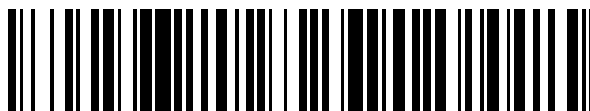


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 301**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2004 E 14172801 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2829283**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de cáncer usando una inmunotoxina**

30 Prioridad:

30.04.2003 US 466608 P

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

26.10.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)

Rämistrasse 71

8006 Zürich, CH

72 Inventor/es:

ZANGENMEISTER-WOTTKE, UWE;

DI PAOLO, CLAUDIO;

TSCHUDI, DOMINIQUE CHRISTINE;

GLOVER, NICHOLAS RONALD y

FITSIALOS, DIMITRI PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 639 301 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

Procedimientos de tratamiento de cáncer usando una inmunotoxina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la prevención o el tratamiento de cáncer mediante la administración a pacientes que tienen cáncer, o en riesgo de tener cáncer, una inmunotoxina que se une a un antígeno expresado de manera selectiva en la superficie de células cancerosas.

Antecedentes de la invención

10 Recientemente, la inmunoterapia ha surgido como un enfoque nuevo potencialmente eficaz para combatir el cáncer. Los anticuerpos murinos y humanizados/quiméricos y sus respectivos fragmentos de anticuerpo dirigidos contra antígenos asociados a tumor ("TAA") se han usado para el diagnóstico y la terapia de determinados cánceres humanos.⁵⁻¹³ Las formas no conjugadas, conjugadas a toxina y radiomarcadas de estos anticuerpos se han usado en dichos tratamientos.

15 Un antígeno asociado a tumor de interés para la inmunoterapia es Ep-CAM (por *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (molécula de adhesión celular epitelial), que también se conoce como 17-1A, KSA, EGP-2 y GA733-2). La Ep-CAM es una proteína transmembranal que se expresa de forma elevada en muchos tumores sólidos, incluidos carcinomas de pulmón, de mama, de ovario, colorrectales y carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello, pero que se expresa de forma débil en la mayor parte de los tejidos epiteliales normales. El papel de la Ep-CAM en la formación de cáncer permanece sin aclarar; no obstante, su expresión se correlaciona con la velocidad de proliferación celular.

20 Se han usado anticuerpos específicos de Ep-CAM para realizar imágenes y detectar tumores primarios y metástasis en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña. Entre los MAb (anticuerpos monoclonales) anti-Ep-CAM, PANOREX®, que es un anticuerpo monoclonal murino conocido también como edrecolomab, se ha aprobado para el tratamiento de cáncer de colon en Alemania, y está sujeto a ensayos clínicos en Estados Unidos.¹⁴⁻¹⁵ Debe indicarse, sin embargo, que el tratamiento con PANOREX® se ha asociado con efectos secundarios no deseables, incluidos calambres abdominales, náuseas, diarrea transitoria y lesiones de urticaria cutáneas.^{39,41,57} Los ensayos clínicos con otros anticuerpos dirigidos a Ep-CAM han sido menos exitosos; el anticuerpo BIS-1 se ha asociado con vasoconstricción periférica, disnea y fiebre, y el anticuerpo 3622W94 se ha asociado con pancreatitis necrotizante aguda.³⁶⁻³⁸ La búsqueda de un anticuerpo anti-Ep-CAM eficaz de baja toxicidad continúa: se ha informado de un anticuerpo anti-Ep-CAM totalmente humanizado, MT201, pretendido para que actúe mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC").⁵⁸ También se ha desarrollado un anticuerpo anti-Ep-CAM humanizado, estabilizado, monocatenario, 4D5MOC-B, que está derivado del anticuerpo monoclonal murino MOC31, y se describe en la solicitud de patente internacional PCT/EP00/03176, publicación N° WO 00/61635, presentada el 10 de abril de 2000 y publicada el 19 de octubre de 2000, y por Willuda y col.⁵⁹ Estas publicaciones no divulgan el uso de anticuerpo humanizado en el tratamiento de carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello (HNSCC) o cáncer de vejiga.

35 Como se ha indicado anteriormente, uno de los cánceres asociados con la expresión aumentada de Ep-CAM es el carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello ("HNSCC"). La expresión de Ep-CAM se correlaciona con la evolución del carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello en seres humanos. El HNSCC es actualmente el sexto cáncer más común en el mundo. El HNSCC es una enfermedad que causa una morbilidad significativa, especialmente con respecto a las funciones del habla y de deglución. La cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o combinaciones de las mismas están generalmente disponibles como opciones de tratamiento.

40 A pesar de todos los esfuerzos para curar pacientes afectados por HNSCC, la recaída sigue siendo la causa más común de fracaso (en el 40 % - 50 % de pacientes) después de una terapia contra el cáncer de la cabeza y el cuello. La terapia de último recurso consiste en las mismas opciones de tratamiento que para la terapia de primera línea. No obstante, la cirugía paliativa es a menudo difícil y causa desfiguraciones. Además, la radioterapia es raramente factible o beneficiosa, y la quimioterapia no mejora sustancialmente las tasas de supervivencia en pacientes con HNSCC. El pronóstico para estos pacientes sigue siendo malo, de modo que la mediana de supervivencia después de la recaída es solo de aproximadamente seis meses.

50 Debido al mal pronóstico para estos pacientes con HNSCC, el efecto de esta enfermedad en la calidad de vida y las opciones limitadas de tratamiento, existe un interés considerable y una necesidad apremiante en el desarrollo de tratamientos específicos del tumor novedosos, particularmente dirigidos a HNSCC.

55 El cáncer de vejiga es el séptimo cáncer más común en el mundo que tiene como consecuencia 260.000 nuevos casos estimados cada año. En Europa, esta enfermedad es la causa de muerte de aproximadamente 50.000 personas al año. Los carcinomas del tejido de la vejiga aparecen casi completamente dentro del epitelio transicional, la capa o tejido superficial que encierra la vejiga, como carcinomas de célula transicional. En un diagnóstico inicial, del 70 al 90 % de pacientes con cánceres de vejiga tienen enfermedad superficial que implica carcinomas en la capa urotelial superficial que son no invasivos y muestran tumores papilares (proyecciones con forma de dedo). Los tratamientos actuales incluyen la administración por vía intravesicular de quimioterapia e inmunoterapia con la vacuna del bacilo Calmette-Guerin (BCG), lo que implica el riesgo adicional de infección sistémica con la bacteria de

la tuberculosis. A pesar de este régimen de tratamiento agresivo, el 70 % de estos tumores papilares superficiales volverán a aparecer en una evolución clínica prolongada, causando una morbilidad significativa; aproximadamente del 4 al 8 % evolucionarán para dar carcinomas invasivos. Strome, S.E. y col. *Clinical Cancer Research* (2002) 8:281-286 enseña un modelo animal de tratamiento de HNSCC por medio de una inyección intratumoral de una inmunotoxina de IL-4. En respuesta a esta necesidad médica, existe una necesidad considerable de desarrollar nuevos tratamientos específicos del tumor. Un enfoque novedoso es la terapia dirigida usando una inmunotoxina: un anticuerpo conjugado con una toxina. El anticuerpo se une específicamente a células tumorales para suministrar la toxina para destruir de forma eficaz la célula tumoral.

Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a procedimientos novedosos para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello administrando a un paciente que necesite tal tratamiento, una cantidad eficaz de una inmunotoxina recombinante que se une específicamente a (y, por tanto, está "dirigida a") una proteína en la superficie de las células cancerosas. Cuando se desee, la inmunotoxina se puede coadministrar, administrar simultáneamente y/o administrar de manera secuencial con uno u otros agentes anticancerígenos más, y/o en conjunto con radiación o cirugía.

15 La divulgación también se refiere a procedimientos para prevenir, prevenir la recaída o reducir la tasa de recaída de un cáncer, que comprenden administrar directamente una cantidad eficaz de una inmunotoxina en un sitio sospechoso de aparición o recaída.

20 La divulgación también se refiere a procedimientos para reducir el riesgo de complicaciones posquirúrgicas que comprenden administrar directamente al sitio de cirugía una cantidad eficaz de una inmunotoxina antes, durante y/o después de cirugía contra el cáncer.

25 La divulgación también se refiere a procedimientos para sensibilizar un tumor o cáncer a otro producto terapéutico contra el cáncer que comprenden administrar una cantidad eficaz de una inmunotoxina. El producto terapéutico contra el cáncer adicional puede administrarse antes, de forma solapada con, concurrentemente y/o después de la administración de la inmunotoxina.

La inmunotoxina usada en los procedimientos terapéuticos de la invención comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a Ep-Cam en la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para la célula cancerosa. La porción (a) de unión a la célula cancerosa puede estar unida a la porción (b) de toxina, por ejemplo, mediante enlace químico o enlace genético.

30 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se entenderá, no obstante, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se ofrecen solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones serán evidentes Para los expertos en la materia a partir de la presente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

35 La invención se describirá ahora con relación a los dibujos en los que:

La Figura 1 es un esquema que muestra una plantilla para la administración intratumoral de inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer a una masa tumoral.

40 Figura 2. (A) Mapa de VB4-845. El mapa representa la organización de las porciones de scFv 4D5MOCB y ETA₂₅₂₋₆₀₈ unidas a inmunotoxina, así como diversos dominios, incluidas las colas de histidina, señal PeIB, regiones enlazantes, las regiones V_L y V_H, regiones ETA II, Ib y II, y la señal de retención en el RE. (B) Modelo tridimensional predictivo de 4D5MOCB-ETA. Se muestran la estructura del scFv (V_L y V_H), ETA₂₅₂₋₆₀₈ (dominios II, Ib y III), el péptido enlazante y ambas colas de histidina.

45 Las Figuras 3A-D y las SEQ ID NO:1 y 2 muestran las secuencias de ADN y de aminoácidos de VB4-845. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos pueden dividirse en dominios que incluyen: la secuencia de señal para la expresión periplásmica, colas de histidina, dominios CDR 1, 2 y 3, dominio V_L, dominio V_H, enlazadores, dominios ETA II, Ib, III y una señal de retención en el RE KDEL.

50 Figura 4. Efecto antitumoral de VB4-845 en xenoinjertos tumorales humanos⁵³. Ratones atímicos que portan xenoinjertos tumorales positivos a Ep-CAM (HT29, SW2, CAL27) o un control negativo (COL0320 (o)) se trataron i.v. cada dos días con VB4-845 a 5 µg (9 dosis (■)) o 10 µg (3 dosis (▲)). El tamaño del tumor se da con respecto a la mediana de tamaño del tumor inicial de 160 mm³.

Figura 5. Tratamiento por vía peritumoral de ratones atímicos que portan xenoinjertos tumorales de CAL27. Ratones atímicos que portan xenoinjertos tumorales de CAL27 positivos a Ep-CAM se trataron por vía peritumoral cada dos días (lunes/miércoles/viernes) con VB4-845 a 5 µg (9 dosis). El tamaño del tumor se da con respecto a la mediana de tamaño del tumor inicial.

55 Figura 6. Función hepática después del tratamiento con VB4-845 (4D5MOCB-ETA). Para la comparación, también se muestra la actividad de transaminasas de ratones tratados con una dosis única mortal de ETA de tipo silvestre (85 µg/kg), tal como se describe por Schumann y col.⁵⁵⁻⁵⁶. Los datos se expresan como la media ± DT (n = 3).

Figura 7. Resultados histopatológicos en hígado y bazo inducidos por VB4-845. Los círculos indican el área de

hepatocitos necróticos en el grupo de dosificación de 20 µg.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "animal" incluye todos los miembros del reino animal, incluidos seres humanos. El animal es preferentemente un ser humano con HNSCC o cáncer de vejiga.

5 Como se usa en el presente documento, la frase "productos terapéuticos contra el cáncer" se refiere a compuestos o tratamientos que son eficaces en el tratamiento o la prevención de cáncer, incluidos, sin limitación, agentes químicos, otros productos inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, compuestos antiangiogénicos, determinadas citocinas, determinadas hormonas, terapia génica, radioterapia, cirugía y terapia dietética.

