluye, por ejemplo, un compuesto farmacéutico, terapéutico o farmacológico. Los agentes pueden ser naturales o sintéticos o una combinación de los mismos. Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, beneficioso) sobre las células cancerosas, ya sea solo o en combinación con otro agente (por ejemplo, una enzima convertidora de profármacos en combinación con un profármaco). Típicamente, los agentes terapéuticos útiles de acuerdo con los métodos y composiciones descritas en el presente documento son aquellos que ejercen un efecto citotóxico o
35 citostático.

"Efecto citotóxico", cuando hace referencia al efecto de un agente sobre una célula, significa la destrucción de la célula.

40 "Efecto citostático" significa una inhibición de la proliferación celular.

"Un agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula, reduciendo o inhibiendo de esta manera el crecimiento, respectivamente, de células dentro de una población celular.

45 El término "reducción" en el contexto del efecto de un anticuerpo contra CD70 en células que expresan CD70, se refiere a una reducción del número o a la eliminación de las células que expresan CD70.

50 El término "funcional", en el contexto de un anticuerpo anti-CD70 o de un derivado del mismo para su uso de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, indica que el anticuerpo o derivado del mismo es (1) capaz de unirse a CD70 y/o (2) reduce o inhibe la proliferación de las células que expresan CD70 solo o cuando se conjuga con un agente citotóxico.

55 El término "profilaxis" se refiere a la administración de un conjugado de anticuerpo anti-CD70-fármaco (ADC) o derivado de ADC a un sujeto antes de que aparezcan los síntomas clínicos o del diagnóstico de un cáncer que expresa CD70 (por ejemplo, la administración a un individuo con predisposición o con un alto riesgo de adquirir cáncer pancreático o de ovario) para (a) bloquear la aparición o el inicio del cáncer que expresa CD70 o uno o más de los síntomas clínicos o de diagnóstico del mismo, (b) inhibir la gravedad del inicio del cáncer que expresa CD70, o (c) reducir la probabilidad de la aparición del cáncer que expresa CD70.

60 Los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a la ralentización, detención o reversión de la progresión de un cáncer que expresa CD70 en un paciente, como se demuestra por una reducción o eliminación de un síntoma clínico o diagnóstico de la enfermedad, mediante la administración de un anticuerpo anti-CD70, de conjugado de anticuerpo y fármaco o de derivado de ADC al sujeto después de la aparición del síntoma clínico o diagnóstico del cáncer que expresa CD70 en cualquier etapa clínica. El tratamiento puede incluir, por ejemplo, una reducción en la gravedad de un síntoma, en el número de síntomas o en la frecuencia de recidivas.

65

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o un Gobierno Estatal o indicado en la farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos. La expresión "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el cual se administra un anticuerpo contra CD70.

10 La expresión "cantidad eficaz", en el contexto de la administración de un agente farmacéutico, se refiere a la cantidad del agente que es suficiente para inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas clínicos o de diagnóstico de un cáncer de ovario o pancreático que expresa CD70 en un paciente. Una cantidad eficaz de un agente de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se administra en un "régimen eficaz". La expresión "régimen eficaz" se refiere a una combinación de cantidad del agente y a la frecuencia de dosificación adecuada para conseguir el tratamiento de un cáncer que expresa CD70.

15 El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben un tratamiento de diagnóstico, profiláctico o terapéutico.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina.

20 La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E.

La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido por la reacción de auristatina E con ácido paracetil benzoico.

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido por la reacción de auristatina E con ácido benzoilvalérico.

25 La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina.

Las abreviaturas "fk" y "phe-lys" se refieren al dipéptido fenilalanina-lisina.

30 Las abreviaturas "vc" y "val-cit" se refieren al dipéptido valina-citulina.

35 Los agentes terapéuticos están típicamente sustancialmente puros de contaminantes no deseados. Esto significa que un agente típicamente tiene una pureza de al menos aproximadamente un 50 % p/p (peso/peso), además de estar sustancialmente exentos de proteínas interferentes y contaminantes. En ocasiones, los agentes tienen al menos aproximadamente un 80 % p/p y más preferentemente al menos un 90 o aproximadamente un 95 % p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos un 99 % de pureza p/p.

Descripción detallada

40 I. General

45 Los presentes inventores describen métodos de diagnóstico, pronóstico, profilaxis y tratamiento y supervisión del tratamiento del cáncer de ovario y pancreático usando anticuerpos contra CD70. Los presentes inventores también describen métodos de diagnóstico, pronóstico, profilaxis y tratamiento y supervisión del tratamiento de cánceres de pulmón, de cabeza y cuello (laringe o faringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo carcinoma de células transparentes y papilar, carcinoma colorrectal y carcinoma de vejiga. Los métodos se basan en parte en los resultados presentados en los ejemplos que muestran que CD70 se expresa a niveles elevados en ciertos cánceres. La expresión elevada se detectó en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) de tejidos de cáncer de ovario y pancreático usando anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CD70 desnaturalizada. Además, también se detectó una expresión elevada de CD70 en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) de otros tejidos cancerosos usando anticuerpos contra el dominio extracelular desnaturalizado de CD70.

55 Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión del mecanismo, se cree que el éxito para detectar CD70 en muestras FFPE de tejidos de ovario y pancreáticos en particular y de otros cánceres en general, reside en el uso de anticuerpos que se unen preferentemente a la proteína CD70 desnaturalizada en dichas muestras con respecto a la CD70 nativa. Aunque la frecuencia de CD70 detectable en el cáncer pancreático y de ovario y/o su nivel no es tan alto(a) como en otros tejidos cancerosos con los que se ha asociado previamente la proteína CD70, son muy específicos para el tejido canceroso con respecto al tejido normal. De esta manera, en pacientes que tienen cáncer de ovario o cáncer pancreático en el que es detectable CD70, CD70 presenta una diana particularmente útil para dirigir selectivamente la toxicidad a las células cancerosas. De forma similar, en pacientes que tienen otros cánceres (tales como cáncer de pulmón, de cabeza y cuello (laringe o faringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo carcinomas de células transparentes y papilar, carcinoma colorrectal y carcinoma de vejiga), la presente invención proporciona una manera fácil de detectar la exclusión de CD70 en muestras fijadas de dichos pacientes.

II. Anticuerpos contra CD70

La descripción que se proporciona a continuación primero toma en consideración las propiedades de anticuerpos contra CD70 aplicables a la detección de CD70 en cánceres de ovario y pancreáticos y a su tratamiento y después se centra en las propiedades preferidas de los anticuerpos para las aplicaciones respectivas.

A. Anticuerpos contra CD70 en general

Los anticuerpos anti-CD70 incluyen anticuerpos monoclonales, quiméricos (por ejemplo, que tienen una región constante humana y una región variable de ratón), humanizados, de superficie remodelada o humanos; anticuerpos monocatenarios o similares. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

Los anticuerpos anti-CD70 pueden ser un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno tal como un Fab, un F(ab'), un F(ab')₂, una cadena Fd, un Fv monocatenario (scFv), un anticuerpo monocatenario, un Fv con enlaces de disulfuro (sdFv), un fragmento que comprende un dominio V_L o V_H, incluyendo nanocuerpos o fragmentos procedentes de camellos, llamas o similares, o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab o un fragmento de unión a CD70 de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: la región bisagra, los dominios CH1, CH2, CH3 y CL. Asimismo, los fragmentos de unión a antígeno pueden comprender cualquier combinación de una o más regiones variables con una región bisagra, los dominios CH1, CH2, CH3 y CL. Típicamente los anticuerpos son de ser humano, de roedor (por ejemplo, ratón y rata), de burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, de camélido, de caballo o de pollo.

Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de CD70 o pueden ser específicos tanto para CD70 como para una proteína heteróloga (véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; las Patentes de Estados Unidos n.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.). Los anticuerpos multiespecíficos, incluyendo anticuerpos biespecíficos y triespecíficos útiles para la puesta en práctica de los métodos descritos en el presente documento son anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica tanto a CD70 como a un segundo receptor o complejo receptor de la superficie celular, tal como un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la supe familias de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína de histocompatibilidad principal, una lectina (tipo C, tipo S o tipo I) o una proteína de control del complemento.

Los anticuerpos anti-CD70 también pueden describirse en términos de su afinidad de unión a CD70, de 10⁻⁷ M, 5 x 10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5 x 10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5 x 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5 x 10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5 x 10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5 x 10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5 x 10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5 x 10⁻¹⁵ M o 10⁻¹⁵ M.

Un anticuerpo anti-CD70 puede ser un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo proceden de diferentes especies de animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos (véase, por ejemplo, Morrison, Science, 1985, 229:1202; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Gillies *et al.*, 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; Patentes de Estados Unidos n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397).

Un anticuerpo anti-CD70 también puede ser un anticuerpo humanizado, incluyendo un anticuerpo de superficie remodelada. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y regiones marco conservadas y constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos en las regiones marco conservadas humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar o preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de regiones marco conservadas se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de la CDR y los restos de región marco conservada para identificar restos de región marco conservada importantes para la unión del antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de región marco conservada poco habituales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en este campo tales como injerto de CDR (documentos EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), remodelación de superficie o *veneering* (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, Molecular Immunology, 1991, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska *et al.*, 1994, PNAS 91:969-973) y reordenamiento de cadenas (Patente de Estados Unidos 5.565.332) (todas estas referencias se incorporan por referencia en el presente documento).

Un anticuerpo anti-CD70 también puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica tales como métodos de presentación en fagos (véase *supra*) usando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humanas. Véanse también, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Además, puede generarse un anticuerpo humano que reconoce un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada" en la que se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (véase, por ejemplo, Jespers *et al.*, 1994, *Biotechnology* 12:899-903). También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando la tecnología de hibridoma. Para una descripción general de la tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598, 877; las Patentes de Estados Unidos n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

En los anticuerpos se puede ensayar la unión específica a CD70 por métodos conocidos, tales como, por ejemplo, sistemas de inmunoensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencia de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayo de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación al complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A. (Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 4ª edición, 1999); Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999).)

Además, la afinidad de unión de un anticuerpo a CD70 y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-CD70 puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de CD70 marcada (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de CD70 no marcada, y la detección del anticuerpo unido a la proteína CD70 marcada. La afinidad del anticuerpo por CD70 y las velocidades de disociación de la unión pueden determinarse después a partir de los datos por análisis de gráficos de Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, CD70 se incubaba con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado. Como alternativa, la afinidad de unión de un anticuerpo por CD70 y las velocidades de asociación y disociación de una interacción de anticuerpo-CD70 pueden determinarse por resonancia de plasmón superficial.

Pueden obtenerse anticuerpos a partir de fragmentos que contienen antígeno de la proteína CD70 por procedimientos convencionales según el tipo de anticuerpo (véase, por ejemplo, Kohler, *et al.*, *Nature*, 256:495, (1975); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (C.S.H.P., NY, 1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) y el documento WO 90/07861; Dower *et al.*, documento WO 91/17271 y McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047. Como ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas que incluyen, por ejemplo, el uso de las tecnologías de hibridoma, recombinante y de presentación en fago o una combinación de las mismas. Las técnicas de hibridoma se analizan, en general, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *supra*, y Hammerling, *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para fabricar los anticuerpos anti-CD70 incluyen, por ejemplo, los divulgados en Briinnan *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, *Gene* 187:9-18; Burton *et al.*, 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

También se conocen en general en este campo técnicas para generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítipos específicos. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')_2 por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')_2). Los fragmentos F(ab')_2 contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio $\text{C}_{\text{H}1}$ de la cadena pesada. También pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')_2 , usando, por ejemplo, los métodos divulgados en el documento WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, *BioTechniques* 12(6):864-869; y Sawai *et al.*, 1995, *AJRI* 34:26-34; y Better *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043 (cuyas divulgaciones se incorporan al presente documento por referencia).

Los ejemplos de técnicas que puede usarse para producir Fv y anticuerpos monocatenarios incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88;

Shu *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; y Skerra *et al.*, 1988, Science 240:1038-1040.

También pueden producirse anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismos que son útiles en los presentes métodos por técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo o derivado del mismo que se une a CD70 y/o reduce o inhibe la proliferación de células que expresan CD70 requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica al anticuerpo o derivado del mismo. Una vez que se ha obtenido un ácido nucleico que codifica dicha proteína, el vector para la producción de la molécula de proteína puede producirse por la tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo. Pueden usarse técnicas convencionales tales como las descritas en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3ª edición, 2001); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2ª edición, 1989); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Nueva York, 4ª edición, 1999); y Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 2ª edición, 1998) para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivos celulares, incorporación de transgenes y expresión de proteínas recombinantes.

Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-CD70, un vector de expresión puede codificar una cadena pesada o ligera del mismo o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807; WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos n.º 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa. El vector de expresión se introduce por transfección en una célula hospedadora mediante técnicas conocidas y las células transfectadas se cultivan después para producir el anticuerpo anti-CD70. Típicamente, para la expresión de anticuerpos bicatenarios, pueden co-expresarse vectores que codifican tanto la cadena pesada como la cadena ligera en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador procarionta y eucariota-vector de expresión para expresar un anticuerpo anti-CD70 o derivado del mismo. Típicamente, se usan células eucariotas, particularmente para moléculas de anticuerpo anti-CD70 recombinantes enteras, para la expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, DG44 o CHO-S) junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano inmediato principal del citomegalovirus humano o el promotor de EF-1 α de ovario de hámster chino, es un sistema de expresión eficaz para la producción de anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismo (véase, por ejemplo Foecking *et al.*, 1986, Gene 45:101; Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2; Allison, Patente de Estados Unidos n.º 5.888.809).

Otros sistemas de expresión en hospedador incluyen sistemas de expresión basados en plásmidos en células bacterianas (véase, por ejemplo, Ruther *et al.*, 1983, EMBO 1,2:1791; Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); sistemas de insecto tales como el uso del vector de expresión del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) en células de *Spodoptera frugiperda*; y sistemas de expresión basados en virus en células de mamífero, tales como sistemas basados en adenovirus (véanse, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359; Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

B. Anticuerpos para la detección de CD70

La selección de anticuerpos contra CD70 para su uso en métodos de detección depende de si se detecta CD70 mediante una técnica que requiera la detección de CD70 desnaturalizada o de CD70 nativa (como se expresa en las células). En métodos, tales como la transferencia de Western o la detección inmunohistoquímica, en la que la proteína CD70 diana esta desnaturalizada, se prefiere usar un anticuerpo que se una a CD70 en forma desnaturalizada (por ejemplo, CD70 humana o de cinomolgo). Típicamente, dichos anticuerpos se unen preferentemente a la forma desnaturalizada con respecto a la forma nativa, es decir, CD70 según se produce de forma natural o cuando se aísla sin exponerse a condiciones desnaturalizantes, tales como disolvente, detergentes o temperaturas elevadas (por ejemplo, mayores de 50 °C)). Dichos anticuerpos pueden inducirse usando un inmunógeno de CD70 desnaturalizado (por ejemplo, CD70 humana o de cinomolgo), o un fragmento inmunogénico del mismo procedente de la parte extracelular. La desnaturalización puede realizarse tratando el inmunógeno con SDS (por ejemplo, al 0,5 %) y opcionalmente calentando a 80 °C. La desnaturalización también puede realizarse simplemente eluyendo un inmunógeno de un gel de SDS usado para purificar el inmunógeno. Como alternativa, pueden producirse anticuerpos que se unen preferentemente a la proteína CD70 desnaturalizada, usando péptidos sintéticos procedentes del dominio extracelular de CD70 como inmunógeno. Algunos de esos péptidos son demasiado cortos como para conservar la conformación de un segmento correspondiente del péptido nativo. Los péptidos sintéticos pueden estar desnaturalizados, pero normalmente no requieren desnaturalización para usarse como un inmunógeno.

Los anticuerpos generados por estos u otros métodos se exploran para seleccionar los de unión preferente a CD70 desnaturalizada con respecto a CD70 nativa. El antígeno CD70 desnaturalizado y nativo puede ensayarse mediante el mismo ensayo o mediante ensayos diferentes. En particular, si se usa el último enfoque, la selección puede realizarse

con un anticuerpo de control que se sabe que se une a CD70 nativa, tal como anticuerpos terapéuticos descritos más adelante (por ejemplo, 1F6 o 2F2 humanizados; véanse las publicaciones de solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º 2006-0233794 y 2006-0083736 y la publicación de patente internacional WO 06/113909). Si un anticuerpo muestra una mayor relación de unión a CD70 desnaturalizada con respecto a CD70 nativa con respecto a la relación del anticuerpo de control, entonces el anticuerpo se une preferentemente a CD70 desnaturalizada.