10 Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad eficaz" significa una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado deseado. Las cantidades eficaces de una inmunotoxina pueden variar según factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo, peso del animal. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

15 Como se usa en el presente documento, la frase "anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado" significa que el anticuerpo o el fragmento comprende regiones estructurales humanas. La humanización de anticuerpos a partir de especies no humanas se ha descrito bien en la literatura. Véase, por ejemplo, el documento EP-B1 0239400 y Carter y Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8,449-454,1997).

20 Como se usa en el presente documento, la frase "la inmunotoxina se administra directamente al sitio del cáncer" se refiere a la introducción directa o sustancialmente directa que incluye, sin limitación, inyecciones únicas o múltiples de la inmunotoxina directamente en el tumor o por vía peritumoral, la perfusión continua o discontinua en el tumor o por vía peritumoral, la introducción de un depósito en el tumor o por vía peritumoral, la introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor o por vía peritumoral, introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor o por vía peritumoral, la aplicación directa al tumor, la inyección directa en una arteria que alimenta de forma sustancialmente directa la región del tumor, la inyección directa en un vaso linfático que drena sustancialmente en la región del tumor, la introducción directa o sustancialmente directa en una cavidad sustancialmente encerrada (por ejemplo, la cavidad pleural) o lumen (por ejemplo, por vía intravesicular). "Peritumoral" es un término que describe una región, dentro de aproximadamente 10 cm, preferentemente dentro de aproximadamente 5 cm, más preferentemente 1 cm, de lo que se considera el límite del tumor, es decir, pero sin limitación, el límite palpable de un tumor. "Administración directa" en el contexto de prevención de la aparición o la prevención de recaída se define como la administración directamente al sitio de riesgo para el desarrollo o recaída de un cáncer.

25 Como se usa en el presente documento, la frase "ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa" incluye cualquier molécula que pueda dirigir selectivamente la inmunotoxina a la célula cancerosa uniéndose a una proteína de las células cancerosas. La proteína objetivo de la célula cancerosa es preferentemente un antígeno asociado al tumor que se expresa a niveles más elevados en la célula cancerosa en comparación con células normales.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo MOC-31" significa el anticuerpo anti-Ep-CAM o anti-EGP-2 murino que es conocido en la técnica y está disponible de fuentes comerciales tales como BioGenex, N° de cat. MU316-UC, Zymed Laboratories Inc., N° de cat. 18-0270 o United States Biological, N° de cat. M4165.

35 Como se usa en el presente documento, el término "4D5MOC-A" significa el anticuerpo scFv humanizado MOC31 que se ha injertado en el marco estructural de consenso humano artificial de scFv 4D5 tal como se describe en el documento WO 00/61635. Como se usa en el presente documento, el término "4D5MOC-B" significa una variante estable de 4D5MOC-A que se ha preparado tal como se describe en el documento WO 00/61635.

40 Como se usa en el presente documento, el término "VB4-845" significa una inmunotoxina que comprende a) el anticuerpo humanizado scFv 4D5MOC-B que está fusionado a b) una forma truncada de exotoxina A de pseudomonas que consiste en los aminoácidos 252-608.

45 Como se usa en el presente documento, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere al uso clínico general y/o la aprobación por parte de la agencia reguladora del Gobierno Federal o del estado, enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos, o la aceptación general por los expertos en la técnica en cuestión.

50 Como se usa en el presente documento, "condiciones fisiológicas" para la unión de anticuerpos reflejan, pero no duplican necesariamente con exactitud, las condiciones en las que un polipéptido de unión a Ep-CAM se encontraría en una molécula Ep-CAM *in vivo*. La unión en condiciones fisiológicas debería predecir razonablemente la unión que tendrá lugar *in vivo*.

55 Como se usa en el presente documento, la frase "prevenir cáncer" se refiere a la prevención de la aparición de cáncer. En determinados casos, el tratamiento de prevención reduce la recaída del cáncer. En otros casos, el tratamiento de prevención reduce el riesgo de un paciente de desarrollar un cáncer, o inhibe la evolución de un

estado precanceroso (por ejemplo, un pólipo en el colon) a una neoplasia maligna real.

Como se usa en el presente documento, la frase "dosis reducida" se refiere a una dosis que es inferior a la administrada normalmente y/o a la dosis recomendada. Las dosis administradas normalmente de un producto terapéutico contra el cáncer pueden hallarse en materiales de referencia bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la última edición de la Physician's Desk Reference.

Como se usa en el presente documento, la frase "tratar el cáncer" se refiere a la inhibición de la replicación de células cancerosas, la inhibición de la expansión del cáncer (metástasis), la inhibición del crecimiento del tumor, la reducción del número de células cancerosas o del crecimiento del tumor, la reducción del grado de tumores malignos de un cáncer (por ejemplo, aumento de la diferenciación), o la mejora de síntomas relacionados con el cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a cualquier derivado, análogo o fragmento farmacéuticamente aceptable de una inmunotoxina, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, una toxina (por ejemplo, una toxina de *Pseudomonas*) o producto terapéutico contra el cáncer descrito en el presente documento. Una variante también abarca uno o más componentes de un multímero, multímeros que comprenden un componente individual, multímeros que comprende múltiples componentes individuales (por ejemplo, multímeros de una molécula de referencia), un producto de desintegración químico y un producto de desintegración biológico. En particular, en realizaciones no limitantes, una inmunotoxina puede ser una "variante" con respecto a una inmunotoxina de referencia en virtud de una alteración o de alteraciones en la porción de unión a Ep-CAM y/o la porción de toxina de la inmunotoxina de referencia. Por ejemplo, una inmunotoxina variante puede contener multímeros de la porción de anticuerpo y/o la porción de toxina. Una variante de la porción de toxina de la molécula conserva una toxicidad de al menos el 10 por ciento y preferentemente al menos el 30 por ciento en un ensayo estándar usado para medir la toxicidad de una preparación de la toxina de referencia.

Una inmunotoxina variante que tiene una variación de la porción de unión a Ep-CAM de la inmunotoxina de referencia compite con la unión de un anticuerpo de referencia anti-Ep-CAM, en condiciones fisiológicas, en al menos el 10 por ciento y preferentemente al menos el 30 por ciento (y véase más adelante). La competencia del 10 por ciento significa que, en un ensayo en el que una concentración de saturación de un anticuerpo de referencia anti-Ep-CAM se une a Ep-CAM, el 10 por ciento de estos anticuerpos de referencia unidos está desplazado cuando se alcanza un equilibrio con una concentración equivalente de la inmunotoxina anti-Ep-CAM variante que se está analizando. Como ejemplo no limitante, la competencia entre anticuerpos, o entre un anticuerpo y una inmunotoxina, se mide (1) uniéndolo el anticuerpo de referencia anti-Ep-CAM marcado a Ep-CAM en la superficie de células, o an sustrato sólido recubierto con Ep-CAM, de modo que virtualmente todos los sitios de Ep-CAM estén unidos al anticuerpo; (2) poniendo en contacto estos complejos anticuerpo-antígeno con anticuerpo anti-Ep-CAM de ensayo no marcado o inmunotoxina de ensayo no marcada y (3) midiendo la cantidad de anticuerpo marcado desplazado de sitios de unión de Ep-CAM, indicando la cantidad de anticuerpo marcado liberado la cantidad de competencia que ha tenido lugar.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han demostrado que una inmunotoxina que comprende un fragmento de anticuerpo humanizado que se une al dominio extracelular de Ep-CAM humana unido a exotoxina A de *Pseudomonas* es eficaz en el tratamiento de carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello (HNSCC) y de cáncer de vejiga. En particular, los inventores han demostrado que una inmunotoxina que comprende un fragmento de anticuerpo estabilizado y humanizado recombinante Fv monocatenario a Ep-CAM que se ha fusionado con una forma truncada de exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas* que carece del dominio de unión a células es citotóxico contra células de HNSCC y de cáncer de vejiga. Esta inmunotoxina se une a Ep-CAM expresada en células cancerosas. Una vez se ha unido, la inmunotoxina se internaliza y la exotoxina A de *pseudomonas* bloquea la síntesis de proteínas, causando de este modo la muerte celular. Es importante que ya que la mayor parte de las células de mucosa y fibroblastos normales no expresan ampliamente Ep-CAM y, por lo tanto, no pueden internalizar la inmunotoxina, están protegidas del efecto destructor de la exotoxina.

En consecuencia, en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello que comprende administrar a un animal con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM en la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas. La presente invención también proporciona un uso de una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM en la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas para tratar o prevenir un carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello. La presente invención también proporciona un uso de una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM en la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento o la prevención de

cáncer de vejiga que comprende administrar a un animal con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas. La presente divulgación también proporciona un uso de una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas para tratar o prevenir el cáncer de vejiga. La presente divulgación también proporciona un uso de una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende: (a) un ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un cáncer de vejiga.

El ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa puede ser cualquier molécula que puede dirigir de forma selectiva la inmunotoxina a las células de cáncer. En una realización, el ligando se une a un antígeno asociado al tumor. Los ejemplos de proteínas que se expresan en células de HNSCC incluyen el receptor de IL-4, el receptor de EGF, la proteína de superficie HER21 neu y Ep-CAM. Los ejemplos de proteínas que se expresan en células de cáncer de vejiga incluyen el receptor de EGF, gp54 y Ep-CAM. En una realización específica, el ligando se une a Ep-CAM.

En una realización preferida, el ligando es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que pueden usarse incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv y dsFv de fuentes recombinantes y/o producidos en animales transgénicos. El anticuerpo o fragmento puede ser de cualquier especie, incluidos ratones, ratones, conejos, hámsteres y seres humanos. Los derivados de anticuerpo quimérico, es decir, moléculas de anticuerpo que combinan una región variable de animal no humano y una región constante humana se contemplan también dentro del ámbito de la invención. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos humanizados que comprenden el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otras especies, con regiones constantes humanas. Pueden usarse procedimientos convencionales para producir anticuerpos quiméricos. (Véase, por ejemplo, Martinet y col., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81,6851 (1985); Takeda y col., Nature 314, 452 (1985), Cabilly y col., patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Boss y col., patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Tanaguchi y col., publicación de patente europea EP171496; publicación de patente europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B). La preparación de anticuerpos humanizados se describe en el documento EP-B 10 239400. También pueden producirse comercialmente anticuerpos humanizados (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña.). Se espera que los anticuerpos quiméricos sean menos inmunógenos en un sujeto humano que el anticuerpo no quimérico correspondiente. Los anticuerpos humanizados pueden estabilizarse adicionalmente, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 00/61635.

También pueden generarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos, proteínas reactivas sobre HNSCC o las células de cáncer de vejiga cribando bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, expresados en bacterias con péptidos producidos a partir de moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas. Por ejemplo, pueden expresarse fragmentos Fab, regiones VH y regiones FV en bacterias usando bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ward y col., Nature 341, 544-546: (1989); Huse y col., Science 246, 1275-1281 (1989); y McCafferty y col. Nature 348, 552-554 (1990)). Alternativamente, un ratón SCID-hu, por ejemplo el modelo desarrollado por Genpharm, puede usarse para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos.

La porción de ligando de la inmunotoxina puede estar derivada de inmunoglobulina, es decir, puede rastrearse hasta una molécula inicial que es una inmunoglobulina (o anticuerpo). Por ejemplo, el ligando puede producirse por modificación de un esqueleto de inmunoglobulina usando técnicas estándar conocidas en la técnica. En otro ejemplo no limitante, los dominios de inmunoglobulina (por ejemplo, las cadenas variables pesada y/o ligera) pueden unirse a un esqueleto que no sea de inmunoglobulina. Además, el ligando puede desarrollarse, sin limitación, mediante reacción química o diseño genético. En consecuencia, en un ejemplo no limitante, una inmunotoxina puede comprender (1) un polipéptido derivado de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo seleccionado de una biblioteca de anticuerpos), o una variante del mismo, que se une específicamente a HNSCC o a células de cáncer de vejiga y (2) una toxina o variante de la misma. Dichos ligandos de polipéptido de inmunoglobulina pueden rediseñarse para afectar a sus características de unión a una molécula diana asociada a tumor, o para mejorar sus características físicas, por ejemplo.