Los anticuerpos preferidos para la detección de CD70 en cánceres pancreáticos y de ovario son los que se unen específicamente a CD70 en muestras de cáncer pancreático o de ovario que están fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). Estos anticuerpos reconocen preferentemente epítomos en CD70 que se revelan por el tratamiento FFPE con respecto a antígenos CD70 nativos en células de cáncer pancreático o de ovario no tratadas. Dichos anticuerpos se denominan anticuerpos anti-CD70 específicos de FFPE. Dichos anticuerpos carecen de unión específica detectable a la proteína CD70 nativa. Preferentemente, la unión específica de los anticuerpos es igual o mejor que la del anticuerpo SG-21.1C1 o SG-21.5D12. En particular, los anticuerpos tienen preferentemente una reactividad cruzada detectable igual o menor con otras proteínas celulares, según se determina por transferencia de Western o tinción de células fijadas, en condiciones de unión específicas, en comparación con los anticuerpos SG-21.1C1 o SG-21.5D12.

Los anticuerpos preferidos para la detección de CD70 en otros cánceres (como se describe más adelante en los ejemplos) son aquellos que se unen específicamente a CD70 en estos especímenes de cáncer que están fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE). Estos anticuerpos reconocen preferentemente epítomos en CD70 que se revelan por el tratamiento FFPE con respecto a los antígenos CD70 nativos presentes en células de cáncer pancreático o de ovario sin tratar. Dichos anticuerpos carecen de unión específica detectable a la proteína CD70 nativa. Preferentemente, la unión específica de los anticuerpos es igual o mejor que la de los anticuerpos SG-21.1C1 o SG-21.5D12. En particular, los anticuerpos tienen preferentemente una reactividad cruzada detectable igual o menor con otras proteínas celulares, según se determina por transferencia de Western o tinción de células fijadas, en condiciones de unión específicas, en comparación con los anticuerpos SG-21.1C1 o SG-21.5D12.

Algunos anticuerpos anti-CD70 específicos de FFPE ejemplares son los mAb SG-21.1C1 (también denominado como SG-21.1C1.B3) y SG-21.5D12.C3 (también denominado SG-21.5D12.C3). Otros anticuerpos preferidos compiten con SG-12.1C1.B3 o SG-21.5D12.C3 por la unión específica a la proteína CD70 desnaturalizada. Otros anticuerpos preferidos comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR de la cadena pesada de SG-21.1C1.B3 y una cadena ligera que comprende las tres CDR de la cadena ligera de SG-12.1C1.B3. Otros anticuerpos preferidos comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR de la cadena pesada de SG-21.5D12.C3 y una cadena ligera que comprende las tres CDR de la cadena ligera de SG-21.5D12.C3. Otros anticuerpos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de SG-21.1C1.B3 y una región variable de cadena ligera madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena ligera madura de SG-21.1C1.B3. Otros anticuerpos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con región variable de cadena pesada madura de SG-21.5D12.C3 y una región variable de cadena ligera madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena ligera madura de SG-21.5D12.C3.

C. Anticuerpos contra CD70 para aplicaciones terapéuticas.

Los anticuerpos usados para aplicaciones terapéuticas se unen específicamente a un dominio extracelular de antígenos CD70 nativos en células de cáncer pancreático o de ovario. Los anticuerpos usados para aplicaciones terapéuticas también pueden unirse específicamente a un dominio extracelular del antígeno CD70 nativo en cánceres de pulmón, de cabeza y cuello (faringe o laringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo de células claras y papilar, carcinoma colorrectal y carcinoma de vejiga. Los anticuerpos pueden ser agonistas, no agonistas o antagonistas con respecto a la unión de CD70 a su ligando, CD27. Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión del mecanismo, se cree que los anticuerpos pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático como resultado de la unión a CD70 y su internalización dentro de la célula o mediante la unión a CD70 y la acumulación en el exterior de las células. En cualquier caso, el efecto citotóxico o citostático puede promoverse conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico o citostático. El efecto citotóxico o citostático ejercido desde el exterior de la célula por un anticuerpo unido a CD70 puede promoverse además o como alternativa por una función constante de anticuerpo (efectora). Los dominios constantes de anticuerpo median diversas funciones efectoras de Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). Opcionalmente, la función efectora de un agente de unión a Cd70 puede aumentarse mediante diversas estrategias, tal como se describe en el documento WO 2006/113909. El efecto citotóxico o citostático ejercido por los anticuerpos también puede promoverse bloqueando la interacción de CD70 con su ligando CD27.

Un anticuerpo anti-CD70 preferido es el mAb 1F6 o 2F2 o una forma quimérica o humanizada de los mismos, como se describe en el documento WO 2004/073656 y la solicitud de Patente de Estados Unidos publicada n.º 2006-0233794 y en el documento WO2006/113909. Una región variable madura de cadena pesada preferida tiene la secuencia SEQ ID

NO: 1 y una región variable madura de cadena ligera preferida tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.

5 Otros anticuerpos útiles comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera maduras que tienen al menos un 90 % y preferentemente al menos un 95 % o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se proporciona orientación en cuanto a qué restos de la región marco conservada de la región variable se necesitan para la unión en el documento WO 2006/113909. Otros anticuerpos anti-CD70 útiles o derivados de los mismos pueden inhibir competitivamente la unión del mAAb 1F6 o 2F2 a CD70 como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayo. La inhibición competitiva significa que un anticuerpo, cuando está presente en un exceso de al menos dos veces y preferentemente de 5 veces, inhibe la unión de 1F6 o 2F2 a CD70 en al menos un 50 %, más típicamente en al menos un 60 %, aún más típicamente en al menos un 70 % y aún más típicamente en al menos un 75 % o el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de 1F6 o 2F2 a CD70 en al menos un 80 %, en al menos un 85 %, en al menos un 90 % o en al menos un 95 %.

15 Otros anticuerpos preferidos comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 1F6 y una cadena ligera que comprende las tres CDR de la región variable de cadena ligera de 1F6. Otros anticuerpos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de 2F2 y una región variable de cadena ligera madura que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena ligera madura de 2F2. Otros anticuerpos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene al menos un 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de 1F6 y una región variable de cadena ligera madura que tiene al menos un 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena ligera madura de 1F6. Otros anticuerpos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene al menos un 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de 2F2 (SEQ ID NO: 3) y una región variable de cadena ligera madura que tiene al menos un 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con la región variable de cadena ligera madura de 2F2 (SEQ ID NO: 4).

30 Se describen numerosos anticuerpos distintos contra CD70, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente n.º 2005-0191299; y la publicación internacional n.º WO 07/038637. Otros anticuerpos que se unen a un dominio extracelular de CD70 pueden seleccionarse con respecto a la idoneidad bien solos o como derivados y/o conjugados como se describe más adelante. La selección puede evaluar la internalización en células que expresan CD70 usando anticuerpos marcados. La selección también puede evaluar la citotoxicidad. Pueden realizarse una selección adicional en modelos animales de cáncer pancreático o de ovario y otros cánceres. Por ejemplo, pueden usarse la línea celular de carcinoma de ovario SKOV-3, la línea celular de carcinoma endometrial AN3CA, la célula de carcinoma o de ovario TOV21G. Además, pueden usarse las líneas de células pancreáticas PANC1 y MiaPaCa2.

35 En la práctica de los presentes métodos, también puede usarse un derivado de un anticuerpo anti-CD70. Las modificaciones típicas incluyen, por ejemplo, glicosilación, desglicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína y similares. Pueden realizarse cualquiera de numerosas modificaciones químicas, por ejemplo, por escisión química específica, cetilación, formilación o síntesis metabólica en presencia de tunicamicina. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

45 El derivado de anticuerpo puede ser un multímero, tal como un dímero, que comprende uno o más monómeros, en el que cada monómero incluye (i) una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD70 o una región de polipéptido derivado del mismo (por ejemplo, por sustitución conservativa de uno o más aminoácidos) y (ii) una región de multimerización de polipéptido (por ejemplo dimerización), de tal forma que el derivado de anticuerpo forma multímeros (por ejemplo, homodímeros) que se unen específicamente a CD70. Típicamente, una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD70, o una región de polipéptido derivada del mismo, se fusiona de forma recombinante o química con una proteína heteróloga, en el que la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización o multimerización. Antes de la administración del derivado de anticuerpo a un sujeto, con el objetivo de tratar o prevenir cánceres que expresan CD70, el derivado se somete a condiciones que permiten la formación de un homodímero o heterodímero. Un heterodímero puede comprender dominios de dimerización idénticos pero diferentes regiones de unión a antígeno de CD70, regiones de unión a antígeno de CD70 idénticas pero diferentes dominios de dimerización o regiones de unión a antígeno CD70 y dominios de dimerización diferentes.

55 Un derivado de un anticuerpo anti-CD70 puede formarse conjugando un anticuerpo anti-CD70 con un segundo anticuerpo (un "heteroconjugado de anticuerpo") (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980). Los heteroconjugados útiles para poner en práctica los presentes métodos comprenden un anticuerpo que se une a CD70 (por ejemplo, un anticuerpo que tiene las CDR y/o las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales 1F6 o 2F2) y un anticuerpo que se une a un receptor de superficie o complejo de receptor, tal como un miembro de la súper familia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la súper familia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína de histocompatibilidad principal, una lectina (de tipo, C, tipo S o tipo I) o una proteína de control del complemento.

Los anticuerpos contra CD70 y sus derivados pueden conjugarse con un resto citotóxico o citostático para formar un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). Los restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos o derivados de anticuerpo son agentes quimioterapéuticos, enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos o toxinas. Por ejemplo, puede conjugarse un anticuerpo anti-CD70 o derivado del mismo con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida, tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica).

El anticuerpo anti-CD70 o derivado del mismo puede conjugarse con una enzima convertidora de profármacos. La encima convertidora de profármacos puede fusionarse de forma recombinante al anticuerpo o derivado del mismo o conjugarse químicamente con el mismo usando métodos conocidos. Los ejemplos de enzimas convertidoras de profármacos son carboxipeptidasa G2, beta-glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Se conocen bien técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas y en particular con anticuerpos. (Véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer, Therapy* (Reisfeld *et al.*, eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (Robinson *et al.*, eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª edición, 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.*, eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin *et al.*, eds., Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase también, por ejemplo, la publicación PCT WO 89/12624).

El agente terapéutico puede conjugarse de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (por ejemplo, mediante hidrólisis, degradación del anticuerpo o por un agente de escisión). Dicho agente terapéutico se une al anticuerpo o derivado del mismo con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el entorno intracelular de la célula cancerosa que expresa CD70 pero no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, de tal forma que el conjugado se escinde del anticuerpo o derivado del mismo cuando se internaliza por la célula cancerosa que expresa CD70 (por ejemplo, en el ambiente endosómico o, por ejemplo, gracias a la sensibilidad al pH o la sensibilidad a proteasas, en el lisosómico o en el ambiente caveolar).

Típicamente, el ADC comprende una región enlazadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-CD70 o derivado del mismo. Tal como se ha indicado con anterioridad, típicamente, el enlazador se puede escindir en condiciones intracelulares, de tal forma que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo una proteasa lisosómica o endosómica. Típicamente, el enlazador de peptidilo tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden inducir catepsinas B y D y plasmina (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son enlazadores de peptidilo que se escinden por enzimas que están presentes en células que expresan CD70. Por ejemplo, puede usarse un enlazador de peptidilo que se puede escindir por la proteasa dependiente de tior, catepsina-B, que tiene una alta expresión en tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador que comprende un péptido Phe-Leu o un péptido Gly-Phe-Leu-Gly). Se describen otros enlazadores similares, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 6.214.345. En realizaciones específicas, el enlazador de peptidilo que se puede escindir por una proteasa intracelular que comprende un enlazador Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Val-Cit). Una ventaja del uso de la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente típicamente se atenúa cuando se conjuga y las estabildades de los conjugados en suero típicamente son altas.

El enlazador escindible puede ser sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazador sensible al pH se puede hidrolizar en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácidos que se puede hidrolizar en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las que se encuentran en la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.622.929)).

Otros enlazadores se pueden escindir en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). Los enlazadores disulfuro incluyen los que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato, SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridiltio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT. Véase, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, en *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987.). Véase también la Patente de Estados Unidos n.º 4.880.935).

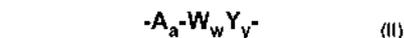
El enlazador también puede ser un enlazador de malonato (Johnson *et al.*, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un enlazador de maleimidobenzoílo (Lau *et al.*, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

- 5 El enlazador también puede ser un enlazador no escindible, tal como un enlazador maleimido-alquileo o maleimido-arilo que se une directamente a la unidad de fármaco. Un enlazador de fármaco activo se libera por degradación del anticuerpo.

10 Típicamente, el enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, lo que significa que no se escinde más de aproximadamente un 20 %, típicamente no más de aproximadamente un 15 %, más típicamente no más de aproximadamente un 10 % e incluso más típicamente no más de aproximadamente un 5 %, no más de aproximadamente un 3 % o no más de aproximadamente un 1 % de los enlazadores en una muestra de ADC cuando el ADC o derivado de ADC está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Puede determinarse si un enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, por incubación independientemente con plasma tanto (a) el ADC o derivado de ADC (la "muestra de ADC") como (b) una cantidad molar igual de anticuerpo o agente terapéutico no conjugado (la "muestra de control") durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después comparando la cantidad de anticuerpo o agente terapéutico no conjugado presente en la muestra de ADC con el presente en la muestra de control, como se mide, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

20 El enlazador también puede promover la internacionalización celular. El enlazador puede promover la internalización celular cuando está conjugado con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto de enlazador-agente terapéutico del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento). Como alternativa, el enlazador puede promover la internalización celular cuando se conjuga tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-CD70 derivado del mismo (es decir, en el medio del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento).

En el documento WO 2004-010957 se describe una diversidad de enlazadores que pueden usarse con las presentes composiciones y tienen la forma



En la que:

-A- es una unidad espaciadora;

a es 0 o 1;

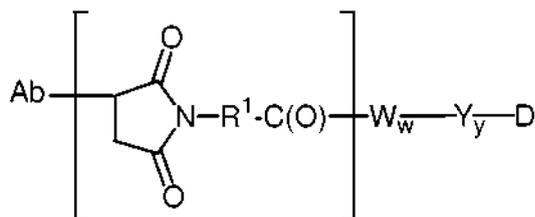
35 Cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

W es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;

40 -Y- es una unidad espaciadora;

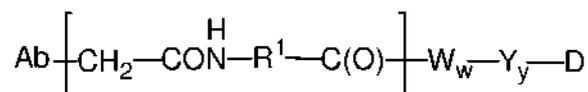
e y es 0, 1 o 2.

45 Los enlazadores representativos se representan dentro de los corchetes de las fórmulas (Ia) y (Ib; véase *infra*), en las que A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se ha definido anteriormente y R¹ se selecciona entre alquileo-C₁-C₁₀-, carbocíclico-C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquileo-C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo-C₁-C₁₀-, -alquileo-C₁-C₁₀-(carbocíclico C₃-C₈)-, -(carbocíclico C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterocíclico C₃-C₈ -, -alquileo C₁-C₁₀-(heterocíclico C₃-C₈)-, -(heterocíclico C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía entre 1-10. Ab es anticuerpo.



(Ia)

50



(Ib)

La unidad de aminoácido (-W-), si está presente, une la unidad de estiramiento (-A-) a la unidad espaciadora (-Y-) si está presente en la unidad espaciadora y une la unidad de estiramiento al agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; D) si está ausente la unidad espaciadora.

5

Si está presente, -W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. w es un número entero que varía de 2 a 12.

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: Autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es una en la que parte o toda la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del conjugado anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco o el compuesto de fármaco-enlazador. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolativa incluyen una unidad espaciadora de (glicina/glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un conjugado de anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa a linfocitos, se escinde un resto de glicina-glicina fármaco o un resto de glicina-fármaco de Ab-A_a-W_w-. Para liberar el fármaco, debe tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para escindir el enlace de la unidad de glicina-fármaco.