No es necesario que la porción de ligando de la inmunotoxina esté basada en inmunoglobulina. En consecuencia, una inmunotoxina puede comprender (1) un polipéptido que no sea de inmunoglobulina (por ejemplo, Affibody®), o una variante del mismo, que se une específicamente a HNSCC o a células de cáncer de vejiga y (2) una toxina o variante de la misma. Dichos ligando de polipéptido que no son de inmunoglobulina pueden diseñarse para que se unan a moléculas diana asociadas a tumor. Además, pueden manipularse genéticamente ligandos de polipéptido que no son de inmunoglobulina hasta una afinidad o una avidéz deseada y pueden diseñarse para que toleren una diversidad de condiciones físicas, incluidos intervalos de pH extremos y temperaturas relativamente elevadas.

De hecho, para usar en una composición farmacéutica, el diseño de un polipéptido que no es de inmunoglobulina con una semivida relativamente larga en condiciones fisiológicas (por ejemplo, 37 °C en presencia de peptidasas) puede ser ventajoso. Además, dichas moléculas, o variantes de las mismas, pueden demostrar una buena solubilidad, tamaño pequeño, plegamiento apropiado y pueden expresarse en sistemas bacterianos de bajo coste fácilmente disponibles, y fabricarlas de este modo en cantidades comercialmente razonables. La capacidad para

diseñar un polipéptido que no sea de inmunoglobulina está dentro de la capacidad de un experto. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.831.012 y 6.534.628 para técnicas adaptables, en general, para diseñar, fabricar y seleccionar asociados de unión deseados.

5 Los ejemplos de polipéptidos de unión a epítipo incluyen, sin limitación, ligados que comprenden un dominio de fibronectina de tipo III (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 01/64942, WO 00/34784, WO 02/32925). Las bibliotecas de afinidad basadas en proteína A también se han usado para identificar polipéptidos de unión a epítipo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.831.012 y 6.534.628) y dichas bibliotecas pueden ser útiles según la presente divulgación para seleccionar polipéptidos que se unan selectivamente a células de HNSCC o de cáncer de vejiga.

10 Otros tipos de moléculas de unión que son conocidas en la técnica incluyen, sin limitación, moléculas de unión basadas en el ensamblaje de dominios de proteínas repetidos (véase, por ejemplo, Forrer y col., 2003, "A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins." FEBS Lett. 539:2-6; Kohl y col., 2003, "Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein." Proc Natl Acad Sci USA. 100:1700-1705). Las bibliotecas de dominios repetidos ensamblados aleatoriamente pueden ser útiles según la presente divulgación para seleccionar ligandos que se unan selectivamente a células de HNSCC o de cáncer de vejiga.

Varios polipéptidos de unión a epítipo no basados en inmunoglobulina y procedimientos para fabricar y usar dichos polipéptidos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Eklund y col., 2002, "Anti-idiotypic protein domains selected from Protein A-based affibody libraries." Prot. Struct. Funct. Gen. 48:454-462; Gunneriusson y col., 1999, "Affinity maturation of a Taq DNA polymerase specific affibody by helix shuffling." Prot. Eng. 12:873-878; Hansson y col., 1999, "An in vitro selected binding protein (affibody) shows conformation-dependent recognition of the respiratory syncytial virus (RSV) G protein." Immunotechnol. 4: 237-252; Henning y col., 2002, "Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A." Human Gene Therapy 13:1427-1439; Högbom y col., 2003, "Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. Proc Natl Acad Sci USA. 100(6):3191-3196; Nord y col., 1997, "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain." Nature Biotechnol. 15:772-777; Nord y col., 2000, "Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and Taq DNA polymerase." J. Biotechnol. 80:45-54; Nord y col., 1995, "A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain." Prot. Eng. 8:601-608; Nord y col., 2001, "Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A." Eur. J. Biochem. 268:1-10; Nygren y col., 1997, "Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins." Curr. Opin. Struct. Biol. 7:463-469; Rönnmark y col., 2002, "Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A." Eur. J. Biochem. 269:2647-2655; Rönnmark y col., 2002, "Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli." J. Immunol. Meth. 261:199-211; Wahlberg y col., 2003, "An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding." Proc Natl Acad Sci USA. 100(6):3185-3190; Gotz y col., 2002, "Ultrafast electron transfer in the complex between fluorescein and a cognate engineered lipocalin protein, a so-called anticalin." Biochemistry. 41:4156-4164; Skerra, 2001, "Anticalins: a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties." J Biotechnol. 2001 74:257-275; Skerra, 2000, "Lipocalins as a scaffold." Biochim Biophys Acta. 1482:337-350; Skerra y col., 2000, "Engineered protein scaffolds for molecular recognition." J Mol Recognit. 13:167-187; Schlehuber y col., 2000, "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." J Mol Biol. 297:1105-1120; Beste y col., 1999, "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." Proc Natl Acad Sci USA. 96:1898-1903; publicación internacional PCT N° WO97/45538 titulado "Novel Synthetic Protein Structural Templates For The Generation, Screening And Evolution Of Functional Molecular Surfaces" (con respecto a la producción de bibliotecas de secuencias de péptidos en el marco estructural de una plantilla estructural derivada de dominios de homología con pleckstrina (PH)).

Los cánceres que pueden tratarse según la divulgación incluyen, sin limitación, cualquier tipo de HNSCC o cáncer de vejiga siempre que las células afectadas muestren una expresión aumentada de una proteína que pueda actuar como diana en la superficie celular. Los tumores o las células tumorales pueden evaluarse para determinar su susceptibilidad a los procedimientos de tratamiento de la divulgación, por ejemplo obteniendo una muestra de tejido tumoral o células tumorales y determinando la capacidad de la muestra para unirse a la porción de ligando de la inmunotoxina. En una realización, la proteína de las células cancerosas es Ep-CAM. La expresión en la superficie celular de Ep-CAM puede inducirse, o elevarse, mediante un agente que aumenta los niveles en estado estacionario de Ep-CAM en la superficie celular en tejidos precancerosos o cancerosos.

55 En consecuencia, la presente divulgación incluye procedimientos de diagnóstico y kits que pueden usarse antes del procedimiento terapéutico de la invención para determinar si HNSCC o el cáncer de vejiga expresa, o no, niveles de la proteína que se une mediante el ligando a la inmunotoxina. Por lo tanto, en una realización adicional, la presente divulgación incluye un procedimiento de tratamiento o de prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o cáncer de vejiga que comprende:

60 (1) analizar una muestra de tumor procedente de un paciente para determinar la expresión de una proteína sospechosa de estar asociada con el carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello o el cáncer de vejiga;

y

(2) si la proteína se expresa a niveles superiores en la muestra de tumor en comparación con un control, administrar al paciente una cantidad eficaz de inmunotoxina que comprende:

- 5 (a) un ligando que se une a la proteína de la célula cancerosa unido a;
 (b) una toxina que es citotóxica para la célula cancerosa.

La presente divulgación también incluye un kit para diagnosticar carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o cáncer de vejiga que comprende un ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa e instrucciones para usar el mismo para diagnosticar el cáncer.

10 En realizaciones preferentes no limitantes, el cáncer no puede tratarse mediante administración directa de la inmunotixina. Por ejemplo, una masa tumoral diana puede estar cercana a la superficie de la piel. En otro ejemplo, un tejido enfermo puede estar encapsulado por un quiste, o se encuentra en una cavidad sustancialmente cerrada que incluye, sin limitación, un lumen (por ejemplo, vejiga). (Más detalles sobre la administración directa se proporcionan más adelante en la divulgación.)

En otras realizaciones, el cáncer no puede tratarse mediante administración intravenosa de la inmunotixina.

15 La divulgación también proporciona procedimientos para reducir el riesgo de complicaciones posquirúrgicas que comprenden administrar una cantidad eficaz de una inmunotoxina antes, durante o después de la cirugía, y en realizaciones específicas no limitantes, cirugía para tratar el cáncer.

20 La divulgación también proporciona procedimientos para prevenir la aparición, para prevenir o retrasar la recaída o reducir la tasa de recaída de HNSCC o cáncer de vejiga que comprende administrar directamente a un paciente con necesidad de ello una cantidad eficaz de una inmunotoxina.

25 La divulgación también proporciona procedimientos para sensibilizar un tumor o cáncer a uno o más productos terapéuticos contra el cáncer adicionales que comprenden administrar una inmunotoxina de la divulgación. En una realización no limitante, el otro producto terapéutico contra el cáncer comprende otra inmunotoxina dirigida a Ep-CAM. En otra realización no limitante, el otro producto terapéutico contra el cáncer comprende radiación. El otro producto terapéutico contra el cáncer puede administrarse antes, en forma solapada a, concurrentemente a y/o después de la administración de la inmunotoxina. Cuando se administran concurrentemente, la inmunotoxina y otro producto terapéutico contra el cáncer pueden administrarse en una formulación única o en formulaciones separadas, y si se hace de forma separada, entonces, opcionalmente, mediante modos diferentes de administración. En consecuencia, la combinación de una o más inmunotoxinas y uno o más productos terapéuticos contra el cáncer
 30 adicionales puede actuar de forma sinérgica para combatir el tumor o cáncer.

35 Cuando se administra una inmunotoxina de la invención además de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales, estos productos terapéuticos contra el cáncer adicionales pueden incluir, sin limitación, 2,2',2''triclorotrietilamina, 6-azauridina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, 6-mercaptopurina, aceglarona, aclacinomicina actinomicina, altretamina, aminoglutetimida, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, ancitabina, oligonucleótico antisentido de angiogenina, antramicina, azacitidina, azaserina, aziridina, batimastar, oligonucleótico antisentido de bcl-2, benzodepa, bicalutamida, bisantreno, bleomicina, buserelina, busulfán, cactinomicina, calusterona, carboplatino, carbocuaona, carmofur, carmustina, carubicina, carzinofilina, clorambucilo, clorafazina, acetato de clormadinona, clorozotocina, cromomicinas, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, defosfamida, demecolcina, denopterina, diazicuona, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolona, edatrexato, eflomitina, acetato de eliptinio, emitetur, enocitabuna, epirubicina, epitostanol, estramustina, etoglucido, etopósido, fadrozol, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, formestano, fosfestrol, fotemustina, nitrato de galio, gemcitabina, goserelina, hexestrol, hidroxiaurea, idarrubicina, ifosfamida, improsulfán, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, interleucina-2, L-asparaginasa, lentinano, letrozol, leuprolida, lomustina, lonidamina, manomustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melengestrol, melfalán, menogarilo, mepitiostano, metotrexato, meturedpa, miboplatino, miltefosina, mitobronitol, mitoguazona, mitolactol, mitomicinas, mitotano, mitoxantrona, mopidamol, ácido micofenólico, nilutamida, nimustina, nitracina, nogalamicina, novembiquina, olivomicinas, oxaliplatino, paclitaxel, pentostaina, peplomicina, perfosfamida, fenamet, fenesterina, pipobromán, pipsulfán, pirarrubicina, piritrexim, plicamicina, 2-etil-hidrazida del ácido podofilínico, fosfato de poliestradiol, porfimer sódico, porfiromicina, prednimustina, procabazina, propagermanio, PSK, pteropterina, puromicina, ranimustina, razoxano, roquinimex, sizificán, sobuzoxano, espirogermanio, estreptonigrina, estreptozocina, tamoxifeno, tegafur, temozolomida, tenipósido, ácido tenuzónico, testolacona, tiamiprina, tioguanina, Tomudex, topotecán, toremifeno, triazicuona, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, trilostano, trimetrexato, triptorelina, trofosfamida, trontecán, tubercidina, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, uretano, vinblastina, vincristina, zinostatina y zorubicina, citosina arabinósido, gemtuzumab, tioepa, ciclotosfamida, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbacina, temozoamida), hexametilmelamina, LYSODREN, análogos de nucleósido, alcaloides vegetales (por ejemplo, Taxol, paclitaxel, camptotecina, topotecán, irinotecán (CAMPTOSAR, CPT-11), vincristina, alcaloides de vinca tales como vinblastina) podofilotoxina, epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), citocalasina B,

gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina), doxorubicina liposomal, dihidroxiantracindiona, mitramicina, actinomicina D, aldesleucina, alutamina, biaomicina, capecitabina, carboplatino, clorabusina, ciclarabina, daclinomicina, floxurida, acetato de lauprolida, levamisol, lomuslina, mercaptopurino, mesna, mitolanc, pegaspergasa, pentoslatina, picamicina, riuximab, campat-1, estraplozocina, tretinoína, oligonucleótidos antisentido de VEGF, vindesina y vinorelbina. También se contemplan en la presente invención composiciones que comprenden uno o más productos terapéuticos contra el cáncer (por ejemplo, FLAG, CHOP). FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. Para una lista completa de productos terapéuticos contra el cáncer conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la última edición del índice de Merck y la Physician's Desk Reference. Asimismo, la inmunotoxina de la invención puede usarse junto con radioterapia u otras modalidades terapéuticas contra el cáncer conocidas.

Las composiciones farmacéuticas para terapia de combinación también pueden incluir, sin limitación, antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramicina), asparaginasa, *Bacillus* y *Guerin*, toxina de difteria, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, agentes antimetabólicos, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activado de plasminógeno tisular, agentes antihistamínicos, agentes antináuseas, etc.

De hecho, la administración directa de una cantidad eficaz de una inmunotoxina a un paciente con necesidad de dicho tratamiento puede dar como resultado dosis reducidas de otro producto terapéutico contra el cáncer que tenga eficacia clínicamente significativa. Dicha eficacia de la dosis reducida del producto terapéutico contra el cáncer adicional no puede observarse sin la administración con una inmunotoxina. En consecuencia, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar un tumor o cáncer que comprende administrar una dosis reducida de uno o más productos terapéuticos adicionales.

Además, la terapia de combinación que comprende administrar una inmunotoxina a un paciente con necesidad de dicho tratamiento puede permitir tiempos de tratamiento relativamente cortos en comparación con la duración o el número de ciclos de regímenes de tratamiento estándar. En consecuencia, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar un tumor o un cáncer que comprenden administrar uno o más productos terapéuticos contra el cáncer adicionales durante un periodo relativamente corto y/o en menos ciclos de tratamiento.

Así, según la presente invención, las terapias de combinaciones que comprenden una inmunotoxina y otro producto terapéutico contra el cáncer pueden reducir la toxicidad (es decir, los efectos secundarios) del tratamiento contra el cáncer general. Por ejemplo, una toxicidad reducida, en comparación con una monoterapia u otra terapia de combinación, puede observarse cuando se administra una dosis reducida de inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer, y/o cuando se reduce la duración de un ciclo (es decir, el periodo de una administración única o el periodo de una serie de dichas administraciones), y/o cuando se reduce el número de ciclos.

En una realización preferida, la invención se refiere a procedimientos para tratar y/o mejorar el estado clínico de pacientes que padecen HNSCC. En consecuencia, la invención se refiere a procedimientos para (i) reducir el tamaño del tumor de HNSCC, la velocidad de crecimiento, la invasividad, el grado de malignidad y/o el riesgo de recaída, (ii) prolongar el intervalo carente de enfermedad después del tratamiento y/o (iii) mejorar la función de la respiración, la deglución y/o el habla en un paciente con HNSCC, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad eficaz de una inmunotoxina. La mejora clínica puede determinarse subjetiva u objetivamente, por ejemplo evaluando la capacidad del sujeto para respirar con menos dificultad, la capacidad del sujeto para deglutir líquidos frente a sólidos, el grado de obstrucción, la calidad o volumen del habla y otros índices conocidos en las técnicas clínicas.

En otra realización preferente, la divulgación proporciona procedimientos para tratar y/o mejorar el estado clínico de pacientes que padecen carcinoma de célula transicional superficial de la vejiga. En consecuencia, la divulgación proporciona procedimientos para (i) reducir el tamaño del tumor de carcinoma de vejiga, la velocidad de crecimiento, la invasividad, el grado de malignidad y/o el riesgo de recaída, (ii) prolongar el intervalo carente de enfermedad después de otro tratamiento y/o (iii) curar la enfermedad en un paciente con carcinoma de célula transicional de la vejiga, que comprenden la administración al paciente de una cantidad eficaz de una inmunotoxina. La mejora clínica puede determinarse, por ejemplo, mediante evaluación citológica, citoscopia o biopsia de un modo conocido en las técnicas clínicas.

Como se ha mencionado previamente, una inmunotoxina de la divulgación comprende: (a) un ligando que se une a una proteína de la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para la célula cancerosa. El ligando puede "unirse" a la diana mediante cualquier medio por el que el ligando pueda asociarse con, o unirse a, la toxina. Por ejemplo, el ligando puede unirse a la toxina por medios químicos o recombinantes. Se conocen en la técnica medios químicos para preparar fusiones o conjugados y pueden usarse para preparar la inmunotoxina. El procedimiento usado para conjugar el ligando y la toxina debe ser capaz de unir el ligando con la toxina sin interferir en la capacidad del ligando para unirse a la molécula diana de la célula cancerosa.

En una realización, el ligando y la toxina son ambas proteínas y pueden conjugarse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Existen varios cientos de reticulantes disponibles que pueden conjugar dos proteínas. (Véase, por

ejemplo, "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking". 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor). El reticulante se elige generalmente en base a los grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en el ligando o la toxina. Además, si no hay grupos reactivos puede usarse un reticulante fotoactivable. En determinados casos puede ser deseable incluir un espaciador entre el ligando y la toxina. Los agentes reticulantes conocidos en la técnica incluyen los agentes homobifuncionales: glutaraldehído, adipimidato de dimetilo y bis(diazobenzidina) y los agentes heterobifuncionales: m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida y sulfo-m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida.

Una fusión de proteína ligando proteína-toxina también puede prepararse usando técnicas de ADN recombinantes. En dicho caso, una secuencia de ADN que codifica el ligando se fusiona a una secuencia de ADN que codifica la toxina, dando como resultado una molécula de ADN quimérico. La secuencia de ADN quimérico se transfecta a una célula huésped que expresa la proteína de fusión ligando-toxina. La proteína de fusión puede recuperarse del cultivo celular y purificarse usando técnicas conocidas en la técnica.

Preferentemente, el ligando se une a Ep-CAM. En una realización, la inmunotoxina comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM de la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas. (Esta inmunotoxina se denomina a veces "inmunotoxina dirigida a Ep-CAM" en el presente documento.) En una realización específica, la inmunotoxina comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une al dominio extracelular de Ep-CAM humano y comprende secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) derivadas de anticuerpo MOC-31 unido a; (b) una toxina que es citotóxica para las células cancerosas. Las secuencias de CDR del anticuerpo 4D5MOC-B se muestran en las SEQ ID NO: 4-9.

Las inmunotoxinas dirigidas a Ep-CAM según la invención incluyen, sin limitación, VB4-845 y variantes de la misma, otras inmunotoxinas que comprenden la región variable de MOC31 o variantes de las mismas, así como inmunotoxinas que comprenden otras inmunoglobulinas de cadena sencilla o doble que se unen selectivamente a Ep-CAM, or variantes de las mismas.

En una realización, la porción de unión a Ep-CAM comprende una molécula de inmunoglobulina completa. En otra realización, la porción de unión a Ep-CAM es un dímero de Fab, Fab', scFv, fragmentos de anticuerpos de dominio único o fragmentos Fv estabilizados con disulfuro. En otra realización, la porción de unión a Ep-CAM comprende una cadena pesada variable, una cadena ligera variable, Fab, Fab', scFv, fragmentos de anticuerpos de dominio único o fragmentos Fv estabilizados con disulfuro. Las porciones de la molécula de unión a Ep-CAM pueden estar derivadas de una o más especies, comprendiendo preferentemente porciones derivadas de la especie humana y, más preferentemente, son completamente humanas o están completamente humanizadas. Las regiones diseñadas para facilitar la purificación o para la conjugación a la toxina también pueden incluirse o añadirse a la porción de unión a Ep-CAM.

En una realización específica no limitante, la inmunotoxina comprende VB4-845 como se muestra en la SEQ ID NO:2. En otras realizaciones no limitantes, la inmunotoxina comprende una variante de VB4-845. Una variante de VB4-845 se une al mismo epítipo de Ep-CAM o a un epítipo de Ep-CAM sustancialmente similar que se una a VB4-845, y la variante puede inhibir competitivamente la unión de VB4-845 a Ep-CAM, en condiciones fisiológicas, en al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 %. Una variante de VB4-845 puede comprender el mismo fragmento de exotoxina A de Pseudomonas que VB4-845, o puede comprender una porción diferente de la misma exotoxina o una toxina diferente.

En otra realización no limitante, la inmunotoxina comprende una porción de unión a Ep-CAM que comprende la región variable de MOC31 o una variante de la misma. En otra realización más, la inmunotoxina comprende una porción de unión a Ep-CAM que comprende 4D5MOCB o una variante del mismo. La unión de cualquiera de estas inmunotoxinas a Ep-CAM puede reducirse en al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % mediante competencia con el anticuerpo MOC31 o 4D5MOCB de referencia en condiciones fisiológicas. La afinidad de VB4-845 es $K_D = 1,6 \times 10^{-8}$, usando citometría de flujo indirecta en células vivas. El análisis de Lineweaver-Burke (Cuaderno de datos: 0935, página 50) se realizó usando el procedimiento de Benedict y col. (1997). J. Immunol. Methods, 201:223-231. La afinidad de MOC31B, tal como se describe por Willuda y col. (Cancer Research 59, 5758-5767, 1999) es $K_D = 3,9 \times 10^{-9}$, medida usando RIA y Biacore tal como se describe en procedimientos. En consecuencia, la presente invención incluyen inmunotoxinas que tienen una constante de disociación (K_D) inferior a $2,0 \times 10^{-8}$.

Alternativamente, la inmunotoxina comprende una porción de unión a Ep-CAM diferente de las que se han tratado en los párrafos anteriores, pero que se una selectivamente a Ep-CAM. En una realización preferente, la afinidad de unión de dicha porción de unión a Ep-CAM es al menos de cuatro órdenes de magnitud, preferentemente al menos de tres órdenes de magnitud, más preferentemente menos de dos órdenes de magnitud de la afinidad de unión de VB4-845, PANOREX® o MT-201 medida por técnicas estándar de laboratorio. En realizaciones no limitantes, la porción de unión a Ep-CAM puede bloquear competitivamente la unión de un anticuerpo anti-Ep-CAM conocido, tal como, pero sin limitación, PANOREX® o MT201, a Ep-CAM, en condiciones fisiológicas, en al menos el 0,1 %, 1 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 %.

El experto apreciará que pueden identificarse residuos determinantes de la especificidad. La expresión "residuo determinante de la especificidad", también conocido "SDR", se refiere a un residuo que forma parte del parátipo de un anticuerpo, particularmente residuos CDR; la sustitución individual del mismo por alanina, independientemente de cualesquiera otras mutaciones, disminuye la afinidad por el epítipo en al menos 10 veces, preferentemente en al menos 100 veces, más preferentemente en al menos 1000 veces. Esta pérdida de afinidad destaca la importancia de ese residuo en la capacidad del anticuerpo para unirse al epítipo. Véase, por ejemplo, Tamura y col., 2000, "Structural correlates of an anticarcinoma antibody: Identification of Specificity-Determining Residues (SDRs) and Development of a Minimally Immunogenic Antibody Variant by Retention of SDRs Only. J. Immunol. 164, 1432-1441.

El efecto de mutaciones únicas o múltiples sobre la actividad de unión, particularmente sobre la afinidad de unión, puede evaluarse simultáneamente para evaluar la importancia de una serie particular de aminoácidos en la interacción de unión (por ejemplo, la contribución de la CDR2 de cadena ligera o pesada en la unión). Los efectos de una mutación de aminoácidos también pueden evaluarse secuencialmente para determinar la contribución de un aminoácido determinado cuando se valoran individualmente. Dichas evaluaciones pueden realizarse, por ejemplo, mediante análisis de saturación in vitro (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.180.341; Hilton y col., 1996, "Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor," J Biol Chem. 271:4699-4708) y mutagenesis dirigida al sitio (véanse, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis," Science 244:1081-1085; Bass y col., 1991, "A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor," Proc Natl Acad Sci. USA 88:4498-4502). En la técnica de mutagenesis de análisis de alanina, se introducen mutaciones de alanina únicas en múltiples residuos de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar la actividad biológica para identificar residuos de aminoácidos que son críticos en la actividad de la molécula.