10

Como alternativa, un conjugado de anticuerpo anti-CD70 y fármaco que contiene una unidad espaciadora autoinmolativa pueden liberar el fármaco (D) sin necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En estas realizaciones, -Y- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB) que se une a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del grupo PAB y se conecta directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase, para ejemplos, Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimenten una ciclación fácil tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillo biclo[2.2.1] y biclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). También son ejemplos de estrategias de espaciadores autoinmolativos que pueden aplicarse a los conjugados de anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco la eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury, *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447). Como alternativa, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno ramificado (BHMS), que puede usarse para incorporar fármacos adicionales.

15

Las clases de agentes citotóxicos útiles incluyen, por ejemplo, antraciclinas, agentes antitubulina, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, sensibilizadores a la quimioterapia o similares.

Los ejemplos de clases útiles de agentes citotóxicos incluyen auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinoides y alcaloides de la vinca.

Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, endiinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel and docetaxel), alcaloides de la vinca, doxorubicina, morfolino-doxorubicina y cianomorfolino-doxorubicina.

El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalano, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, a los anticuerpos anti-CD70 o derivados de los mismos se pueden unir agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliceamicina, maitasina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina.

En realizaciones ejemplares, el agente citotóxico o citostático puede ser auristatina E o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2005-0238649 y 2006-0074008.

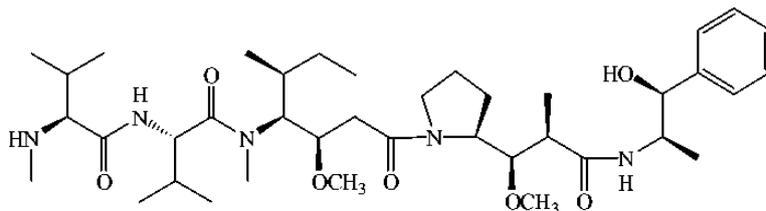
50

En realizaciones ejemplares, el agente citotóxico o citostático puede ser auristatina E o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2005-0238649 y 2006-0074008.

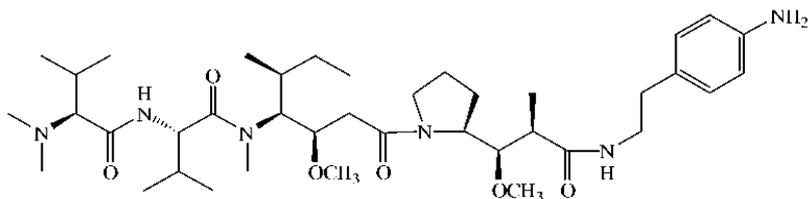
60

El agente citotóxico puede ser un agente de unión al surco menor del ADN. (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.130.237). Por ejemplo, el agente de unión al surco menor puede ser un compuesto de CBI o una enediina (por ejemplo, caliceamicina).

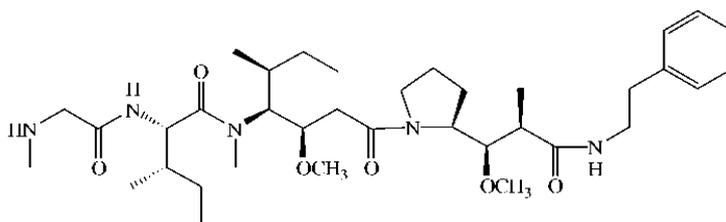
- 5 El ADC o derivado de ADC puede comprender un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel)), (Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina), y auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). (A continuación, se muestran ejemplos de auristatinas en las Formulas MI-XMI) Otros agentes anti-tubulina adecuados incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcemid, estramustina, criptofisinas, cemadotin, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobin.
- 10



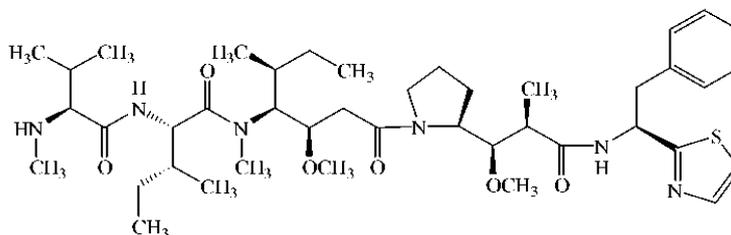
(III)



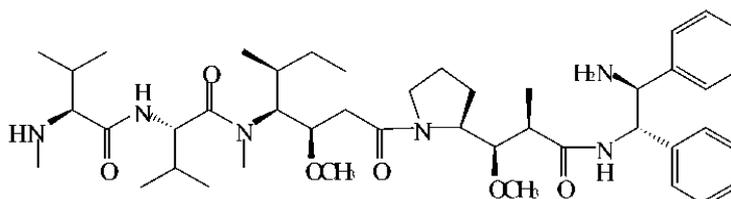
(IV)



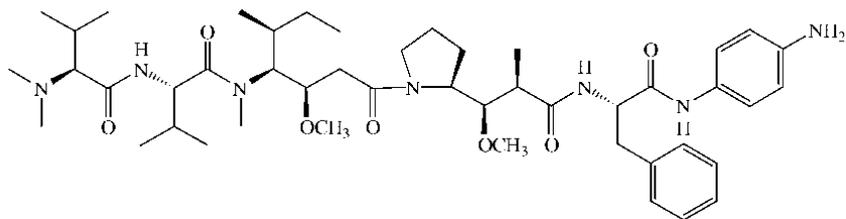
(V)



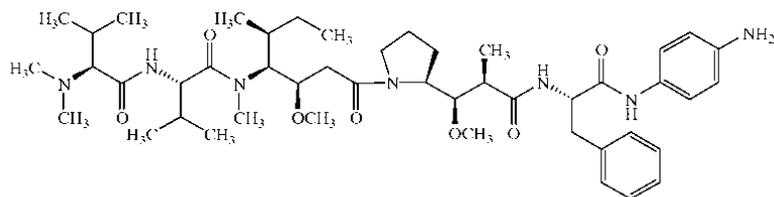
(VI)



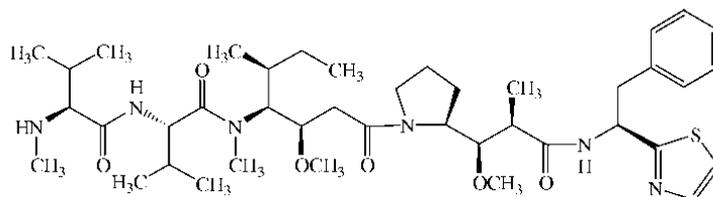
(VII)



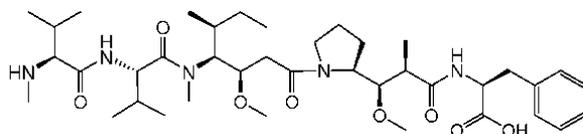
(VIII)



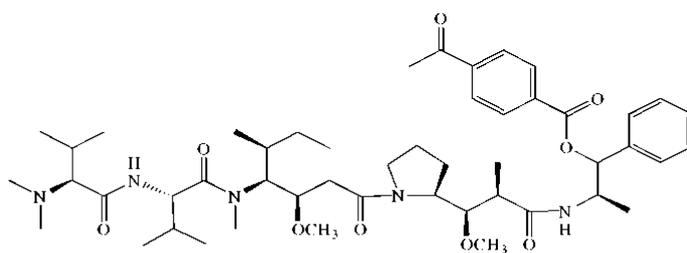
(IX)



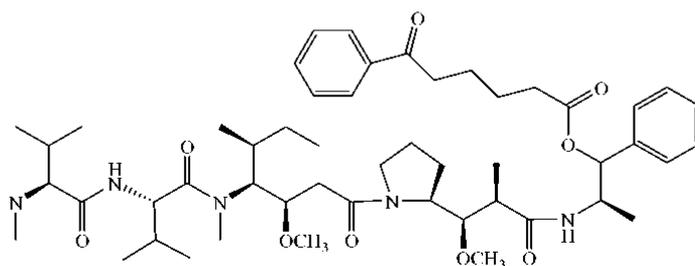
(X)



(XI)



(XII)



(XIII)

El agente citotóxico puede ser un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, el maitansinoide es maitansina o un enlazador de fármaco que contiene maitansina, tal como DM-1 o DM-4 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:127-131).

5 Como alternativa a los anticuerpos pueden usarse otros agentes de unión a CD70. Dicho resto de unión a CD70 puede incluir una o más CDR de un anticuerpo que se une a CD70 y reduce o inhibe la proliferación de las células que expresan CD70 cuando se conjuga con un agente citotóxico. Típicamente, la proteína es multímero, más típicamente un dímero.

10 Otros restos de direccionamiento a CD70 pueden incluir CD27 y variantes o fragmentos de la misma que se unen a CD70. Los restos de unión a CD70 pueden incluir, además, péptidos, ligandos y otras moléculas que se unen específicamente a CD70.

15 Otros restos de direccionamiento a CD70 útiles en los métodos descritos en el presente documento pueden identificarse usando cualquier método adecuado para la exploración de interacciones proteína-proteína. Típicamente, las proteínas se identifican inicialmente por su capacidad de unirse específicamente a CD70, después por su capacidad de ejercer un efecto citostático o citotóxico sobre linfocitos activados o células cancerosas que expresan CD70 cuando se conjugan con un agente citotóxico o citostático. Los métodos que pueden emplearse incluyen técnicas de "clonación de interacción" que incluyen sondar bibliotecas de expresión con CD70 marcado de una manera similar a la técnica de sondado con anticuerpo de bibliotecas de λ gt11. (Véase, por ejemplo, Blonar y Rutter, 1992, Science 256:1014-1018). Otro método es el sistema de doble híbrido (Chien *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582 y está disponible en el mercado a través de Clontech (Palo Alto, CA).

25 Una vez identificada la proteína de unión a CD70, se determina su capacidad (sola o cuando se multimeriza o fusiona a un dominio de dimerización o multimerización o se conjuga con un resto citotóxico o citostático) para ejercer un efecto citostático o citotóxico sobre células cancerosas que expresan CD70 (cuando se conjuga con un agente citotóxico) de una forma similar a la que se utiliza para un anticuerpo.

30 **III. Detección de CD70**

Las muestras a ensayar para aplicaciones de diagnóstico pueden obtenerse por procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, biopsia. CD70 típicamente se detecta por un inmunoensayo en el que una muestra que contiene células que se sabe o se sospecha que proceden de un cáncer (por ejemplo, cáncer pancreático o de ovario) se pone en contacto con un anticuerpo. Después del contacto, se determina la presencia o ausencia de un acontecimiento de unión del anticuerpo a las células en la muestra. La unión está relacionada con la presencia o ausencia del antígeno expresado en células cancerosas en esta muestra. Generalmente, la muestra se pone en contacto con un compañero de unión marcado específico para el anticuerpo anti-CD70, capaz de producir una señal detectable. Como alternativa, puede marcarse el propio anticuerpo anti-CD70. Los ejemplos de tipos de marcadores incluyen marcadores enzimáticos, marcadores radioisotópicos, marcadores no radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de toxina y marcadores quimioluminiscentes. La detección de una señal del marcador indica la presencia del anticuerpo unido específicamente a CD70 en la muestra.

45 La muestra sobre la que se realiza el ensayo puede estar fijada o congelada para permitir la formación de secciones histológicas. Preferentemente, las muestras de tejido escindidas se fijan en agentes de fijación de aldehído tales como formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído; o agentes de fijación de metales pesados tales como cloruro de mercurio. Más preferentemente, las muestras de tejido escindidas se fijan en formalina y se incluyen en cera de parafina antes de su incubación con el anticuerpo. Una ventaja proporcionada por los especímenes fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE) es la conservación del detalle morfológico celular y arquitectónico en las secciones de tejido (véase, por ejemplo, Fox *et al.*, 1985, J. Histochem. Cytochem. 33:845-853). Opcionalmente, pueden tratarse especímenes de FFPE con citrato, EDTA, digestión enzimática o calor para aumentar la accesibilidad de los epítomos (véase, por ejemplo, Shi *et al.*, 1991, J Histochem Cytochem. 39:741-748).

50 Como alternativa puede aislarse una fracción de proteína de las células de un cáncer pancreático o de ovario conocido o supuesto y analizarse por ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación o similares. En otra variación, las células pueden analizarse con respecto a la expresión de CD70 por análisis FACS, preferentemente en combinación con otro marcador de células pancreáticas o de ovario.

60 En una variación adicional, puede extraerse ARNm de las células procedentes de cánceres pancreáticos o de ovario conocidos o supuestos. El ARNm o un ácido nucleico derivado del mismo, tal como un ADNc, puede analizarse posteriormente mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico que se une a ADN que codifica a CD70.

En otra variación, puede detectarse un cáncer pancreático o de ovario *in vivo* mediante la administración de un anticuerpo anti-CD70 marcado a un paciente y la detección del anticuerpo por la formación de imágenes *in vivo*.

65 La detección de CD70 en muestras de tejido puede ser cualitativa, cuantitativa o ambas. La detección cualitativa significa la detección de la presencia o ausencia de expresión de CD70. La expresión cuantitativa significa la

- determinación de un nivel de expresión de CD70. La presencia y/o nivel de CD70 en una muestra de tejido pancreático de ovario en cuestión puede determinarse (pero no necesariamente) con respecto a uno o más patrones. Los patrones pueden estar determinados histórica o contemporáneamente. El patrón puede ser, por ejemplo, una muestra pancreática o de ovario que se sabe que no es cancerosa procedente de un sujeto diferente, un tejido del paciente o de otro sujeto que se sabe que no expresa CD70 o una línea celular pancreática o de ovario. El patrón también puede ser la muestra de paciente bajo análisis en contacto con un anticuerpo irrelevante (por ejemplo, un anticuerpo inducido contra un antígeno bacteriano. Debido a que CD70 no se expresa en un grado significativo en el tejido pancreático u ovárico no canceroso, puede usarse dicho tejido no canceroso como un patrón de expresión cero (de fondo).
- 5
- 10 La presencia de una señal detectable de la unión de un anticuerpo anti-CD70 a CD70 con respecto a un patrón (si se usa) indica la presencia de CD70 en la muestra de tejido y el nivel de unión detectable proporciona una indicación del nivel de expresión de CD70. En ensayos realizados en secciones de tejido, el nivel de expresión puede expresarse como un porcentaje del área de superficie de la muestra que muestra expresión detectable de CD70. Como alternativa o adicionalmente, el nivel (intensidad de expresión) puede usarse como medida de la expresión total en la muestra o
- 15 de las células que expresan CD70 en la muestra.

IV. Diagnóstico, pronóstico, diseño y supervisión del tratamiento

- La detección de la expresión de CD70 en una muestra de tejido pancreático o de ovario es una indicación de que la muestra es cancerosa. De forma similar, la detección de expresión de CD70 en otra muestra de paciente es una indicación de que el paciente tiene cáncer de pulmón, de cabeza y cuello (laringe o faringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo de células claras y papilar, carcinoma colorrectal o carcinoma de vejiga. Los anticuerpos usados para aplicaciones terapéuticas se unen específicamente a un dominio extracelular de los antígenos CD70 nativos. La indicación de cáncer proporcionada por la presencia y/o nivel de CD70 puede combinarse con medios de diagnóstico, tales como el examen interno o externo de un paciente por un médico, rayos X, exploración CT (tomografía computarizada), exploración PET (tomografía de emisión de positrones), exploración PET/CT, ultrasonidos MRI (imágenes de resonancia magnética), endoscopia, ERCP (colangiopancreatografía retrógrada endoscópica), examen histológico y cultivo de tejidos para llegar a un diagnóstico global.
- 20
- 25
- 30

- Quizás de mayor relevancia para el médico, la presencia y nivel de CD70 proporciona información útil para diseñar un protocolo de tratamiento para el paciente, y en particular administrar un anticuerpo contra CD70, un derivado, un ADC u otro agente de unión a un paciente. Debido a la ausencia esencial de expresión detectable de CD70 en el tejido pancreático o de ovario normal, la presencia de este receptor en un cáncer proporciona una diana para el tratamiento terapéutico. Cuando mayor es el nivel de expresión de CD70 y/o el porcentaje de un tumor que expresa CD70, es más probable que el tratamiento sea eficaz. El análisis continuado de CD70 después del tratamiento proporciona un medio para supervisar si el tratamiento es eficaz, una reducción en el nivel de la señal positiva para CD70 (es decir, como una indicación de la presencia de células cancerosas positivas para CD70) indica que el tratamiento es eficaz.
- 35
- 40

V. Pacientes susceptibles de tratamiento

- Los pacientes susceptibles de tratamiento por los métodos normalmente tienen niveles detectables de CD70 en su tejido pancreático, de ovario u otros tejidos junto con otros signos o síntomas de cáncer como se ha descrito anteriormente. Existe una diversidad de subtipos y estadios del cáncer, tanto pancreático como de ovario, como se describe con más detalle más adelante. Algunas veces, los pacientes tratados por los presentes métodos se han sometido a otros tipos de tratamiento previamente (por ejemplo, cirugía, quimioterapia y/o radiación) sin inducir la remisión o incluso la ralentización del crecimiento del cáncer. En algunos de estos pacientes, el cáncer es refractario al tratamiento por una o más de dichas terapias.
- 45

- 50 Algunos pacientes con riesgo de cáncer pancreático también pueden tratarse profilácticamente antes de que aparezcan los signos y síntomas de la enfermedad. Dichos individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado estas enfermedades y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos.