Los sitios de ligando-receptor u otra interacción biológica también pueden identificarse mediante análisis físico de estructura determinada mediante, por ejemplo, resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcado de fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativos (véanse, por ejemplo, de Vos y col., 1992, "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex," Science 255:306-312; Smith y col., 1992, "Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein," J Mol Biol. 224:899-904; Wlodaver y col., 1992, "Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 Å resolution," FEBS Lett. 309:59-64. Adicionalmente, la importancia de aminoácidos individuales particulares, o series de aminoácidos, puede evaluarse mediante comparación con la secuencia de aminoácidos de polipéptidos relacionados o sitios de unión análogos.

Además, el experto apreciará que una avidez aumentada puede compensar una afinidad de unión reducida. La avidez de una inmunotoxina por Ep-CAM es una medida de la fuerza de la unión de la porción de unión a Ep-CAM a Ep-CAM, que tiene múltiples sitios de unión. La fuerza de unión funcional entre Ep-CAM y la porción de unión a Ep-CAM representa la suma de fuerzas de todos los enlaces de afinidad y, por lo tanto, un componente individual puede unirse con una afinidad relativamente baja, pero un multímero de dichos componentes puede demostrar un efecto biológico potente. De hecho, las interacciones múltiples entre sitios de unión a Ep-CAM y epítopos de Ep-CAM pueden mostrar un efecto biológico muy superior al aditivo, es decir, la ventaja de la multivalencia puede ser de muchos órdenes de magnitud con respecto a la constante de equilibrio.

En una realización no limitante, la porción de unión a Ep-CAM tiene una estructura sustancialmente similar a la de 4D5MOCB. La estructura sustancialmente similar puede caracterizarse por referencia a mapas de epítopos que reflejan los puntos de unión de la porción de unión a Ep-CAM de la inmunotoxina a una molécula de Ep-CAM.

Asimismo, puede usarse una diversidad de toxinas para diseñar una inmunotoxina dirigida a Ep-CAM según la invención. En realizaciones preferentes, la toxina comprende un polipéptido que tiene actividad de inactivación de ribosomas que incluye, sin limitación, gelonina, bouganina, saporina, cadena de ricina A, briodina, toxina de difteria, restrictocina y variantes de las mismas. Cuando la proteína es una proteína inactivadora de ribosomas, la inmunotoxina debe internalizarse después de la unión a la célula cancerosa para que la toxina sea citotóxica para las células.

En una realización particular preferente, la porción de toxina comprende al menos una porción tóxica de exotoxina A ("ETA") de *pseudomonas*, o una variante de la misma. En una realización específica, la porción citotóxica comprende una variante de ETA que, cuando se administra sola, es sustancialmente incapaz de unirse a células. En otra realización específica, la porción citotóxica comprende ETA²⁵²⁻⁶⁰⁸. La porción citotóxica puede comprender una o más exotoxinas de *Pseudomonas* conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Kreitman, 1995, "Targeting pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies," Seminars in Cancer Biology 6: 297-306; Pastan, 2003, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin A: a short history," Cancer Immunol. Immunother. 52: 338-341), o variantes de las mismas.

Se conocen en la técnica diversas variantes de exotoxina de *Pseudomonas*, así como procedimientos para producir y usar constructos que comprenden variantes de exotoxina de *Pseudomonas* (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° US2003054012; patente de Estados Unidos N° 6531133; patente de Estados Unidos N° 6426075; patente de Estados Unidos N° 6423513; patente de Estados Unidos N° 6074644; patente de Estados

Unidos N° 5980895; patente de Estados Unidos N° 5912322; patente de Estados Unidos N° 5854044; patente de Estados Unidos N° 5821238; patente de Estados Unidos N° 5705163; patente de Estados Unidos N° 5705156; patente de Estados Unidos N° 5621078; patente de Estados Unidos N° 5602095; patente de Estados Unidos N° 5512658; patente de Estados Unidos N° 5458878; patente de Estados Unidos N° 5082927; patente de Estados Unidos N° 4933288; patente de Estados Unidos N° 4892827; patente de Estados Unidos N° 4677070; patente de Estados Unidos N° 4545985; publicaciones internacionales de patente N° WO98/20135, WO93/25690; WO91/18100; WO91/18099; WO91/09949 y WO88/02401; Kondo y col., 19888, "Activity of immunotoxins constructed with modified pseudomonas exotoxin a lacking the cell recognition domain." J Biol Chem. 263:9470-9475; Batra y col., 1989, "Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferring receptor and a recombinant form of pseudomonas exotoxin." Proc Natl.Acad.Sci.USA 86:8545-8549; Puri y col., 1991, "Expression of high-affinity interleukin 4 receptors on murine sarcoma cells and receptor-mediated cytotoxicity of tumor cells to chimeric protein between interleukin 4 and Pseudomonas exotoxin." Cancer Res 51:3011-3017; Siegall y col., 1992, "Cytotoxicity of chimeric (human murine) monoclonal antibody BR96 IgG, F(ab')₂, and Fab' conjugated to Pseudomonas exotoxin." Bioconjug-Chem 3:302-307; Hall y col., 1994, "In vivo efficacy of intrathecal transferrin-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin against LOX melanoma." Neurosurgery 34:649-655; Kuan y Pai, 1995, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin that target Le y damage human endothelial cells in an antibody-specific mode: relevance to vascular leak syndrome." Clin Cancer Res 1:1589-1594; Kreitman, 1995, "Targeting pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies." Sem Cancer Biol 6:297-306; Kawooya y col., "The expression, affinity purification and characterization of recombinant pseudomonas exotoxin 40 (PE40) secreted from Escherichia coli." J Biotechnol 42:9-22; Kaun y Pai, 1995, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin that target LeY damage human endothelial cells in an antibody-specific mode: Relevance to vascular leak syndrome." Clin Cancer Res 1:1589-1594; Puri y col., 1996, "Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated Pseudomonas exotoxin for therapy of malignant astrocytoma." Cancer Res 56:5631-5637; Pai y col., 1996, "Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: An antibody linked to Pseudomonas exotoxin." Nature Med. 3:350-353; Pai y col., 1998, "Clinical Trials with pseudomonas exotoxin immunotoxins." Curr Top. Microbiol. Immunol. 234: 83-96; Klimka y col., 1999, "An anti-CD30 single chain Fv selected by phage display and fused to pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkinderived cell line." British J Cancer 80:1214-1222; Rand y col., 2000, "Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma." Clin Cancer Res 6:2157-2165; Leland y col., 2000, "Human breast carcinoma cells express type II IL-4 receptors and are sensitive to antitumor activity of chimeric IL-4-pseudomonas exotoxin fusion protein in vitro and in vivo." Molecular Medicine Today 6:165-178; Tur y col., 2001, "An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines." Int J Mol.Med 8:579-584; Onda y col., 2001, "Cytotoxicity of antiosteosarcoma recombinant immunotoxins composed of TP-3 Fv fragments and a truncated pseudomonas exotoxin A." J Immunother 24:144-150; 18."Synergistic interaction between an anti-p185her-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [scfv(frp5)-eta] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2." Schmidt y col., 2001, "Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [scFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2." Gynecol Oncol 80:145-155; Pastan, 2003, "Immunotoxins containing pseudomonas exotoxin A: a short history." Cancer Immunol Immunother 52:338-341; Li y col., 1996, "Crystal structure of the catalytic domain of Pseudomonas exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation." Proc Natl Acad Sci USA. 9:6902-6906; Kreitman y Pastan, 2003, "Immunobiological treatments of hairy-cell leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol. 16:117-33.

En otras realizaciones no limitantes, la toxina comprende un agente que actúa alterando ADN. Así, las toxinas pueden comprender, sin limitación, enedinas (por ejemplo, calicheamicina y esperamicina) y agentes de molécula pequeña que no sean enedinas (por ejemplo, bleomicina, metidiopropil-EDTA-Fe(II)). Otras toxinas útiles según la invención incluyen, sin limitación, daunorrubicina, doxorubicina, distamicina A, cisplatino, mitomicina C, ecteinascidinas, duocarmicina/CC-1065 y bleomicina/pepleomicina.

En otras realizaciones no limitantes, la toxina comprende un agente que actúa alterando tubulina. Dichas toxinas pueden comprender, sin limitación, rizoxina/maitansina, paclitaxel, vincristina y vinblastina, colchicina, auristatina dolastatina 10 MMAE y pelorusido A.

En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de una inmunotoxina de la invención puede comprender un agente alquilante que incluye, sin limitación, Asaley NSC 167780, AZQ NSC 182986, BCNU NSC 409962, Busulfán NSC 750, carboxifalatoplatino NSC 271674, CBDCA NSC 241240, CCNU NSC 79037, CHIP NSC 256927, clorambucilo NSC 3088, clorozotocina NSC 178248, cisplatino NSC 119875, clomesona NSC 338947, cianomorfolinodoxorrubicina NSC 357704, ciclodisona NSC 348948, dianhidrogalactitol NSC 132313, fluorodopán NSC 73754, hepsulfam NSC 329680, hicanтона NSC 142982, melfalán NSC 8806, metilo CCNU NSC 95441, mitomicina C NSC 26980, mitozolamida NSC 353451, mostaza de nitrógeno NSC 762, PCNU NSC 95466, piperazina NSC 344007, piperazinadiona NSC 135758, pipobromán NSC 25154, porfiromicina NSC 56410, mostaza espirohidantoína NSC 172112, teroxirona NSC 296934, tetraplatino NSC 363812, tio-tepa NSC 6396, trietilenmelamina NSC 9706, mostaza de nitrógeno y uracilo NSC 34462 y Yoshi-864 NSC 102627.

En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de una inmunotoxina de la invención puede comprender un agente antimitótico que incluye, sin limitación, alocolchicina NSC 406042, Halicondrina B NSC 609395, colchicina

NSC 757, derivado de colchicina NSC 33410, dolastatina 10 NSC 376128 (derivado de NG-auristatina), maitansina NSC 153858, rizoxina NSC 332598, taxol NSC 125973, derivado de taxol NSC 608832, tiocolchicina NSC 361792, tritil-cisteína NSC 83265, sulfato de vinblastina NSC 49842 y sulfato de vincristina NSC 67574.

5 En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de una inmunotoxina de la invención puede comprender un inhibidor de topoisomerasa I que incluye, sin limitación, camptotecina NSC 94600, sal de Na de camptotecina NSC 100880, aminocamptotecina NSC 603071, derivado de camptotecina NSC 95382, derivado de camptotecina NSC 107124, derivado de camptotecina NSC 643833, derivado de camptotecina NSC 629971, derivado de camptotecina NSC 295500, derivado de camptotecina NSC 249910, derivado de camptotecina NSC 606985, derivado de camptotecina NSC 374028, derivado de camptotecina NSC 176323, derivado de camptotecina NSC 295501, derivado de camptotecina NSC 606172, derivado de camptotecina NSC 606173, derivado de camptotecina NSC 610458, derivado de camptotecina NSC 618939, derivado de camptotecina NSC 610457, derivado de camptotecina NSC 610459, derivado de camptotecina NSC 606499, derivado de camptotecina NSC 610456, derivado de camptotecina NSC 364830, derivado de camptotecina NSC 606497 y morfolinodoxorrubicina NSC 354646.

15 En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de una inmunotoxina de la invención puede comprender un inhibidor de topoisomerasa II que incluye, sin limitación, doxorubicina NSC 123127, amonafida NSC 308847, m-AMSA NSC 249992, derivado de antrapirazol NSC 355644, pirazoloacridina NSC 366140, bisantreno HCL NSC 337766, daunorrubicina NSC 82151, deoxidoxorrubicina NSC 267469, mitoxantrona NSC 301739, menogaril NSC 269148, N,N-dibencil-daunomicina NSC 268242, oxantrazol NSC 349174, rubidazona NSC 164011, VM-26 NSC 122819 y VP-16 NSC 141540.