A. Pacientes con cáncer pancreático

- El cáncer pancreático es un tumor maligno dentro de la glándula pancreática. Casi el 90 % de los pacientes con cáncer pancreático tienen más de 55 años. La edad media en el momento en el que se encuentra este cáncer es 72. Los factores de riesgo de cáncer pancreático incluyen: la edad, el género masculino, etnia africana, hábito tabáquico, dietas altas en carne, obesidad, diabetes, pancreatitis crónica (se ha asociado, pero no se sabe que sea causal), exposición ocupacional a ciertos pesticidas, colorantes y agentes químicos relacionados con la gasolina, antecedentes familiares, infección por *Helicobacter pylori*, gingivitis o enfermedad periodontal. (Pancreatic Cancer. Von Hoff *et al.*, ed., Maine; 2005). Solo del 10 al 15 % del cáncer pancreático se considera hereditario. Algunos marcadores genéticos que están relacionados con el cáncer pancreático pueden incluir mutaciones en el gen PNCA1, PALLD o BRCA2 (véase, por ejemplo, Banke *et al.*, 2000, Med. Clin. North Am. 84: 677-690; Meckler *et al.*, 2001, Am. J. Surg. Path. 25: 1047-1053; Pogue-Geile *et al.*, 2006, PLoS Med. 3: e516; Murphy *et al.*, 2002, Cáncer Res. 62: 3789-3793).
- 60
- 65

Sin embargo, no todos los pacientes en las categorías de riesgo reconocidas actualmente desarrollarán cánceres pancreáticos. Muchos cánceres pancreáticos aparecen “esporádicamente” (es decir, en pacientes sin antecedentes familiares).

5 Los individuos que padecen cáncer pancreático pueden reconocerse de acuerdo con la histología del tumor, obtenida en un informe de patología. La histología dicta muchos aspectos del tratamiento, gestión y pronóstico clínicos. Hay dos tipos principales de cáncer pancreático basándose en si el tumor empieza a partir de la glándula exocrina o endocrina del páncreas. Los tumores formados a partir de la glándula exocrina del páncreas son mucho más comunes. Aproximadamente el 95 % de los tumores pancreáticos son adenocarcinomas. El 5 % restante incluye otros tumores del páncreas exocrino (por ejemplo, cistadenomas serosos), cánceres de células acinares y tumores neuroendocrinos pancreáticos (tales como insulinoomas).

15 Los tumores endocrinos también se denominan tumores de células de islote y se dividen en varios subtipos. La mayoría de ellos son benignos, pero hay unos pocos que son cancerosos. Un tipo especial de cáncer (cáncer ampular) puede aparecer donde el conducto biliar del hígado y el conducto pancreático se vierten al intestino delgado. Como este tipo de cáncer con frecuencia produce signos tales como amarilleamiento de la piel y los ojos, normalmente se encuentra en un estadio anterior que la mayoría de los cánceres pancreáticos. Las probabilidades de tratamiento satisfactorio son mejores para los pacientes que padecen cáncer ampular.

20 La estadificación del cáncer pancreático puede realizarse de acuerdo con los criterios del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Los estadios del cáncer se etiquetan usando números romanos de I a IV indicando el estadio IV que el cáncer se ha extendido y es más grave. Específicamente el cáncer pancreático de estadio I incluye tumores que no se han extendido a ciertas áreas sensibles proscritas y que no ha implicado ganglios regionales o metástasis distal. El estadio II incluye tumores que se han extendido al interior del duodeno, al conducto biliar, a los tejidos “peripancreáticos” y que no ha implicado ganglios regionales o metástasis distal. El cáncer de estadio III incluye tumores que pueden haberse extendido o no a estas áreas y que han implicado ganglios regionales, pero no muestran indicios de metástasis distal. El estadio IVA incluye tumores que se han extendido al estómago, bazo, intestino grueso o a los vasos grandes adyacentes y que ha implicado ganglios regionales, pero no muestra indicios de metástasis distal. El estadio IVB incluye tumores pancreáticos de cualquier tipo con estado de ganglios de cualquier tipo y con indicios de metástasis distal. Aunque se hace referencia a este, el sistema de estadificación del cáncer pancreático rara vez se usa en su forma pura porque los estadios no coinciden completamente con el pronóstico del paciente o las opciones de tratamiento. Una alternativa es la clasificación de tres estadios (potencialmente reseccionable, localmente avanzado y metastásico), que se basa en los hallazgos radiológicos. También se consideran otros factores de pronóstico. El grado del cáncer que indica hasta qué punto las células tienen un aspecto anómalo bajo el microscopio se indica en ocasiones en una escala de G1 a G4, teniendo los cánceres G1 el aspecto de células más normal y teniendo el mejor resultado. Para los pacientes que tienen cirugía, el grado de resección, si se retira uno o todo el tumor también es importante con respecto al resultado. Esto algunas veces se indica en una escala de R0 a R2, indicando R0 que todo el tumor que puede verse se ha retirado e indicando R2 que parte del tumor que puede verse no puede retirarse.

40 Los síntomas del cáncer pancreático en sus primeras fases son inespecíficos y variados. Los síntomas comunes incluyen dolor en la parte superior del abdomen que típicamente se radia hacia la espalda y se alivia inclinándose hacia adelante (visto en carcinoma del cuerpo o cola del páncreas), pérdida de apetito, pérdida significativa de peso e ictericia sin dolor relacionada con obstrucción del conducto biliar (carcinoma de la cabeza del páncreas). Sin embargo, todos estos síntomas pueden tener múltiples causas distintas y no se limitan al cáncer pancreático.

B. Pacientes con cáncer de ovario

50 El cáncer de ovario es un cáncer que comienza en los ovarios. Normalmente aparece en mujeres de más de 50 años, pero también puede afectar a mujeres más jóvenes. Su causa es desconocida. Ciertas poblaciones tales como las mujeres judías Ashkenazies tienen un mayor riesgo, con frecuencia a una edad anterior que la población general. Las pacientes con un historial personal de cáncer de mama o antecedentes familiares de cánceres de ovario, mama u otros cánceres relacionados, especialmente si se producen a una edad joven, pueden tener un riesgo elevado. Una fuerte historia familiar de cáncer uterino, cáncer de colon u otros cánceres gastrointestinales puede indicar la presencia de un síndrome conocido como cáncer colorrectal sin poliposis hereditaria (HNPCC, también conocido como síndrome de Linch II), que confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Los estudios citogenéticos y las investigaciones de pérdida de heterocigosidad sugieren que algunos genes o regiones cromosómicas están implicadas en el inicio y la progresión del cáncer de ovario (véase, por ejemplo, Pejovic *et al.*, 1992, Genes Chromosomes Cancer, 4:58-68; Testa *et al.*, 1994, Cáncer Res., 54:2778-2784; Yang-Feng *et al.*, 1993, Int. J. Cáncer, 54:546-551). Los marcadores genéticos de riesgo para el cáncer de ovario incluyen, pero sin limitación, mutaciones en el gen BRCA1 o BRCA2 (Futreal *et al.*, 1994, Science, 266:120-122). Los pacientes con un fuerte riesgo genético de cáncer de ovario pueden considerar el uso de una ooforectomía preventiva después de finalizar la edad fértil. No todas las mujeres en categorías de riesgo reconocidas actualmente desarrollarán cánceres de ovario. La mayor parte de los cánceres de ovario se producen esporádicamente.

65

Los individuos que padecen cáncer de ovario pueden reconocerse de acuerdo con la histología del tumor, obtenida en un informe de patología. La histología dicta muchos aspectos del tratamiento, gestión y pronóstico clínicos. Hay tres tipos principales de cáncer de ovario basados en el tipo de células a partir de las que comienza el tumor y de si el tumor es benigno o canceroso. Los tumores de células germinales comienzan a partir de las células que producen los óvulos.

5 Los tumores estromales empiezan a partir de las células del tejido conectivo que sostienen el ovario y producen las hormonas femeninas, estrógeno y progesterona. Los tumores epiteliales empiezan a partir de las células que cubren la superficie externa del ovario. La mayoría de los cánceres de ovario son tumores epiteliales, procediendo una minoría de los tumores de las células germinales o estromales.

10 El cáncer de ovario con frecuencia es primario, pero también puede ser secundario, el resultado de metástasis de un cáncer primario en cualquier otra parte del cuerpo. Por ejemplo, de cáncer de mama o de cáncer gastrointestinal (en cuyo caso, el cáncer de ovario es un cáncer de Krukenberg). El tumor epitelial-estromal de la superficie puede originarse en el revestimiento de la cavidad abdominal, en cuyo caso el cáncer de ovario es secundario a un cáncer peritoneal primario, pero el tratamiento es básicamente el mismo que en el caso del cáncer de ovario primario de este tipo.

15 En los cánceres de ovario, los estadios de cáncer son los siguientes: el estadio I se limita a uno o los dos ovarios; el estadio II implica extensión pélvica o implantes; el estadio III implica metástasis peritoneal microscópica más allá de la pelvis; o se limita a la pelvis con extensión al intestino delgado o mesenterio; y el estadio IV implica metástasis distantes tales como en el hígado o fuera de la cavidad peritoneal.

20 El cáncer de ovario temprano es con frecuencia asintomático, o produce síntomas únicamente leves que pueden ignorarse por el paciente debido a que los síntomas son vagos o inespecíficos. Los síntomas pueden incluir distensión abdominal, dolor pélvico o abdominal, problemas al comer o sensación rápida saciedad, síntomas urinarios, tales como sensación urgente o frecuente de necesidad de orinar. (Véase, por ejemplo, Smith *et al.*, 2005, Cancer 104(7):1398-1407; The consensus statement released by the American Cancer Society, the Gynecologic Cancer Foundation, and the Society of Gynecologic Oncologists el 12 de junio de 2007). Más del 60 % de las pacientes que presentan este cáncer ya tienen un cáncer en estadio III o IV, cuando ya se ha extendido más allá de los ovarios.

30 C. Otros pacientes con cáncer

Otros pacientes susceptibles de tratamiento mediante los métodos normalmente tienen niveles detectables de CD70 en muestras de cáncer de pulmón, de cabeza y cuello (laringe o faringe), melanoma, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tal como linfoma folicular, carcinoma de células renales, incluyendo de células claras y papilar, carcinoma colorrectal o carcinoma de vejiga. Dichos pacientes pueden tener también otros signos o síntomas de cáncer. Algunas veces, los pacientes tratados por los presentes métodos se han sometido a otros tipos de tratamiento previamente (por ejemplo, cirugía, quimioterapia y/o radiación) sin inducir la remisión o incluso la ralentización del crecimiento del cáncer. En algunos de estos pacientes, el cáncer es refractario al tratamiento por una o más de estas terapias.

40 Algunos pacientes con riesgo de cáncer también pueden tratarse profilácticamente ante de que aparezca los signos y síntomas de la enfermedad. Dichos individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado estas enfermedades y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis en marcadores genéticos o bioquímicos.

45 VI. Métodos de tratamiento

Los presentes inventores describen métodos de tratamiento o profilaxis de cáncer pancreático o de ovario mediante los anticuerpos, derivados y ADC, y otros agentes de unión anti-CD70 (colectivamente agentes) desvelados en el presente documento. Las composiciones pueden administrarse a un paciente.

50 Para administrar los agentes, pueden usarse diversos sistemas de liberación incluyendo las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los agentes pueden administrarse, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, y similares) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local.

60 Los agentes pueden administrarse por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo una membrana, tal como una membrana sialástica, o una fibra.

Como alternativa, los agentes pueden liberarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, puede usarse una bomba (véase Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Como alternativa, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release* (Langer & Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen & Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger & Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. Véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; Doring *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Otros sistemas de liberación controlada se analizan, por ejemplo, en Langer, *supra*.

Los agentes pueden administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del agente y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica típicamente incluye uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, harina de arroz, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, agentes para tamponar el pH (por ejemplo, aminoácidos) y/o agentes de solubilización o estabilización (por ejemplo, tensioactivos no iónicos tales como tween o azúcares tales como lactosa, trehalosa o similares). Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, capsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en *Remington's Pharmaceutical Sciences* de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico o proteína, típicamente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones corresponden al modo de administración.

Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, el agente farmacéutico también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para reducir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobrecillo que indica la cantidad de agente activo. Cuando el agente farmacéutico se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica, estéril. Cuando el agente farmacéutico se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de forma que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

La cantidad del agente que es eficaz en el tratamiento o profilaxis del cáncer pancreático o de ovario puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también depende de la vía de administración, y del estadio del cáncer pancreático o de ovario, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en un cultivo celular.

Por ejemplo, la toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes puede determinarse en cultivos celulares o animales experimentales por procedimientos farmacéuticos convencionales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los agentes que presentan grandes índices terapéuticos. Cuando un agente presenta efectos secundarios tóxicos, puede usarse un sistema de liberación que dirija el agente al sitio del tejido afectado para minimizar los posibles daños en células que no expresan CD70 y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

En general, la dosificación de un anticuerpo, derivado o ADC administrado a un paciente con un cáncer que expresa CD70 típicamente es de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Más típicamente, la dosis administrada a un sujeto es de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, incluso más típicamente de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg o de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg de peso corporal del sujeto. En general, los anticuerpos humanos tienen una mayor semivida dentro del cuerpo humanos que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria contra las proteínas extrañas. De esta manera, con frecuencia es posible utilizar dosificaciones inferiores de ADC que comprenden anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos y una administración menos frecuente.

Los anticuerpos contra CD70, derivados y ADC también pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos para el tratamiento o profilaxis del cáncer pancreático o de ovario. Por ejemplo, una terapia de combinación puede incluir un segundo agente citostático o citotóxico (por ejemplo, un agente citostático o citotóxico no conjugado tal como los usados convencionalmente para el tratamiento de cánceres). La terapia de combinación

5 también puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente que se dirige a un receptor o complejo receptor distinto de CD70 en la superficie de células cancerosas que expresan CD70. Típicamente, dicho anticuerpo o ligando se une a un receptor de la superficie celular en células cancerosas que expresan CD70 y aumenta el efecto citotóxico o citostático del anticuerpo anti-CD70 liberando una señal citostática o citotóxica en las células cancerosas que expresan CD70.

10 Otros fármacos que pueden administrarse con el agente incluyen inhibidores de factores de crecimiento, o factores anti-angiogénesis. Por ejemplo, un fármaco denominado erlotinib, un inhibidor de la tirosina quinasa del receptor del factor del crecimiento epidérmico, puede usarse para tratar el cáncer pancreático avanzado. (Bareschino *et al.*, 2007, Ann Oncol. Suppl 6: 35-4). Dicha administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre

15 parámetros de la enfermedad (por ejemplo, gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de recaídas).

Los presentes métodos pueden combinarse con otros medios de tratamiento tales como cirugía, radiación, terapia dirigida, inmunoterapia, uso de inhibidores de factores de crecimiento o factores anti-angiogénesis.

20 La cirugía es un tratamiento preferido y frecuentemente es necesaria para obtener un espécimen de tejido para el diagnóstico diferencial mediante su histología. Se atribuye una mayor supervivencia a una estadificación más precisa de la enfermedad y una mayor tasa de escisión quirúrgica agresiva del tumor en el abdomen. El tipo de cirugía depende de lo extendido que esté el cáncer cuando se diagnostica (del estadio del cáncer), así como del supuesto tipo

25 y grado del cáncer.