20 En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de una inmunotoxina de la invención puede comprender un antimetabolito de ARN o ADN que incluye, sin limitación, L-alanosina NSC 153353, 5-azacitidina NSC 102816, 5-fluorouracilo NSC 19893, acivicina NSC 163501, derivado de aminopterina NSC 132483, derivado de aminopterina NSC 184692, derivado de aminopterina NSC 134033, un antifol NSC 633713, un antifol NSC 623017, antifol soluble de Baker NSC 139105, dicloralil-lawsona NSC 126771, brequinar NSC 368390, ftorafur (pro-fármaco) NSC 148958, 5,6-dihidro-5-azacitidina NSC 264880, metotrexato NSC 740, derivado de metotrexato NSC 174121, N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) NSC 224131, pirazofurina NSC 143095, trimetrexato NSC 352122, 3-HP NSC 95678, 2'-deoxi-5-fluorouridina NSC 27640, 5-HP NSC 107392, alfa-TGDR NSC 71851, glicinato de afidicolina NSC 303812, ara-C NSC 63878, 5-aza-2'-deoxicitidina NSC 127716, beta-TGDR NSC 71261, ciclocitidina NSC 145668, guanazol NSC 1895, hidroxurea NSC 32065, inosina glicodialdehído NSC 118994, macbecina II NSC 330500, pirazoloimidazol NSC 51143, tioguanina NSC 752 y tiopurina NSC 755.

Además, una citotoxina puede modificarse para disminuir o inhibir la unión fuera del contexto de la inmunotoxina, o para reducir tipos específicos de toxicidad. Por ejemplo, la citotoxina puede modificarse para ajustar el punto isoelectrónico a aproximadamente 7,0 de modo que se reduzca la toxicidad en el hígado.

35 Los resultados clínicos de tratamientos contra el cáncer usando una inmunotoxina de la invención son fácilmente perceptibles para un experto en la técnica relevante, tal como un médico. Por ejemplo, ensayos médicos estándar para medir marcadores clínicos de cáncer pueden ser indicadores significativos de la eficacia del tratamiento. Dichos ensayos pueden incluir, sin limitación, examen físico, escalas de rendimiento, marcadores de la enfermedad, ECG de 12 derivaciones, mediciones del tumor, biopsia de tejido, citoscopia, citología, cálculos del diámetro más largo del tumor, radiografía, imagen digital del tumor, signos vitales, peso, recuerdo de eventos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicaciones concomitantes, evaluación del dolor, química de sangre y suero, análisis de orina, tomografía computerizada (TC) y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de una terapia de combinación que comprende la inmunotoxina y otro producto terapéutico contra el cáncer pueden determinarse mediante estudios comparativos con pacientes que se están sometiendo a monoterapia.

45 Particularmente en el caso de HNSCC, la mejora en la respiración, la deglución, el habla y determinadas mediciones de calidad de vida son fácilmente verificables. Adicionalmente, la remisión de HNSCC puede evaluarse usando criterios aceptados por el experto. Véase, por ejemplo, Therasse y col., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. Feb 2;92(3):205-16.

50 La dosis eficaz de inmunotoxina que se va a administrar durante un ciclo varía según el modo de administración. La administración directa (por ejemplo, inyección por vía intratumoral) requiere dosis corporales totales de inmunoglobulina mucho más pequeñas en comparación con la administración intravenosa sistémica de la inmunotoxina. Será evidente para un experto que la administración local puede tener como consecuencia dosis corporales más reducidas y en esas circunstancias, y los niveles en plasma circulantes bajas resultantes de inmunotoxina serían esperados y deseados.

55 Además, la dosis eficaz de un constructo de inmunotoxina específico puede depender de factores adicionales que incluyen el tipo de cáncer, el tamaño del tumor en el caso de HNSCC, el estadio del cáncer, la toxicidad de la inmunotoxina para el paciente, la especificidad de dirigirse a células cancerosa, así como la edad, el peso y la salud del paciente.

- 5 En una realización, la dosis eficaz por administración directa de inmunotoxina puede variar de aproximadamente 10 a 3000, 20 a 900, 30 a 800, 40 a 700, 50 a 600, 60 a 500, 70 a 400, 80 a 300, 90 a 200, o 100 a 150 microgramos/tumor/día. En otras realizaciones, la dosis puede variar de aproximadamente 10 a 20, 21 a 40, 41 a 80, 81 a 100, 101 a 130, 131 a 150, 151 a 200, 201 a 280, 281 a 350, 351 a 500, 501 a 1000, 1001 a 2000, o 2001 a 3000 microgramos/tumor/día. En realizaciones específicas, la dosis puede ser al menos aproximadamente 20, 40, 80, 130, 200, 280, 400, 500, 750, 1000, 2000 o 3000 microgramos/tumor/día.
- 10 En otra realización, la dosis eficaz de inmunotoxina puede variar de aproximadamente 100 a 5000, 200 a 4000, 300 a 3000, 400 a 2000, 500 a 1000, 600 a 900, o 700 a 1500 microgramos/tumor/mes. En otras realizaciones, la dosis puede variar de aproximadamente 100 a 199, 200 a 399, 400 a 649, 650 a 999, 1000 a 1799, 1800 a 2499, 2500 a 3499, 3500 a 4999, 5000 a 7499, 7500 a 10000, o 10001 a 20000 microgramos/tumor/mes. En realizaciones específicas, la dosis puede ser al menos aproximadamente 100, 200, 400, 650, 1000, 1400, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 7500, 10000 o 20000 microgramos/tumor/mes.
- 15 En otra realización, la dosis eficaz de inmunotoxina da como resultado una concentración intratumoral de al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 100, 200, 300, 400 o 500 microgramos/cm³ de la inmunotoxina. En otras realizaciones, la concentración intratumoral resultante de inmunotoxina es aproximadamente 5 a 500, 10 a 400, 15 a 300, 20 a 200, 25 a 100, 30 a 90, 35 a 80, 40 a 70, 45 a 60 o 50 a 55 microgramos/cm³. En otras realizaciones, la concentración intratumoral resultante de inmunotoxina es aproximadamente 10 a 15, 16 a 20, 21 a 25, 26 a 30, 31 a 35, 36 a 40, 41 a 45, 46 a 50, 51 a 55, 56 a 60, 61 a 65, 66 a 70, 71 a 75, 76 a 80, 81 a 85, 86 a 90, 91 a 95, 96 a 100 o 100 a 200 microgramos/cm³.
- 20 En otra realización, la dosis eficaz de inmunotoxina da como resultado una concentración en plasma inferior a 0,1, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 microgramos/litro. En otras realizaciones, la concentración en circulación resultante de inmunotoxina es aproximadamente 0,1 a 50, 1 a 40, 2,5 a 30, 5 a 20 o 7,5 a 10 microgramos/litro. En otras realizaciones, la concentración en circulación resultante de inmunotoxina es aproximadamente 0,1 a 1, 1,1 a 2,4, 2,5 a 5, 5,1 a 7,4, 7,5 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 30, 31 a 40 o 41 a 50 microgramos/litro.
- 25 En una realización particular no limitante, la dosis eficaz de la inmunotoxina se encuentra entre aproximadamente 100 y 3000 microgramos/tumor/mes, por ejemplo aproximadamente 100, 200, 300, 400, 750 o 1000 microgramos/tumor/mes, en la que se administra al paciente una dosis única por día. La dosis única se administra aproximadamente cada mes durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses consecutivos. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 meses después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 meses.
- 30 En una realización particular no limitante, la dosis eficaz de la inmunotoxina se encuentra entre aproximadamente 20 y 1240 microgramos/tumor/día, por ejemplo aproximadamente 20, 40, 80, 130, 200 o 280 microgramos/tumor/día o aproximadamente 100, 200, 330, 500, 700, 930, 1240 microgramos/tumor/día, en la que se administra al paciente una dosis única por día. La dosis única se administra aproximadamente cada día (uno o más días pueden saltarse opcionalmente) durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días consecutivos. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente 1, 2, 4, 3 o 5 semanas.
- 35 El volumen de inyección es preferentemente al menos una cantidad eficaz, que es apropiada para el tipo y la ubicación del tumor. El volumen de inyección máximo en una dosis única puede encontrarse entre aproximadamente el 25 % y el 75 % del volumen del tumor, puede ser por ejemplo aproximadamente un cuarto, un tercio o tres cuartos del volumen estimado del tumor diana. En una realización específica no limitante, el volumen de inyección máximo en una dosis única es aproximadamente el 30 % del volumen del tumor.
- 40 En otra realización, la inmunotoxina se administra por vía intratumoral a una dosis total por ciclo equivalente a, o inferior a, la dosis máxima tolerada establecida en un ensayo de seguridad pero la dosificación se estandariza con relación al volumen del tumor. Por ejemplo, los sujetos recibirán entre 1 microgramo por cm³ y 500 microgramos por cm³ de tumor o una dosis suficiente para alcanzar aproximadamente entre 14 picomoles y 7 nanomoles por cm³ de tejido tumoral. La dosis se administrará en un volumen que no exceda aproximadamente el 20-50 % del volumen del tumor. La inmunotoxina se diluirá en una solución salina adecuada. Por ejemplo, para un tumor con un volumen estimado de 3 cm³, una dosis objetivo de 14 picomoles (1 microgramo por cm³) y un volumen relativo de inyección máximo de aproximadamente 1/3 del tumor, se diluirán 3 microgramos de inmunotoxina en aproximadamente 1 ml de diluyente.
- 45 En otra realización particular, la dosis eficaz de la inmunotoxina se encuentra entre aproximadamente 20 y 300 microgramos/tumor/día, siendo por ejemplo aproximadamente 20, 40, 80, 130, 200 o 280 microgramos/tumor/día, administrándose al paciente una dosis única por día. El volumen de inyección máximo en una dosis única puede encontrarse entre aproximadamente el 25 % y el 75 % del volumen del tumor, pudiendo ser por ejemplo aproximadamente un cuarto, un tercio o tres cuartos del volumen estimado del tumor diana. La dosis única se administra cada dos días durante aproximadamente 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 o 31 días consecutivos. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos, estando separado
- 55

cada ciclo por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas.

En una realización específica no limitante, se administra VB4-845 a una dosis de aproximadamente 280 microgramos/tumor/día, administrándose al paciente una dosis única por día. El volumen de inyección máximo en una dosis única es aproximadamente un tercio del volumen estimado del tumor diana. La dosis única se administra cada día durante aproximadamente cinco días consecutivos. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente un mes después, preferentemente un mes a partir del primer día del primer ciclo. El régimen de tratamiento puede incluir tres ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente una semana sin tratamiento.

En otra realización específica no limitante, se administra VB4-845 a una dosis de aproximadamente 280 microgramos/tumor/día, administrándose al paciente una dosis única por día. El volumen de inyección máximo en una dosis única es aproximadamente un tercio del volumen estimado del tumor diana. La dosis única se administra cada dos días durante aproximadamente una semana. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente una semana después. El régimen de tratamiento puede incluir tres ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente una semana.

En otra realización específica más, se administra VB4-845 a una dosis de aproximadamente 280 microgramos/tumor/día, administrándose al paciente una dosis única por día. El volumen de inyección máximo en una dosis única es aproximadamente un tercio del volumen estimado del tumor diana. La dosis única se administra cada dos días durante aproximadamente tres semanas. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente una semana después. El régimen de tratamiento puede incluir tres ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente una semana.

Para la administración a una cavidad tal como la vejiga urinaria, la dosis eficaz de la inmunotoxina se encuentra entre aproximadamente 100 y 2000 microgramos en 50 ml/semana (equivalentes a una concentración de entre aproximadamente 29 nanomolar a 580 nanomolar), siendo por ejemplo aproximadamente 100, 200, 335, 500, 700, 930, 1240 microgramos en 50 ml/semana, administrándose al paciente una dosis única por semana y el tejido del tumor se expone a la inmunotoxina durante al menos aproximadamente 30 minutos. Por ejemplo, la solución se mantiene en la cavidad durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas. En una realización específica no limitante, el tejido tumoral se expone a la inmunotoxina durante aproximadamente 1 hora o más preferentemente durante aproximadamente 2 horas. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo subsiguiente aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 semanas después de la dosis previa. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos, estando separado cada ciclo por aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 meses.