En el caso de pacientes que padecen adenocarcinoma pancreático, el cirujano puede realizar el procedimiento de Whipple (también denominado pancreaticoduodenectomía). En este procedimiento, se retira la cabeza del páncreas y algunas veces el cuerpo de páncreas junto con partes del estómago y el intestino delgado, la vesícula biliar, parte del

30 conducto biliar común y algunos ganglios linfáticos cercanos. (Véase, por ejemplo, Michalski *et al.*, 2007, Nat. Clin. Pract. Oncol. 4(9): 526-35). En el caso de pacientes que sufren tumores endocrinos del páncreas (tumores de células de islotes), la cirugía es una opción viable. (Véase, por ejemplo, Akerstrom y Ffellman, 2007, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 21 (1): 87-109).

35 En las pacientes con cáncer de ovario, el cirujano puede extirpar uno (ooforectomía unilateral) o los dos ovarios (ooforectomía bilateral), las trompas de Falopio (salpingectomía) y el útero (histerectomía). En el caso de algunos tumores en un estadio muy temprano tales como los que están en estadio I, solo se retirará el ovario y la trompa de Falopio implicados ("salpingo-ooforectomía unilateral" USO), especialmente en mujeres jóvenes que desean

40 conservar su fertilidad. En caso de malignidad avanzada, cuando no es posible la resección completa, se elimina el máximo de tumor posible (cirugía reductora). En los casos en los que este tipo de cirugía es satisfactoria, el pronóstico mejora en comparación con pacientes en los que se dejan masas tumorales grandes (de más de 1 cm de diámetro). Las técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas pueden facilitar la eliminación segura de tumores muy grandes (mayores de 10 cm) con menos complicaciones quirúrgicas. (Véase, por ejemplo, Ehrlich *et al.*, 2007, J. Pediatr. Surg. 42 (5): 890-3).

45 La quimioterapia se refiere al uso de fármacos anticancerosos o citotóxicos para destruir células cancerosas. La quimioterapia puede administrarse al paciente antes o después de la cirugía. Dependiendo de la histología del tumor, algunos tipos de tumores (particularmente el teratoma) no son sensibles a la quimioterapia. Puede usarse quimioterapia intravenosa con fármacos tales como, por ejemplo, gemcitabina, 5-fluorouracilo, cisplatino o mitomicina

50 C para tratar el cáncer pancreático. Puede usarse quimioterapia intravenosa tal como gemcitabina, topotecán, doxorubicina, doxorubicina liposomal, carboplatino o paclitaxel para tratar el cáncer de ovario. La quimioterapia que es parcialmente intravenosa y particularmente intraperitoneal también puede mejorar el tiempo de supervivencia media. (The Chemotherapy Source Book (3ª edición). Ed. Perry. Lippincott, Williams y Wilkins, 2001; Oxford Textbook of Palliative Medicine. (2ª Ed.) Derek Doyle *et al.* Oxford University Press. 1999).

55 La radioterapia es un tratamiento con rayos de alta energía, tales como rayos X, para destruir o contraer las células cancerosas mientras se hace el mínimo daño posible a las células normales. La radiación puede administrarse al paciente antes o después de la cirugía. También puede usarse radioterapia para tratar el cáncer pancreático que no se ha extendido pero no puede extirparse por cirugía. La radioterapia no se usa con frecuencia para tratar el cáncer de

60 ovario, pero puede usarse ocasionalmente si es apropiado. Puede usarse una combinación de radioterapia y quimioterapia para pacientes cuyos tumores están demasiado extendidos como para extirparse con cirugía.

A un paciente sometido a tratamientos de cirugía, quimioterapia o radioterapia se le puede administrar simultáneamente un anticuerpo anti-CD70, derivado o ADC. Como alternativa, un paciente puede someterse a cirugía,

65 quimioterapia o radioterapia antes o después de la administración de un anticuerpo anti-CD70, derivado o ADC, al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo, al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un

mes, o tres meses antes o después de la administración del ADC o derivado de ADC.

VII. Kits

5 Los presentes inventores describen kits de diagnóstico para uso con los métodos de detección anteriores. Los kits típicamente contienen un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a CD70 desnaturalizado útil para la detección como se ha descrito anteriormente. Uno o más recipientes adicionales pueden incluir elementos, tales como reactivos o tampones, a usar en el ensayo. Dichos kits pueden también, o como alternativa, contener un reactivo de detección que contiene un grupo indicador adecuado para la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo.

15 Los presentes inventores también describen kits farmacéuticos para tratar cánceres pancreáticos y de ovario. Típicamente, dichos kits contienen reactivos formulados como una composición terapéutica como se describe en el presente documento, y pueden estar en cualquiera de una diversidad de formas adecuadas para la distribución en un kit. Dichas formas pueden incluir un líquido, polvo, comprimido, suspensión y formulación similar para proporcionar los agentes, tales como anticuerpos anti-CD70, derivados o ADC. Los kits también pueden incluir un diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua estéril) para inyección, reconstitución o dilución del anticuerpo, derivado o ADC, liofilizados.

20 Los presentes inventores también describen kits combinados para diagnóstico y terapia. Dichos kits típicamente incluyen al menos un anticuerpo que se une preferentemente a CD70 desnaturalizado con respecto al CD70 nativo para uso en la detección en secciones de tejido fijadas, y un anticuerpo diferente que se une a CD70 nativo al menos tan bien, si no mejor, que a CD70 desnaturalizado para uso en tratamiento.

25 Los kits también incluyen típicamente una etiqueta o instrucciones para uso en los métodos de detección y/o tratamiento descritos en el presente documento. La etiqueta o las instrucciones se refieren a cualquier material escrito 41 o grabado que se adjunta o acompaña de otra manera a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Puede ser una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicha nota la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. La etiqueta o las instrucciones también pueden incluir folletos y prospectos de aviso, materiales de envasado, instrucciones, casetes de audio o vídeo, discos de ordenador, así como estar directamente impresos sobre los kits farmacéuticos.

35 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se incluya dentro de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ). Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron en Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, u otros proveedores.

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1. Preparación de anticuerpos monoclonales SG-21.1C1.B3 y SG-21.5D12.C3.

45 Se produjeron anticuerpos monoclonales SG-21.1C1.B3 y SG-21.5D12.C3 usando células B de bazo o ganglios linfáticos extirpados de un ratón que se expuso varias veces al inmunógeno, el dominio extracelular de CD70 desnaturalizado (ECD de CD70). Estas células B después se fusionaron con células tumorales de mieloma para producir hibridomas. De esta manera se produjeron grandes cantidades de anticuerpos monoclonales a partir de estos hibridomas. Los hibridomas se diluyeron para asegurar la clonalidad y el crecimiento.

50 Se ensayaron anticuerpos de los diferentes clones con respecto a su capacidad de unirse al antígeno CD70 desnaturalizado con un ensayo tal como un ELISA usando Marcador-CD70 o una exploración FMAT diferencial (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando células 293F fijadas que expresaban CD70 de mono *Cynomolgus* ("cyno") y células L540cy desnaturalizadas, que expresan CD70. Como control negativo se usaron células 293F y L540cy no transfectadas. (Algunas células L540cy eran positivas para CD70).

55 Los resultados mostraron que más de 100 hibridomas fueron positivos en el ensayo con respecto a su capacidad de unirse a CD70 desnaturalizado. Se seleccionaron anticuerpos de dos posibles hibridomas, SG-21.1C1.B3 ("1C1") y SG-21.5D12.C3 ("5D12") para inmunohistoquímica.

60 **Ejemplo 2: Preparación de muestras fijadas con formalina incluidas en parafina (FFPE)**

Se prepararon tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina de acuerdo con métodos convencionales, como se describe en *Theory and Practice of Histotechnology*, segunda edición. 1980, Sheehan, D.C. y Hrapchak, B.B., editors (Battelle Press (Columbus, OH). Capítulo 3, pág. 59-78).

65

La preparación de las células por FFPE fue similar a la de la preparación de tejidos. En resumen, se cultivaron células en medio de cultivo adecuado a aproximadamente 15.000 células/ pocillo un día antes de la fijación. Las células se fijaron como se indica a continuación: las células se lavaron 2 veces con PBS y después se fijaron con formalina al 10 % a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS y después se permeabilizaron con PBS + Tritón X-100 al 0,5 % a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células después se lavaron 1 vez con PBS y se almacenaron en PBS + azida sódica al 0,02 % a 4 °C. Antes de la exploración FMAT, se retiró el PBS + azida y la placa se bloqueó con PBS + suero de cabra al 5 % a temperatura ambiente durante 30 minutos.

10 **Ejemplo 3: Preparación de micromatrices de tejido para inmunohistoquímica**

Se obtuvieron micromatrices de tejido con secciones de tejido FFPE a partir de fuentes comerciales, incluyendo US Biomax, TriStar o Cybrdi. También se prepararon micromatrices de tejido de acuerdo con los protocolos de construcción de Yale Tissue Microassay Construction Protocols, versión 1.0, y actualizaciones posteriores.

15 **Ejemplo 4. Desarrollo de anticuerpos monoclonales SG-21.1C1.B3 y SG-21.5D12.C3 como reactivos de inmunohistoquímica para muestras de FFPE**

20 A. Ensayo inmunohistoquímico de clones de CD70

Se fabricó una construcción de expresión que codificaba CD70 de mono *Cynomolgus* por clonación de un gen de CD70 de *Cynomolgus* de longitud completa en un vector de expresión. Esta construcción se introdujo por transfección en células 293F. Estas células transfectadas 293F:CD70 sirvieron como control positivo para la tinción con anticuerpos 1C1 y 5D12. La línea de células 293F parental sirvió como control negativo. Para la tinción del tejido, se utilizaron como control positivo células 786-O, que expresan CD70.

Las células y tejidos se fijaron e incluyeron en cera de parafina de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La tinción IHC y la recuperación antigénica se realizaron usando un sistema Bond-max™ de Vision BioSystems (ahora Leica Microsystems). La recuperación antigénica se realizó durante 40 minutos usando el método de recuperación en EDTA. Como alternativa, la recuperación de antígeno se realizó usando el sistema de recuperación de antígeno Trilogy (Cell Marque, Hot Springs, AR) a una temperatura de 99-100 °C durante 1 hora.

Tanto el anticuerpo primario 1C1 como el anticuerpo primario 5D12 tiñeron fuertemente todas las células transfectadas 293F:CD70 fijadas, mientras que no se detectó ninguna tinción en las células 293 parentales. Los resultados también mostraron una fuerte tinción en las células 786-O (un carcinoma de células renales), mientras que se detectó tinción de fondo en el control de xenoinjerto de Ramos.

El clon 1C1 se subclonó adicionalmente y se seleccionó un subclón, 1C1-B3 (SG-21.1C1.B3). De forma similar, se subclonó adicionalmente 5D12 y se seleccionó un subclón, 5D12-C3 (SG-21.5D12.C3). Estos dos subclones se purificaron y se usaron como anticuerpos primarios para teñir muestras de xenoinjerto 786-O y xenoinjerto de Ramos. Los resultados mostraron que la subclonación y purificación de 1C1-B3 5D12-C3 eliminó la tinción del fondo en el xenoinjerto de Ramos.

Se han depositado hibridomas que producen los anticuerpos anti-CD70 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. La línea celular denominada SG-21.1C1.B3, que produce el anticuerpo 1C1 que tiene el número de registro de ATCC PTA-8733 se ha depositado el 24 de octubre de 2007 en la ATCC; la línea celular denominada SG-21.5D12.C3 que produce el anticuerpo 5D12 que tiene el número de registro de ATCC PTA-8734 se ha depositado el 24 de octubre de 2007 en la ATCC.

50 B. Transferencia de Western con anticuerpos SG-21 1C1 y 5D12 en comparación con el anticuerpo 2B3

Para determinar si los anticuerpos SG-21 1C1 y 5D12 detectan CD70 en lisados de células y tejidos, se realizaron experimentos de transferencia de Western. También se usó otro anticuerpo de unión a CD70, 2B3, para comparación. Se prepararon preparaciones de membrana a partir de células 786-O, 293F:cynoCD70 (que expresan CD70 cyno) y células 293F como control negativo. Para preparar extractos de membrana, las células se lisaron en solución tampón hipotónica y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para retirar el desecho celular. Los sobrenadantes después se centrifugaron a 100.000 x g durante 30 minutos a 4 °C para sedimentar las fracciones de membrana. Las fracciones de membrana (sedimento) se disolvieron en NP40 al 0,5 % en Tris 50 mM más NaCl 150 mM y EDTA 5 mM. Toda la preparación de las muestras se realizó en presencia de inhibidores de proteasa para mantener intacto CD70. La cantidad de las proteínas se midió a 570 nm usando un kit BCA (Pierce). También se prepararon ECD de CD70 (dominio extracelular de CD70) y CD70-ECD con un marcador Flag por métodos convencionales. Las muestras de proteínas se desnaturalizaron a 90 °C durante 3 minutos y se enfriaron en hielo durante 3 minutos. Las muestras se separaron usando SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para la detección. Se prepararon cuatro geles de SDS-PAGE y membranas idénticos. Las membranas se bloquearon en PBS con BSA al 1 % y leche desnatada al 2 % con Tween (polisorbato) al 0,05 %. Después se añadió cada anticuerpo primario a la solución a 0,5 µg/ml y se dejó incubar durante 4 horas a temperatura ambiente en PBS con Tween al 0,05 %. Las

membranas se lavaron y se añadió un conjugado de anticuerpo secundario-enzima, que reconocía el anticuerpo primario, y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron y se incubaron con un sustrato quimioluminiscente para detectar CD70.

5 Haciendo referencia a la Figura 1, los resultados mostraron que los anticuerpos SG-21 1C1 y 5D12 detectaban CD70 en las células 786-O y los transfectantes 293F:CD70, pero no en el control negativo de células 293F. Particularmente, las bandas detectadas eran de tamaño idéntico en las células 786-O y los transfectantes 293F:CD70. El anticuerpo SG-21 2B3 no detectó CD70 en muestras de 786-O y 293:cynoCD70, pero detectó ECD de CD70 y marcador-ECD de CD70. El resultado indicó que los anticuerpos 1C1 y 5D12 detectaban CD70 en las muestras.

10

C. Expresión de CD70 en líneas de células tumorales y no tumorales usando el anticuerpo SG21.1C1

Se obtuvieron micromatrices de tejido a partir de fuentes comerciales o se prepararon a medida, que contenían muestras de los siguientes cánceres: carcinoma de mama, carcinoma de ovario, mesotelioma, osteosarcoma, carcinoma de próstata, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, astrocitoma anaplásico, cáncer uterino, cáncer embrionario, carcinoma epidermoide, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma histiocítico no T, no B, linfoma no Hodgkin (NHL) linfoma de Burkitt, linfoma NHL folicular, leucemia mieloide aguda (AML), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), eritroleucemia, carcinoma de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), carcinoma de células renales (RCC), RCC de tipo de células claras, RCC de tipo papilar, melanoma, carcinoma pancreático y carcinoma de vejiga. También se usaron las siguientes células o líneas celulares: línea celular linfoblastoide B transformada con virus de Epstein-Barr (EBV-LCL), células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC), células endoteliales vasculares humanas normales (HUVEC), células mononucleares de sangre normal (PBMC), células endoteliales aórticas humanas normales (HAEC), células endoteliales renales humanas normales (HREC), células endoteliales microvasculares de pulmón humanas normales (HMVEC-L), células endoteliales microvasculares dérmicas endoneonatales humanas normales (HMVEC-neo) y células endoteliales de arteria pulmonar humana normales (HPAEC).

Las micromatrices de tejidos se inmunotifieron con anticuerpos SG21.1C1 usando el protocolo descrito anteriormente. Se observó tinción en las siguientes líneas celulares: línea celular de carcinoma de ovario SK-OV-3; línea celular de glioblastoma GMS-10; líneas celulares de mieloma múltiple LB, LP-1, AMO-1, I-310 (MM.1R), C2E3 (MM.1S), MOLP-8, JJN-3 y L363; líneas celulares de linfoma de Hodgkin KMH2, HS445, RPMI-1666, L248 y HD-M-YZ; EBV-LCL WIL2-S, Farage y IM-9; línea celular de NHL folicular WSU-NHL; líneas celulares de RCC de tipo de células claras Caki-1, Caki-2, 786-O y 769-P; líneas celulares de RCC de tipo papilar CAL54, A498; RCC SK-RC-6 y SK-RC-7; líneas celulares de melanoma A375M y A375SM, línea celular de carcinoma pancreático PANC-1 y carcinoma de vejiga T24. La tinción de algunas líneas celulares no identificadas era débil o mixta. Algunas líneas celulares tienen tinción citoplasmática. Con respecto a la tinción de las líneas celulares pancreática y de ovario, véanse las Figuras 2 y 3, respectivamente.

40 D. Tinción comparativa de anticuerpos 1C1 y 5D12

Se compararon anticuerpos 1C1 y 5D12 tiñendo líneas celulares 293F, 293F-cynoCF0, RCC Caki-1, amígdala normal, músculo esquelético, vejiga, tejidos linfoides (ganglio linfático, timo, bazo) de monos *Cynomolgus* normales, tejidos de timo, riñón y músculo esquelético humanos normales y tejidos de tumor pancreático. El protocolo de inmunotinción fue como se ha descrito anteriormente.

45 Los resultados mostraron que 1C1 y 5D12 teñían de forma similar las líneas celulares 293F y 293-cyno CD70 (datos no mostrados); RCC Caki-1 y tejido de amígdala de mono *Cynomolgus* (datos no mostrados); tejidos linfoides (ganglio linfático, timo, bazo) de monos *Cynomolgus* normales (datos no mostrados) y tejidos de tumor pancreático (véase la Figura 4). Se observó alguna tinción diferencial de 1C1 y 5D12 en tejidos de músculo esquelético humano y de mono normales y en tejidos de vejiga de mono normales en los que 5D12 teñía los tejidos, pero 1C1 no lo hacía. También se observó tinción diferencial en tejidos de riñón y timo humanos normales en los que 5D12 teñía el citoplasma.

Ejemplo 5: Expresión de CD70 en tejidos de colon normal y de cáncer colorrectal y en tejidos de páncreas normal y de cáncer pancreático con anticuerpo 1C1

55 Antes de evaluar el panel entero de tejidos tumorales de diferentes tipos de cáncer, primero se ensayó la expresión de CD70 en cánceres de colon y pancreático. El protocolo de inmunotinción se describió en el Ejemplo 4. El cromógeno usado para estos estudios fue Fast Red.

60 Los resultados mostraron que, en tejidos de colon normales, muy pocos linfocitos se tiñeron de forma positiva para CD70. Otras células fueron negativas para CD70. En una muestra de tejido de cáncer de colon, las células tumorales se tiñeron de forma positiva. En una segunda muestra de tejido de colon, las células tumorales fueron negativas, pero el estroma fue positivo. Análogamente, en tejidos pancreáticos normales, la tinción fue negativa para CD70. En una muestra de tejidos de cáncer pancreático las células tumorales fueron positivas y en una segunda muestra las células tumorales fueron negativas pero el estroma fue positivo (véase la Figura 5).

65

Ejemplo 6: Expresión de CD70 en tejidos tumorales con anticuerpo SG21.1C1

Se obtuvieron tejidos tumorales de los siguientes tipos de tumor: linfoma de Hodgkin, riñón, linfoma, mieloma múltiple, páncreas, laringe/faringe, ovario, colon y mama. Los tejidos normales y tumorales se prepararon de acuerdo con el protocolo de matriz de tejidos descrito en el Ejemplo 3 y el protocolo de inmunotinción fue como el descrito en el Ejemplo 4A. Como anticuerpo primario se usó el anticuerpo 1C1. La expresión inmunohistoquímica (IHC) se evaluó posteriormente basándose en la intensidad de tinción y el porcentaje de tumor implicado. La intensidad de tinción se clasificó de 1 a 4, indicando 1 tinción mínima; 2, tinción leve; 3, tinción moderada y 4, tinción fuerte. El porcentaje de tumor implicado también se clasificó de 1 a 4, indicando 1 0-5 %; 2, 5-25 %; 3, 25-75 % y 4, 75 %-100 %. Las mediciones fueron cualitativas. Para el linfoma de Hodgkin, se ensayó la expresión IHC de células positivas para CD70 basándose en la evaluación de células de Reed-Sternberg. Las células de Reed-Sternberg son células grandes de origen desconocido, normalmente multinucleadas, cuya presencia es la característica histológica común del linfoma de Hodgkin.

Los tejidos del tumor de linfoma de Hodgkin tuvieron el mayor porcentaje (97 % o 33/34) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El tumor de riñón tuvo el segundo porcentaje más alto (70 % o 14/20) de las células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El linfoma tuvo el tercer porcentaje más alto (61 % o 72/119) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El mieloma múltiple tuvo el cuarto porcentaje más alto (42 % o 13/31) de las células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El cáncer de páncreas tuvo el quinto porcentaje más alto (25 % o 35/140) de las células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales.

La Figura 6 ilustra un gráfico de intensidad de tinción y % de tinción de tumor para 35 de 140 muestras pancreáticas que dan una señal positiva para CD70. La figura muestra una relación compleja entre la intensidad de tinción y el porcentaje de tinción del tumor. Es decir, algunos tumores tienen un alto porcentaje de células que se tiñen, pero a baja intensidad, otros tienen un bajo porcentaje de células que se tiñen pero a alta intensidad y otros muestran intensidad de tinción intermedia y porcentaje intermedio de tinción de células. El cáncer de laringe/faringe tiene el sexto porcentaje más alto (22 % o 18/82) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El cáncer de ovario tuvo el séptimo porcentaje más alto (15 % o 37/241) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales.

La Figura 7 ilustra la intensidad de tinción y el porcentaje de tinción de tumores para 37 de 241 cánceres de ovario que tiñen CD70. Hubo alguna asociación entre la intensidad de tinción y el porcentaje de tinción de células. El cáncer colorrectal tuvo el séptimo porcentaje más alto (9 % o 17/194) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales. El cáncer de mama tuvo el menor porcentaje (2 % o 5/204) de células tumorales positivas para CD70 con respecto a las células en los tumores totales.

En resumen, basándose en la relación de tumores positivos para CD70/tumores totales, la intensidad de tinción (expresión de diana celular) y el porcentaje de implicación de tumor positivo para CD70 (expresión de diana del tumor), la clasificación de indicación general de los tipos de tumor es la siguiente: Hodgkin > riñón > linfoma > mieloma múltiple > pancreático > laringe/faringe > ovario > colorrectal > mama. Los resultados de todos los tejidos tumorales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Expresión de CD70 en diversos cánceres

Tipo de tumor	CD70+/Total	% de CD70+
Hodgkin	33/34	97
Riñón	204/283	72
Linfoma	72/119	61
Mieloma múltiple	13/31	42
Páncreas	35/140	25
Laringe/faringe	18/82	22
Ovario	37/241	15
Piel	4/30	13
Pulmón (todo)	40/475	8
Adenocarcinoma de pulmón	17/172	10
Colon	17/194	9
Mama	5/204	2

Ejemplo 7: Los conjugados de h1F6-fármaco muestran eficacia en una línea celular de carcinoma de ovario

Para confirmar la eficacia de conjugados del anticuerpo anti-CD70-fármaco conocidos contra líneas celulares representativas para estos nuevos cánceres, se prepararon células SKOV-3 y se ensayaron como se ha descrito, en general, previamente para otras líneas celulares. (Véase la publicación de patente internacional WO 2006-113909.) Las células se incubaron con los siguientes conjugados de anticuerpo anti-CD70-fármaco: h1F6-vc-MMAF(4), h1F6vc-MMAE(4), 1F6mc-MMAF(4), o h1F6mc-MMAF(8) o MMAF libre. (Véase en la memoria descriptiva y la

publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005-0238649 y 2006-0233794, la descripción de los enlazadores de fármacos. El número entre paréntesis después de cada conjugado indica la carga media de fármaco por anticuerpo). Las células SKOV- 3 se incubaron con los conjugados a las concentraciones indicadas durante 96 horas. Para estos estudios, se determinó la viabilidad usando Promega CelltiterGlo.

5

Tabla 2

h1F6vc-MMAF(4)	h1F6vc-MMAE(4)	h1F6mc-MMAF(4)	h1F6mc-MMAF(8)	MMAF
5 ng/ml	60 ng/ml	29 ng/ml	12 ng/ml	18 nM

Haciendo referencia a la Figura 8, los cuatro ADC anti-CD70 fueron activos contra esta línea celular de cáncer de ovario. Haciendo referencia a la Tabla 2, se muestran las CI50. Estas CI50 son coherentes con las presentadas para otras líneas celulares de cáncer que expresan CD70. Estos resultados confirman que los ADC anti-CD70 unidos a CD70 en esta línea celular de cáncer se internalizan y liberan la carga de auristatina.

10

Ejemplo 8: Los conjugados de h1F6-fármaco muestran eficacia en una línea celular de carcinoma pancreático transfectado con CD70

15

Para confirmar la eficacia de conjugados conocidos de anticuerpo anti-CD70 y fármaco contra líneas celulares representativas, se transfectaron las líneas celulares pancreáticas HPAFII, PANC-1 y MiaPaCa-2 con un ácido nucleico que codificaba CD70 de *Cynomolgus* modificado. Las células MiaPaCa-2 no expresan niveles detectables de proteína CD70. h1F6 se une a la proteína CD70 nativa expresada por estas líneas celulares transfectadas. La expresión de CD70 por las líneas celulares transfectadas se confirmó por análisis FACS (datos no mostrados). La actividad de h1F6 mc-MMAF(4) (SGN-75) se ensayó en las líneas celulares pancreáticas transfectadas, en general, como se ha descrito previamente para otras líneas celulares. (Véase el Ejemplo 7 y la publicación de patente internacional WO 2006-113909.) (El número entre paréntesis después del conjugado indica la carga media de fármaco por anticuerpo). Haciendo referencia a las Figuras 9A-C, las células se incubaron con el conjugado a las concentraciones indicadas durante 96 horas. Haciendo referencia a la Figura 9A, se muestra la actividad del conjugado sobre células HPAFII transfectadas. La viabilidad celular se determinó usando Promega CelltiterGlo. Haciendo referencia a las Figuras 9B y 9C, se muestra la actividad del conjugado sobre líneas celulares PANC-1 transfectadas y MiaPACa- 2 transfectadas. Para estos estudios, la viabilidad celular se determinó usando rezasurina, como se ha descrito previamente. La actividad PANC-1 de Promega CelltiterGlo. El conjugado mostró actividad citotóxica sobre todas esas líneas celulares *in vitro*.

20

25

30

Ejemplo 9: Los conjugados de h1F6-fármaco muestran eficacia en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático

Se implantaron en ratones desnudos (nu/nu) hembra (7 animales/grupo) trozos de tumor MiaPaCa transfectado con CD70 (preparados como se describe en el Ejemplo 8) mediante un trocar en el costado lateral derecho. La dosificación con SGN-75 o ADC de control sin unión (3 mg/kg) empezó cuando los tumores alcanzaron 100 mm³ (q4d x 4 ip). Los volúmenes tumorales se controlaron y los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó 1.000 mm³. Haciendo referencia a la Figura 10, los datos se representaron de 2 formas: A. Se representaron gráficos de volumen tumoral medio para cada grupo hasta que se sacrificaron uno o más animales. B. La curva de Kaplan-Meier muestra el tiempo necesario para que el tumor alcance 800 mm³ para animales individuales en cada grupo. El tratamiento con SGN-75 fue eficaz en este modelo de xenoinjerto.

35

40

Listado de secuencias

45

<110> Seattle Genetics, Inc. Ryan, Maureen

<120> Detección y tratamiento de cánceres pancreáticos, de ovario y otros, positivos para CD70

50

<130> 0070-00602PC

<150> 61/044.457

<151> 11-04-2008

55

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60

<211> 137

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 588 194 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 2
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 2

ES 2 588 194 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 3
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 3

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Asp
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Met Thr
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Thr Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

10

ES 2 588 194 T3

Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Gly Pro Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Arg Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gly Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 4

5

ES 2 588 194 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Lys Thr Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asp Leu Pro Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Thr Arg
130

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD70 humana desnaturalizada en una muestra de células o tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina que expresan CD70 humana, y que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de cadena pesada del anticuerpo SG-21.1C1 y de las CDR de región variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de cadena ligera del anticuerpo SG-21.1C1, como se produce por el hibridoma depositado en la ATCC y con el número de registro PTA-8733, o de las CDR de región variable de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de cadena pesada del anticuerpo SG-21.5D12 y de las CDR de región variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de cadena ligera del anticuerpo SG-21.5D12, como se produce por el hibridoma depositado en la ATCC y el número de registro PTA-8734.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es el anticuerpo SG-21.1C1 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y con el número de registro asignado PTA-8733.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es el anticuerpo SG-21.5D12 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y con el número de registro asignado PTA-8734.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que es la región variable de cadena pesada del anticuerpo SG-21.1C1 y una región variable de cadena ligera que es la región variable de cadena ligera del anticuerpo SG-21.1C1.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que es la región variable de cadena pesada del anticuerpo SG-21.5D12 y una región variable de cadena ligera que es la región variable de cadena ligera del anticuerpo SG-21.5D12.
6. Un método para detectar la expresión de CD70 en una muestra de tejido de un paciente, que comprende
- obtener una muestra de tejido de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe, mama, riñón, cerebro, colon, sangre o piel del paciente;
fijar la muestra de tejido y desnaturalizar CD70 en la muestra de tejido;
poner en contacto la muestra de tejido fijada con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
detectar la unión del anticuerpo a la muestra de tejido fijada para determinar si CD70 se expresa en la muestra;
en el que la expresión de CD70 en la muestra de tejido fijada indica una probabilidad de que el paciente tenga un cáncer que expresa CD70,
en el que la muestra se fija con formalina y se incluye en parafina.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende, además
- (a) diagnosticar un cáncer en el paciente basándose en la expresión de CD70 en la muestra, con respecto a una muestra de tejido de control; o
(b) pronosticar la presencia de cáncer en el paciente basándose en la expresión de CD70, con respecto a una muestra de tejido de control; o
(c) determinar un protocolo de tratamiento para el paciente, en el que la expresión detectable de CD70 es una indicación de que el protocolo de tratamiento incluye el tratamiento con un anticuerpo contra CD70 o un conjugado de anticuerpo y fármaco.
8. Un método para diagnosticar, pronosticar, determinar un protocolo de tratamiento o supervisar el tratamiento de un paciente que tiene cáncer de páncreas, ovario, pulmón, laringe, faringe, mama o piel, glioblastoma, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal o de vejiga, que comprende determinar la expresión de CD70 en células de una muestra procedente del páncreas del paciente, ovarios, pulmón, laringe, faringe, mama, riñón, cerebro, colon, sangre o piel del paciente, usando el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la presencia de una expresión detectable de CD70 se usa en el diagnóstico, pronóstico, determinación de un protocolo de tratamiento o supervisión del tratamiento del paciente, en el que la expresión de CD70 se determina en las células en una muestra fijada con formalina e incluida en parafina.