Para cavidades más grandes o más pequeñas tales como quistes o vejigas sustancialmente más pequeñas o más grandes que la media, el volumen puede ajustarse para asegurar una exposición adecuada del tejido sin sobrecargar la cavidad. Cuando se necesita ajustar el volumen, la dosis eficaz de la inmunotoxina debería encontrarse entre una aproximadamente 20 y 600 nanomolar en concentración para una toxina con un sitio de unión por molécula.

La dosificación para la inmunotoxina también puede expresarse como molaridad del sitio de unión para la proteína de las células cancerosas. Por ejemplo, la inmunotoxina VB4-845 tiene un peso molecular de 69,7 kDa y un sitio de unión para Ep-Cam. Se sabe que otros formatos de inmunotoxina tales como formatos divalentes, fragmentos Fab, Fab' o (Fab')₂ podrían tener un peso molecular diferente en virtud del número de aminoácidos en la cadena o cadenas de polipéptidos. Se sabe también que para un formato similar se podría alterar el peso molecular uniendo grupos adicionales al polipéptido tales como restos de azúcar o polietilenglicol. El uso de una toxina diferente o una variable diferente de la toxina podría tener como resultado también una inmunotoxina con un peso molecular diferente de la VB4-845 usada en los ejemplos. Además, también podrían realizarse cambios en la cadena de polipéptidos que darían como resultado un fragmento más largo o más corto y además sin deshacer la unión de la inmunotoxina a la proteína elegida de la célula cancerosa. Todas estas variaciones se contemplan en la presente solicitud. Como resultado puede ser útil expresar la dosificación de la inmunotoxina en términos del número de moles de los sitios de unión para la proteína de las células cancerosas. En los ejemplos y las diversas realizaciones, las dosificaciones se expresan en microgramos y se basan en el peso molecular de VB4-845. La fórmula siguiente proporciona un modo sencillo de transformar microgramos en equivalentes en moles de sitios de unión; $(1 \times 10^{-6} \text{ g/número de g por mol de inmunotoxina}) \times \text{número de sitios de unión por molécula de inmunotoxina} = \text{Factor de conversión para pasar de microgramos } (1 \times 10^{-6} \text{ g}) \text{ de una IT dada a moles de sitios de unión}$. Para VB4-845, una inmunotoxina con un único sitio de unión por molécula, la conversión se realizaría como sigue:

$$\text{Número de microgramos} \times 14,3 \times 10^{-12} \text{ moles/microgramo} = \text{número de moles.}$$

Por ejemplo, cuando se inyectan 3000 microgramos en un tumor un día dado, $3000 \text{ microgramos} \times 14,3 \times 10^{-12} \text{ moles/microgramo} = 42,9 \times 10^{-9} \text{ moles de sitios de unión}$ (o 42,9 nanomoles o 42.900 picomoles). Cuando la dosis se expresa en términos de una concentración en un diluyente o mediante volumen de tejido tumoral, se puede transformar el peso de la inmunotoxina en moles y después dividir este número de moles por el volumen de diluyente cuando el resultado pueda expresarse en términos de molaridad o mediante el volumen del tejido tumoral cuando el resultado pueda expresarse como moles por cm³ (u otras unidades de volumen) de tejido.

Por ejemplo, cuando se van a administrar 1240 microgramos a la vejiga en un volumen de 50 ml: $1240 \text{ microgramos} \times 14,3 \times 10^{-12} \text{ moles/microgramo} = \text{aproximadamente } 18 \times 10^{-12} \text{ moles de sitios de unión y } 18 \times 10^{-12} \text{ moles/50 ml (o 0,05 litros)} = \text{aproximadamente } 355 \times 10^{-9} \text{ M (o 355 nanomolar)}$.

- 5 La dosis eficaz del producto terapéutico contra el cáncer adicional que se va a administrar conjuntamente con una inmunotoxina durante un ciclo también varía según el modo de administración. El uno o más compuestos terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse por vía intratumoral, o por otras vías de administración. Típicamente, los agentes quimioterapéuticos se administran por vía sistémica. La dosificación y los regímenes de tratamiento estándar son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la última edición del índice de Merck y la Physician's Desk Reference).
- 10 Por ejemplo, en una realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende dacarbazina en una dosis que varía de aproximadamente 200 a 4000 mg/m²/ciclo. En una realización preferente, la dosis varía de 700 a 1000 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende fludarabina en una dosis que varía de aproximadamente 25 a 50 mg/m²/ciclo.
- 15 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende citosina arabinósido (Ara-C) en una dosis que varía de aproximadamente 200 a 2.000 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende docetaxel en una dosis que varía de aproximadamente 1,5 a 7,5 mg/kg/ciclo.
- 20 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende paclitaxel en una dosis que varía de aproximadamente 1,5 a 15 mg/kg/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende cisplatino en una dosis que varía de aproximadamente 5 a 20 mg/kg/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende 5-fluorouracilo en una dosis que varía de aproximadamente 5 a 20 mg/kg/ciclo.
- 25 En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende doxorrubicina en una dosis que varía de aproximadamente 2 a 8 mg/kg/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende epipodofilotoxina en una dosis que varía de aproximadamente 40 a 160 mg/kg/ciclo.
- 30 En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende ciclofosfamida en una dosis que varía de aproximadamente 50 a 200 mg/kg/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende irinotecán en una dosis que varía de aproximadamente 50 a 75, 75 a 100, 100 a 125 o 125 a 150 mg/m²/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende vinblastina en una dosis que varía de aproximadamente 3,7 a 5,4, 5,5 a 7,4, 7,5 a 11 u 11 a 18,5 mg/m²/ciclo.
- 35 En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende vincristina en una dosis que varía de aproximadamente 0,7 a 1,4 o 1,5 a 2 mg/m²/ciclo.
- En otra realización más, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende metotrexato en una dosis que varía de aproximadamente 3,3 a 5, 5 a 10, 10 a 100 o 100 a 1.000 mg/m²/ciclo.
- 40 La terapia de combinación con una inmunotoxina puede sensibilizar el cáncer el tumor a la administración de un producto terapéutico contra el cáncer adicional. En consecuencia, la presente invención contempla terapias de combinación para prevenir, tratar y/o prevenir la recaída de cáncer que comprenden la administración de una cantidad eficaz de una inmunotoxina antes de, subsiguientemente o concurrentemente con una dosis reducida de un producto terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el tratamiento inicial con una inmunotoxina puede reducir la sensibilidad de un cáncer o tumor a una exposición subsiguiente a una dosis de producto terapéutico contra el cáncer.
- 45 La dosis está cercana, o es inferior, al intervalo inferior de dosificaciones estándar cuando el producto terapéutico contra el cáncer se administra solo, o en ausencia de inmunotoxina. Cuando se administran concurrentemente, la inmunotoxina puede administrarse de forma separada al compuestos terapéutico contra el cáncer, y opcionalmente usando un modo de administración diferente.
- 50 En consecuencia, en una realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende cisplatino, por ejemplo, PLATINOL o PLATINOL-AQ (Bristol Myers), en una dosis que varía de aproximadamente 5 a 10, 11 a 20, 21 a 40 o 41 a 75 mg/m²/ciclo.

- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende carboplatino, por ejemplo, PARAPLATIN (Bristol Myers), en una dosis que varía de aproximadamente 2 a 3, 4 a 8, 9 a 16, 17 a 35 o 36 a 75 mg/m²/ciclo.
- 5 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende ciclofosfamida, por ejemplo, CYTOXAN (Bristol Myers Squibb), en una dosis que varía de aproximadamente 0,25 a 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2, 3 a 5, 6 a 10, 11 a 20 o 21 a 40 mg/m²/ciclo.
- 10 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende citarabina, por ejemplo, CYTOSAR-U (Farmacia & Upjohn), en una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 1, 2 a 4, 5 a 10, 11 a 25, 26 a 50 o 51 a 100 mg/m²/ciclo. En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende citarabina liposoma, por ejemplo DEPOCYT (Chiron Corp.), en una dosis que varía de aproximadamente 5 a 50 mg/m²/ciclo.
- 15 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende dacarbazina, por ejemplo, DTIC or DTICDOME (Bayer Corp.), en una dosis que varía de aproximadamente 15 a 250 mg/m²/ciclo o varía de aproximadamente 0,2 a 2 mg/kg/ciclo.
- 20 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende topotecán, por ejemplo, HYCAMTIN (SmithKline Beecham), en una dosis que varía de aproximadamente 0,1 a 0,2, 0,3 a 0,4, 0,5 a 0,8 o 0,9 a 1,5 mg/m²/ciclo. En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende irinotecán, por ejemplo, CAMPTOSAR (Farmacia & Upjohn), en una dosis que varía de aproximadamente 5 a 9, 10 a 25 o 26 a 50 mg/m²/ciclo.
- 25 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende fludarabina, por ejemplo, FLUDARA (Berlex Laboratories), en una dosis que varía de aproximadamente 2,5 a 5, 6 a 10, 11 a 15 o 16 a 25 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende citosina arabinósido (Ara-C) en una dosis que varía de aproximadamente 200 a 2000 mg/m²/ciclo, 300 a 1000 mg/m²/ciclo, 400 a 800 mg/m²/ciclo o 500 a 700 mg/m²/ciclo.
- 30 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhone Poulenc Rorer), en una dosis que varía de aproximadamente 6 a 10, 11 a 30 o 31 a 60 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende paclitaxel, por ejemplo, TAXOL (Bristol Myers Squibb), en una dosis que varía de aproximadamente 10 a 20, 21 a 40, 41 a 70 o 71 a 135 mg/kg/ciclo.
- 35 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende 5-fluorouracilo en una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg/ciclo, 1 a 4 mg/kg/ciclo o 2-3 mg/kg/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMYCIN (Farmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), en una dosis que varía de aproximadamente 2 a 4, 5 a 8, 9 a 15, 16 a 30 o 31 a 60 mg/kg/ciclo.
- 40 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende etopósido, por ejemplo, VEPESID (Farmacia & Upjohn), en una dosis que varía de aproximadamente 3,5 a 7, 8 a 15, 16 a 25 o 26 a 50 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende vinblastina, por ejemplo, VELBAN (Eli Lilly), en una dosis que varía de aproximadamente 0,3 a 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2 o 3 a 3,6 mg/m²/ciclo.
- 45 En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende vincristina, por ejemplo, ONCOVIN (Eli Lilly), en una dosis que varía de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el producto terapéutico contra el cáncer adicional comprende metotrexato en una dosis que varía de aproximadamente 0,2 a 0,9, 1 a 5, 6 a 10 u 11 a 20 mg/m²/ciclo.
- 50 En otra realización, se administra una inmunotoxina en combinación con al menos otro compuesto inmunoterapéutico que incluye, sin limitación, rituxán, rituximab, campat-1, gemtuzumab y trastuzutmb.
- En otra realización, se administra una inmunotoxina en combinación con uno o más agentes antiangiogénicos que incluyen, sin limitación, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, serpina (inhibidor de serina proteasa), antitrombina, fragmentos proteolíticos con extremo N terminal de 29 kDa y extremo C terminal de 40 kDa de fibronectina, fragmento proteolíticos de 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico de 7,8 kDa de factor de plaquetas 4, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente al factor de plaquetas 4 (Maione y col., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento de colágeno I (Tolma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497-51), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de trombospondina I

(Tolsma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de SPARC (Sage y col., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334), y una variante de los mismos, incluida una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 En otra realización, se administra una inmunotoxina en combinación con un régimen de radioterapia. La terapia también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, la inmunotoxina puede administrarse en combinación con radioterapia y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Aduvicol), carboplatino (Paraplatin), y/o paclitaxel (Taxol). El tratamiento con la inmunotoxina puede permitir usar dosis bajas de radiación y/o tratamientos de radiación de menor frecuencia, que pueden, por ejemplo, reducir la incidencia de dolores de garganta agudos que impidan la función de deglución, lo que tiene como consecuencia, potencialmente, una pérdida de peso y deshidratación.