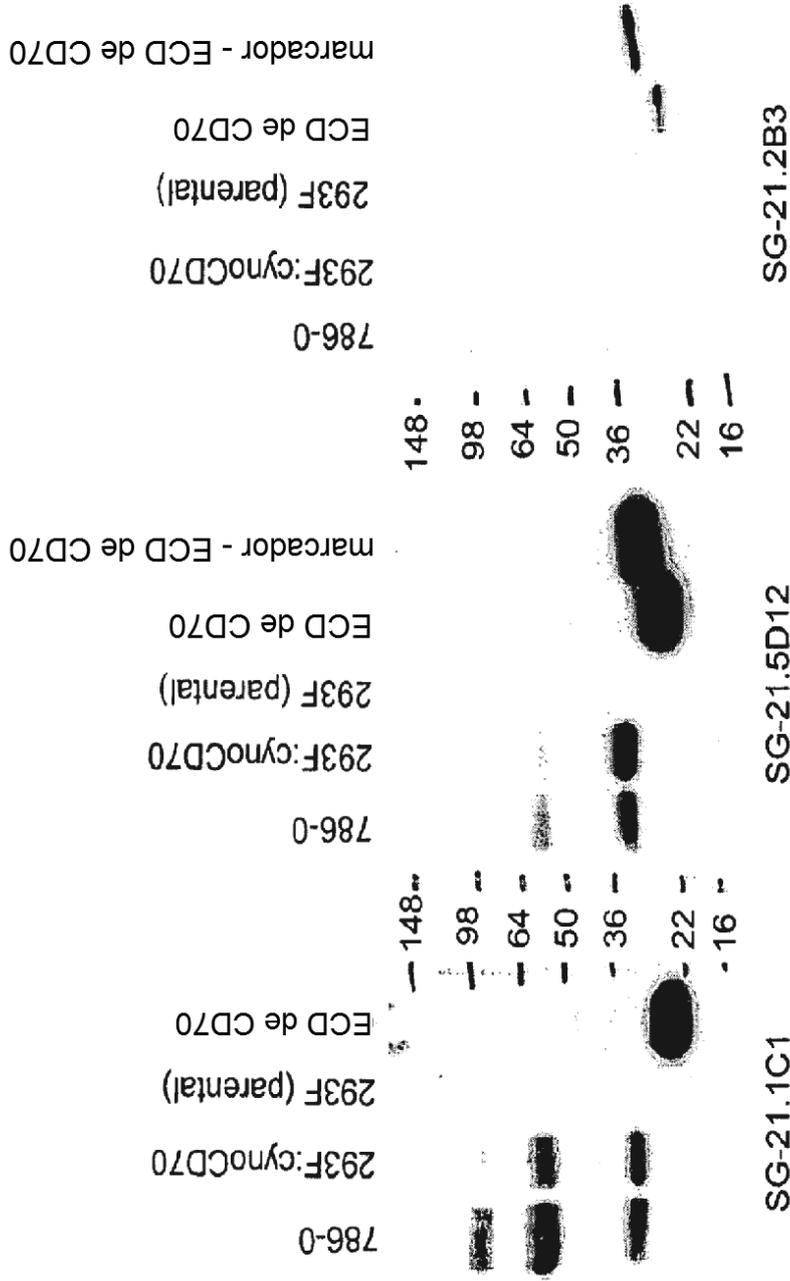


Figura 1

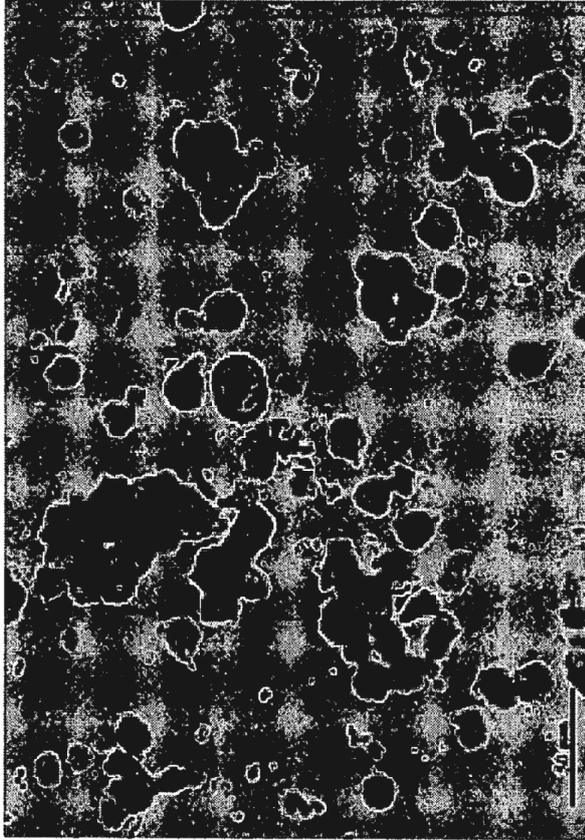
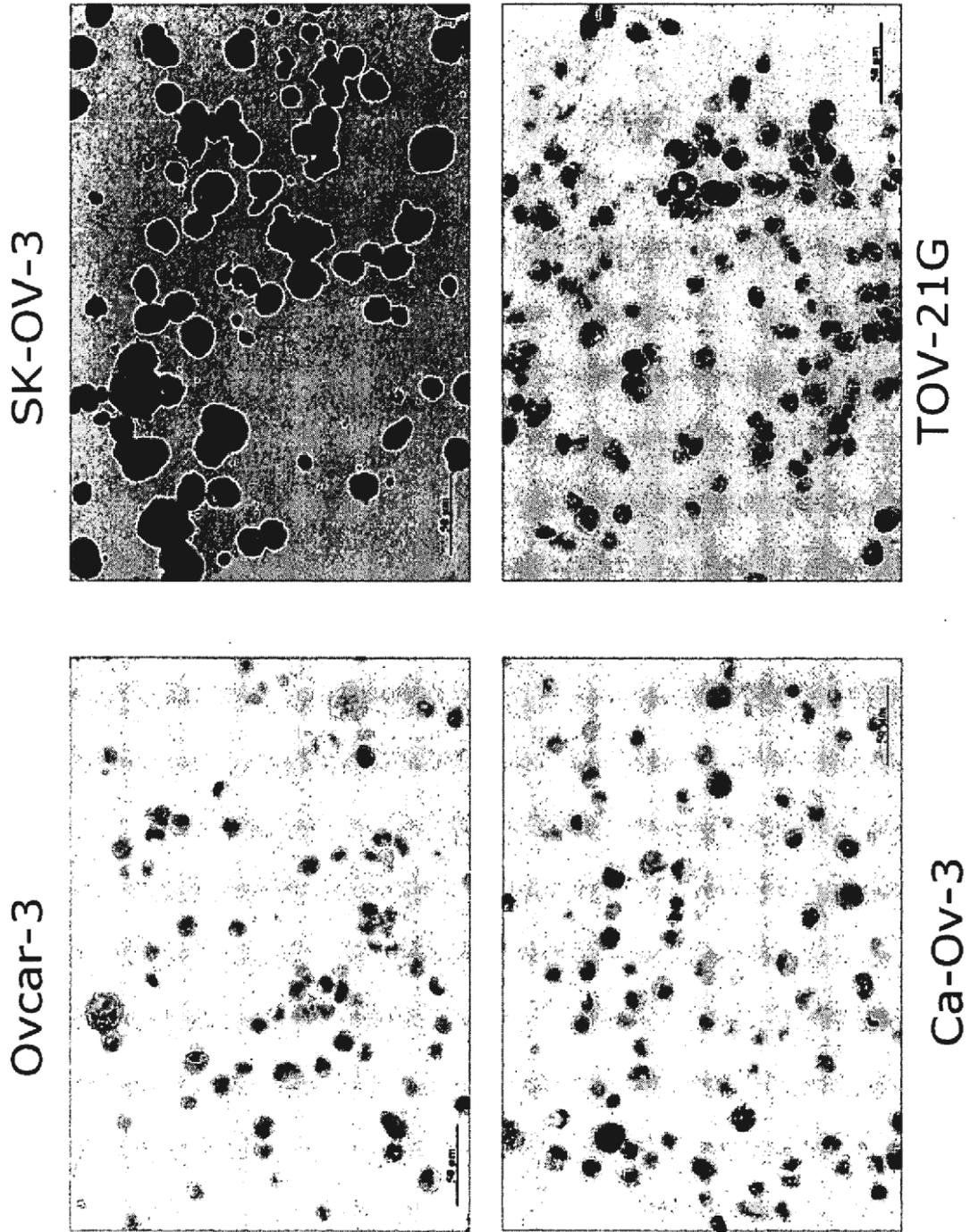


Figura 2



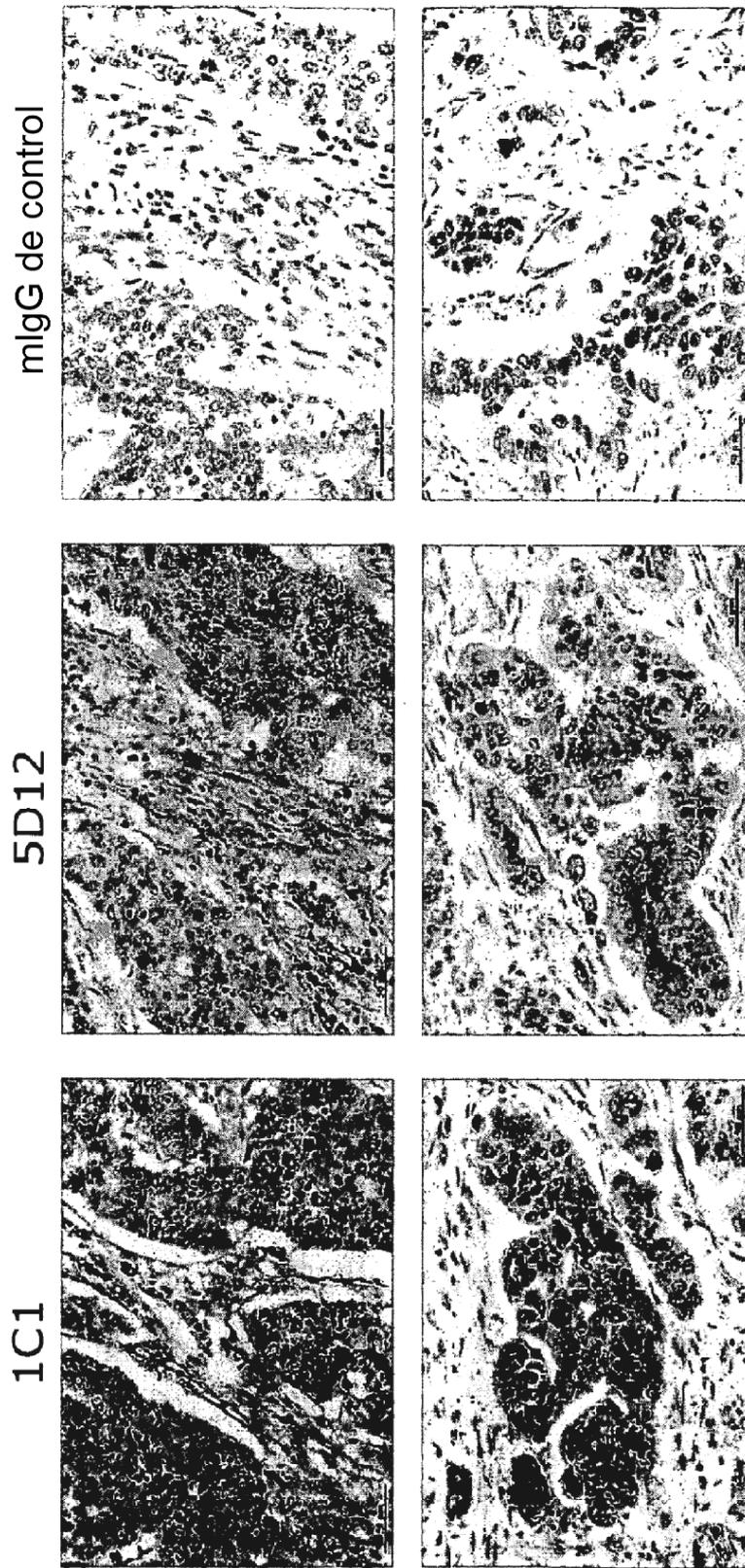


Figura 4

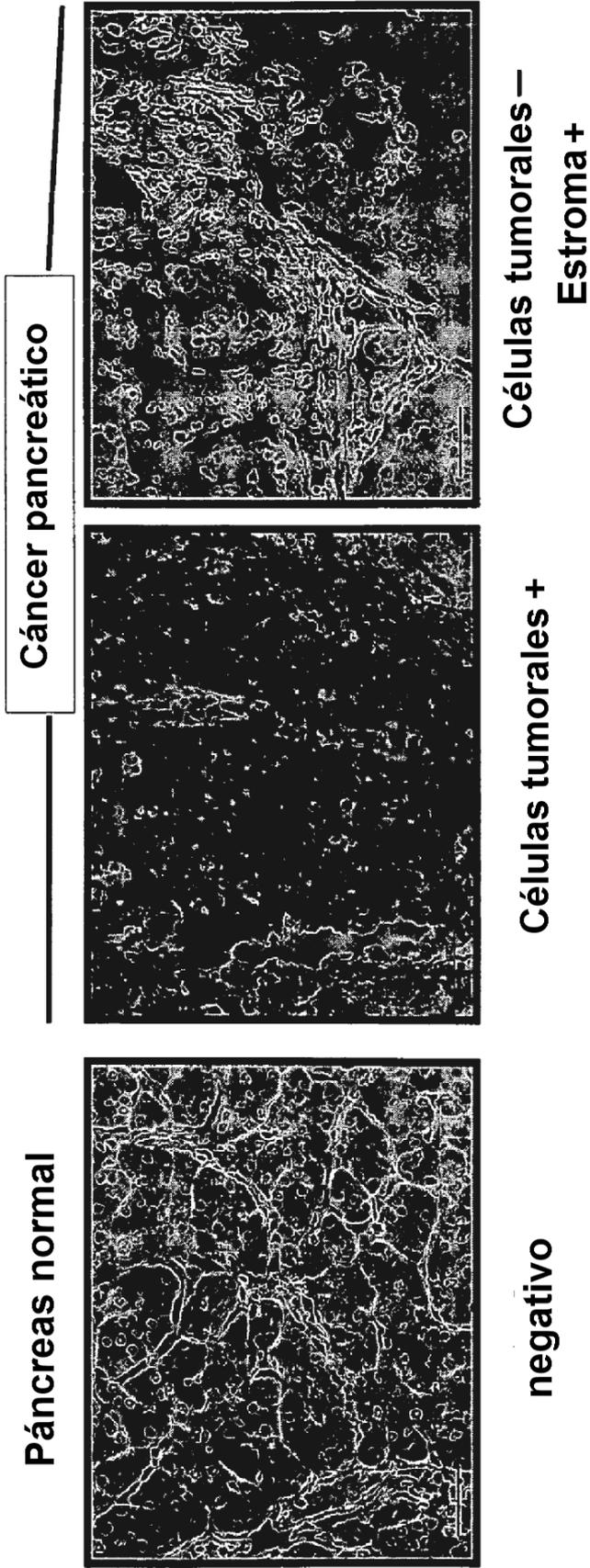


Figura 5

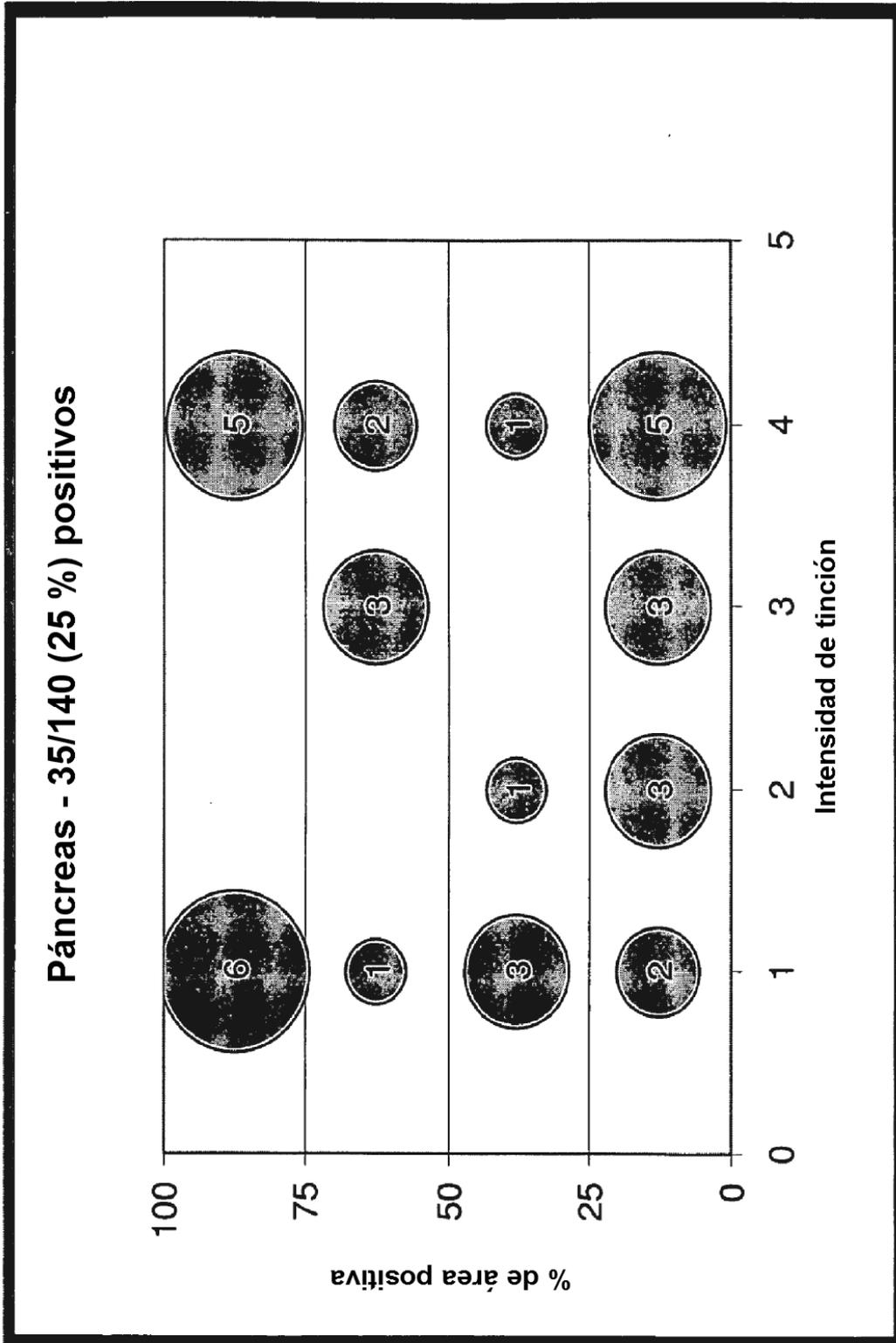


Figura 6

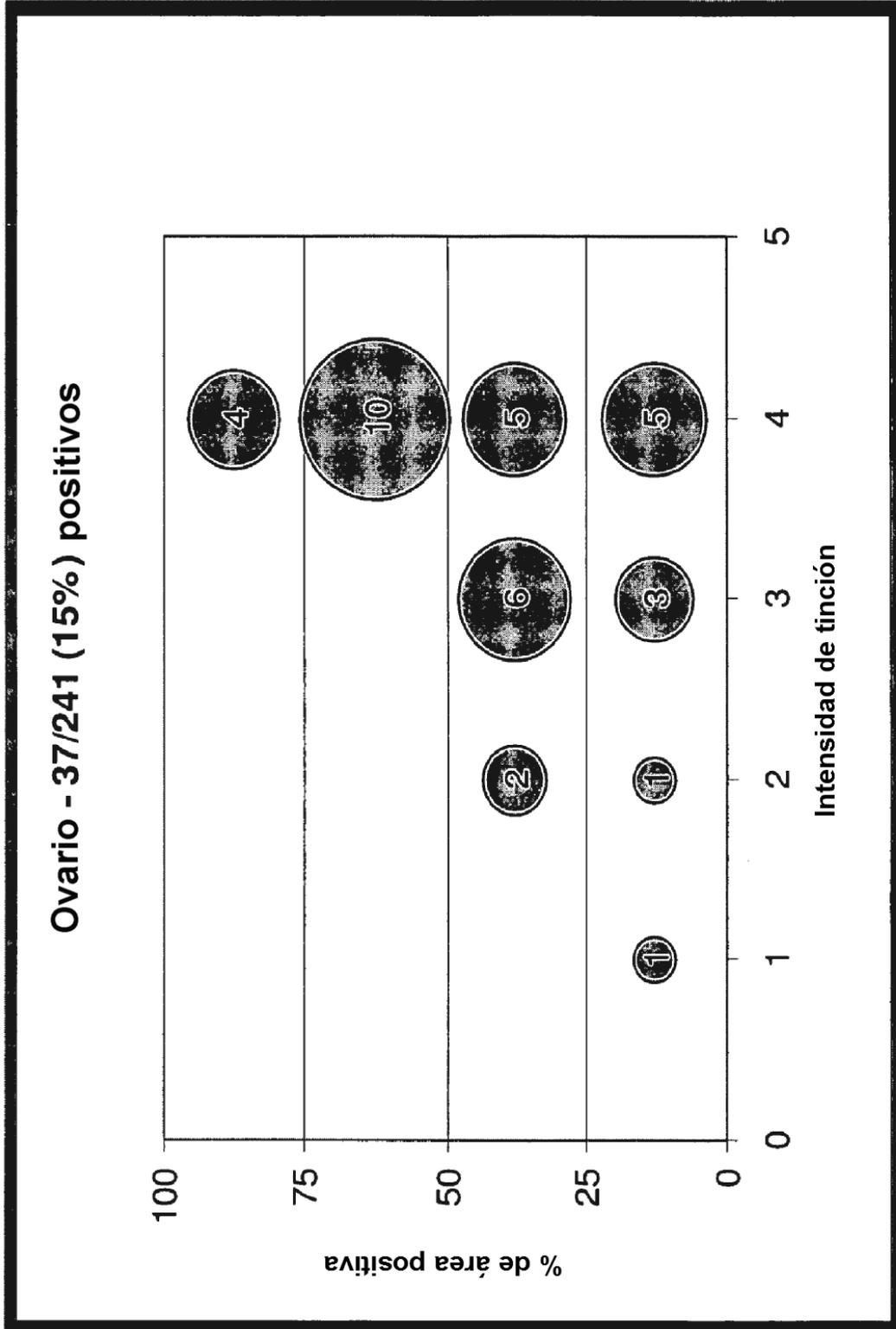


Figura 7

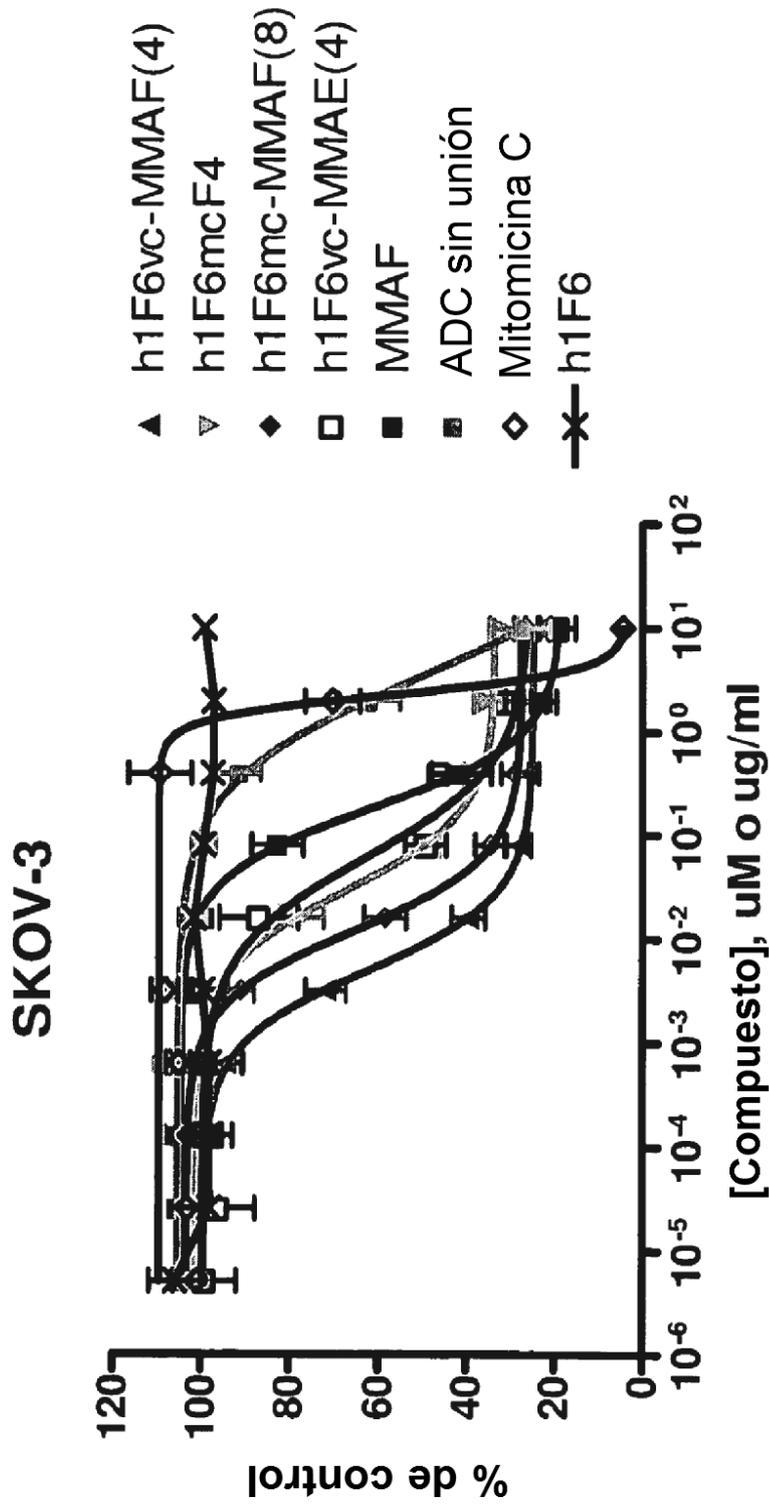


Figura 8

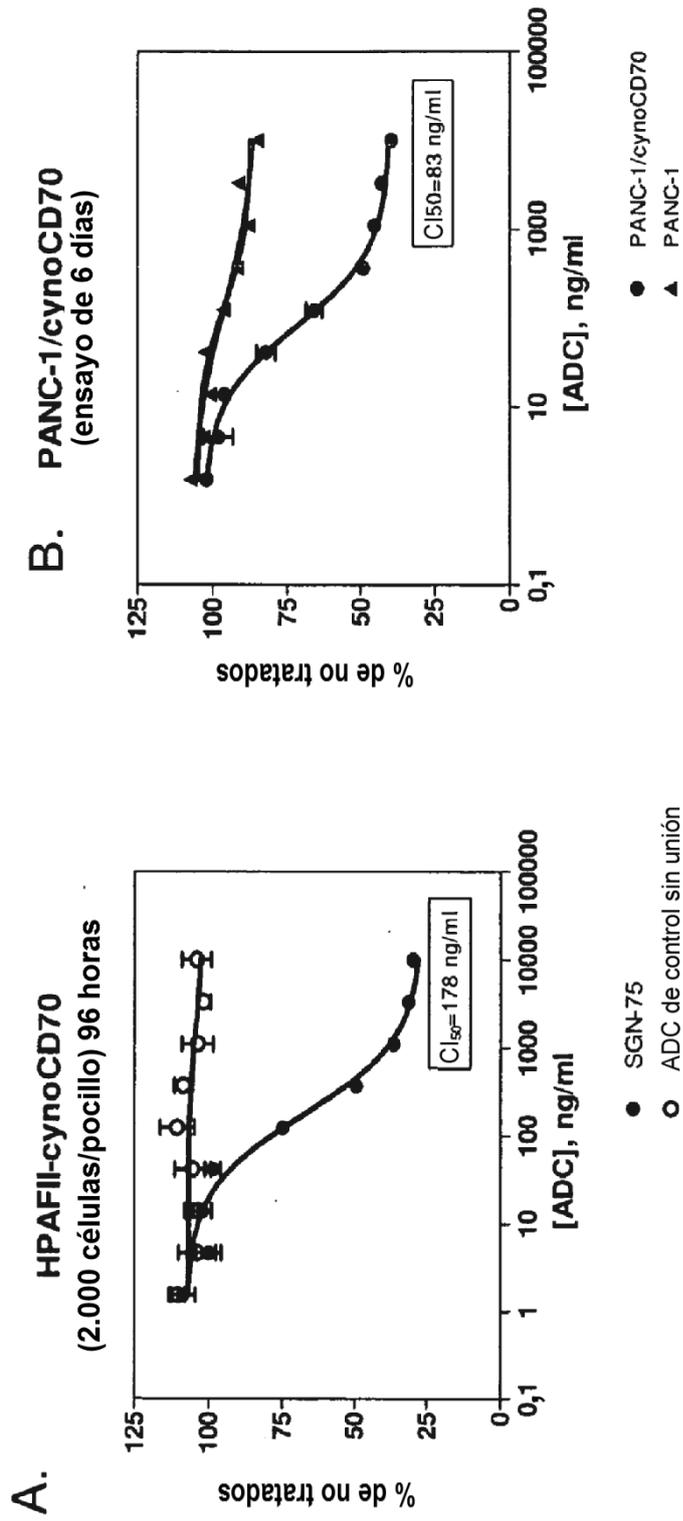


Figura 9

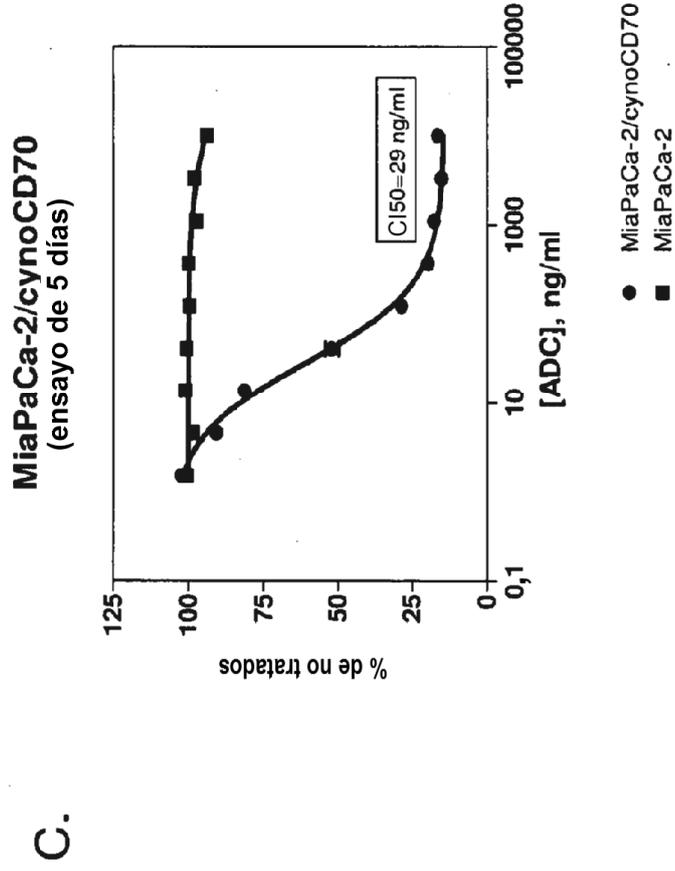


Figura 9

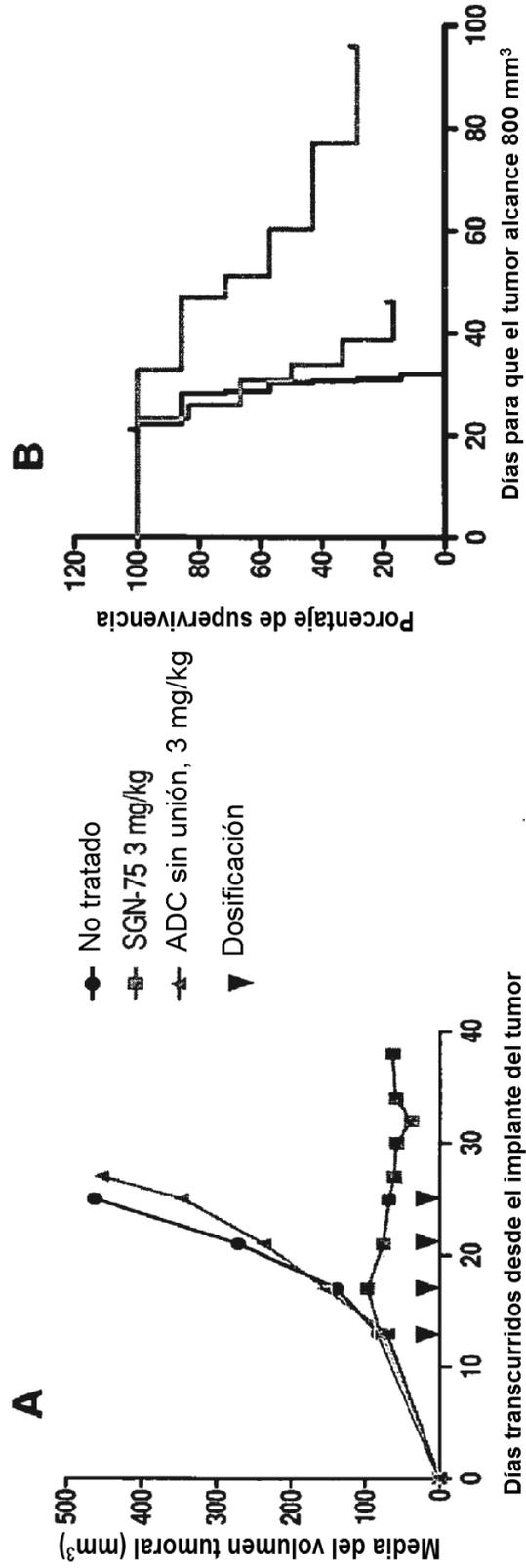


Figura 10