10 En otra realización, se administra una inmunotoxina en combinación con una o más citocinas que incluyen, sin limitación, una linfocina, factores de necrosis tumoral, citosina similar al factor de necrosis tumoral, linfotoxina, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina (incluidas, sin limitación, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12, interleucina-15, interleucina-18), y una variante de las mismas, incluidas sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

15 En otra realización más, se administra una inmunotoxina en combinación con una vacuna contra el cáncer que incluye, sin limitación, células o tejidos autólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna viva de BCG, proteínas de linaje de melanocitos y antígenos específicos de tumor, mutados.

20 En otra realización más, se administra una inmunotoxina en asociación con terapia hormonal. Los productos terapéuticos hormonales incluyen, sin limitación, un agonista hormonal, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON)) y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoide, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoide, mineralocorticoide, estrógeno, testosterona, progestina).

25 En otra realización más, se administra una inmunotoxina en asociación con un programa de terapia génica para tratar o prevenir cáncer.

30 En otra realización más, se administra una inmunotoxina dirigida a Ep-CAM en combinación con uno o más agentes que aumentan la expresión de Ep-CAM en las células tumorales de interés. La expresión de Ep-CAM se aumenta preferentemente de modo que se exprese un número mayor de moléculas de Ep-CAM en la superficie de la célula tumoral. Por ejemplo, el agente puede inhibir los ciclos normales de endocitosis de antígeno de Ep-CAM. Dicho tratamiento de combinación puede mejorar la eficacia clínica de la inmunotoxina dirigida a Ep-CAM sola o con otros productos terapéuticos contra el cáncer o radioterapia. En realizaciones específicas no limitantes, el agente que aumenta la expresión de Ep-CAM en las células tumorales es tartrato de vinorelbina (Navelbine) y/o paclitax (Taxol). Véase, por ejemplo, Thurmond y col., 2003, "Adenocarcinoma cells exposed in vitro to Navelbine or Taxol increase Ep-CAM expression through a novel mechanism." *Cancer Immunol Immunother.* Jul; 52(7):429-37.

35 La terapia de combinación puede aumentar, por lo tanto, la sensibilidad del cáncer o tumor a la inmunotoxina administrada y/o producto terapéutico contra el cáncer adicional. De este modo, pueden ser posibles ciclos de tratamiento más cortos, reduciendo de este modo eventos tóxicos. En consecuencia, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de cáncer que comprende administrar a un paciente con necesidad de ello una cantidad eficaz de una inmunotoxina y al menos otro producto terapéutico contra el cáncer durante un ciclo de tratamiento corto. La duración del ciclo puede variar de aproximadamente 1 a 30, 2 a 27, 3 a 15, 4 a 12, 5 a 9 o 6-8 días. La duración del ciclo puede variar según el producto terapéutico contra el cáncer específico que se use. La invención también contempla la administración continua o discontinua, o dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. Una duración de ciclo apropiada para un producto terapéutico contra el cáncer específico será evidente para el experto, y la divulgación contempla la evaluación continua de agendas de tratamiento óptimas para cada producto terapéutico contra el cáncer. Las directrices específicas para el experto son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Therasse y col., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," *J Natl Cancer Inst.* Feb 2;92(3):205-16.

40 Alternativamente, pueden ser deseables ciclos de tratamiento más largos. En consecuencia, la duración del ciclo puede variar de aproximadamente 10 a 56, 12 a 48, 14 a 28, 16 a 24 o 18 a 20 días. La duración del ciclo puede variar según el producto terapéutico contra el cáncer específico que se use.

45 La presente invención contempla al menos un ciclo, preferentemente más de un ciclo durante el que se administra un único producto terapéutico contra el cáncer o series de productos terapéuticos. Un número total apropiado de ciclos, y los intervalos entre ciclos, se apreciarán por parte de un experto. El número de ciclos puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 ciclos. El intervalo entre ciclos puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días. La invención contempla la evaluación continua de agendas de tratamiento óptimas para cada inmunotoxina y producto terapéutico contra el cáncer adicional.

En una realización no limitante de la invención, la inmunotoxina se administra directamente en dosis elevadas (por ejemplo, una dosis que tiene como resultado más de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 microgramos/cm³) durante periodos cortos. En consecuencia, en una realización específica no limitante, la inmunotoxina se administra por vía intratumoral en una dosis que da como resultado una concentración intratumoral de inmunotoxina de al menos aproximadamente 200, 300, 400 o 500 microgramos/cm³ una vez a la semana durante dos semanas.

Una inmunotoxina según la invención puede estar comprendida en una composición farmacéutica o en un medicamento. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración directa incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener adicionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor pretendido. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las soluciones y suspensiones de inyección improvisada pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. La inmunotoxina puede suministrarse, por ejemplo, pero sin limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua o solución salina estéril antes de la administración al paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen composiciones no tóxicas esencialmente químicamente inertes que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerina, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deberían contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración directa al paciente.

En otra realización, una composición farmacéutica comprende una inmunotoxina y uno o más productos terapéuticos contra el cáncer adicionales, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

En diversas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se administra directamente a la región del tumor o los tumores mediante, por ejemplo, infusión local durante cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía), inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. Un implante puede ser de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Los supositorios generalmente contienen ingredientes activos en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso.

En otras realizaciones, puede disponerse un sistema de liberación controlada en la proximidad del tumor diana. Por ejemplo, una microbomba puede suministrar dosis controladas directamente a la región del tumor, regulando finamente, por lo tanto, los tiempos de suministro y la concentración de la composición farmacéutica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138).

La presente divulgación también proporciona un kit que comprende una cantidad eficaz de una inmunotoxina, opcionalmente, en combinación con uno o más productos terapéuticos contra el cáncer, junto con instrucciones para usar el mismo para tratar HNSCC o cáncer de vejiga.

Según un aspecto de la presente divulgación, la inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer se administran al paciente mediante administración directa. En consecuencia, la inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer pueden administrarse, sin limitación, mediante una o más inyecciones directas en el tumor, mediante perfusión continua o discontinua en el tumor, mediante introducción de un depósito de la inmunotoxina, mediante introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor, mediante introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor, y/o mediante aplicación directa en el tumor. Con el modo de administración "en el tumor", también se contempla la introducción de la inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer a la región del tumor, o en un vaso sanguíneo o vaso linfático que fluye de modo sustancialmente directo a la región del tumor. En cada caso, la composición farmacéutica se administra en al menos una cantidad suficiente para lograr el punto final y, si es necesario, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se contempla que la inmunotoxina pueda administrarse por vía intratumoral, mientras que cualquier otro producto terapéutico contra el cáncer pueda administrarse al paciente mediante otro modo de administración (por ejemplo, por vía intravenosa). Adicionalmente, cuando se pretende administrar al paciente múltiples productos terapéuticos contra el cáncer, la inmunotoxina y uno o más de los otros productos terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse por vía intratumoral, mientras que otros productos terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse mediante otros modos de administración (por ejemplo, por vía intravenosa y por vía oral).

En una realización particular no limitante, la inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer pueden

5 administrarse mediante inyección intratumoral, por ejemplo, siguiendo la plantilla mostrada en la Figura 1 (véase Khuri y col., 2000, "A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer," *Nature Med.* 6:879-885). La inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer pueden suspenderse comprendiendo una solución acuosa tamponada, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfatos ("PBS"). El volumen de la suspensión que comprende la inmunotoxina puede ser inferior a aproximadamente el 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 o el 95 % del volumen estimado de la masa tumoral que se va a inyectar. En realizaciones específicas, el volumen de la suspensión que comprende la inmunotoxina es inferior a aproximadamente el 30, 40 o el 50 % del volumen estimado de la masa tumoral diana.

10 Con cada administración de la inmunotoxina y/u otro producto terapéutico contra el cáncer, al menos se realiza al menos una punción en la piel o la mucosa bucal en el sitio a aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % de la distancia desde el centro del tumor estimado a la periferia del tumor. La administración de la inmunotoxina mediante inyección directa puede dar como resultado uno o más trayectos de aguja que surgen radialmente desde el centro de la masa tumoral. En una realización particular no limitante, los trayectos de agujas pueden estar orientados sustancialmente tal como se representan en la Figura 1.

15 Para carcinoma de vejiga, la inmunotoxina puede introducirse mediante catéter tal como se describe en el Ejemplo 15.

20 En una realización no limitante de la invención, se usan técnicas de imagen médicas para guiar la administración de la inmunotoxina directamente al tumor. Esto es particularmente útil en algunos tumores de la cabeza y el cuello y en otros tipos de tumor que son de difícil acceso. En estos casos, la guía por imágenes de la herramienta de administración (aguja, catéter, aparato de liberación lenta, etc.) se usa para evitar daños a, o la administración a estructuras anatómicas críticas tales como vasos sanguíneos, aparato nervioso, etc., y para asegurar que la inmunotoxina se distribuye adecuadamente a lo largo de las tres dimensiones del tumor. Las técnicas de guía por imágenes son bien conocidas en la técnica médica y comprenden ultrasonidos, tomografía computerizada (CT), rayos X y tomografía por emisión de positrones (PET).

25 La presente invención se entenderá mejor mediante las enseñanzas de ejemplos siguientes. Los ejemplos establecidos en el presente documento no pretenden limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Inmunotoxina VB4-845.

30 La VB4-845 es una inmunotoxina que consiste en un fragmento de anticuerpo humano recombinante Fv monocatenario que están fusionado a una forma truncada de exotoxina A de *Pseudomonas* (ETA 252-608). El fragmento de anticuerpo está derivado del fragmento de anticuerpo monocatenario de MOC31 humanizado, 4D5MOCB, que se une específicamente a Ep-CAM.¹⁶⁻¹⁸

35 La exotoxina A es una de las proteínas tóxicas liberadas por cepas patógenas de *Pseudomonas aeruginosa*¹⁹. Se secreta como una proenzima con un peso molecular de 66.000 daltons²⁰. La exotoxina A se transloca en células de mamífero susceptibles, en las que la alteración covalente de la molécula la hace enzimáticamente activa. La exotoxina A de *Pseudomonas* bloquea de forma irreversible la síntesis de proteínas en células ribosilando con difosfato de adenosina un residuo de histidina modificado postraduccionalmente del factor 2 de elongación, denominado diftamida, e induce la apoptosis.⁴ La versión truncada de ETA usada en este constructo, aunque contiene aún los dominios para inducir la muerte celular, carece de dominio de unión a la célula, evitando de este modo que la porción de ETA penetre en células a las que no se dirige la porción de anticuerpo de la inmunotoxina.

40 La secuencia génica que codifica una forma truncada de la ETA (ETA²⁵²⁻⁶⁰⁸) y la secuencia de scFv 4D5MOCB de unión a Ep-CAM se usaron para el constructo VB4-845. La molécula contiene colas His⁵ en ambos extremos N y C terminales para la purificación, tal como se representa en la figura 2. La secuencia de ADN y de aminoácidos de VB4-845 se representan en las Figuras 3A-D y las SEQ ID NO:1 y 2. La porción de unión a Ep-CAM se muestra en la SEQ ID NO:3. Las secuencias de CDR se muestran en las SEQ ID NO:4-9.

45 La proteína resultante conserva la especificidad del 4D5MOCB original por la Ep-CAM. El vector de expresión para la proteína, pING3302 (se usó el plásmido pING3302 de Xoma Ireland Ltd para la construcción del vector de expresión) se transporta a, y se expresa por, la cepa huésped de *E. coli* E104. La proteína tiene una longitud de 648 aminoácidos y tiene un peso molecular predicho de 69,7 kilodaltons (kDa). En el análisis de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio), se observa la VB4-845 como una banda de proteína sencilla de aproximadamente 70 kDa. La proteína tiene un punto isoelectrónico (pI) de aproximadamente 5,9 y es hidrosoluble, formando una solución transparente. Detalles adicionales con respecto a la preparación de VB4-845 se proporcionan en el Ejemplo 9, más adelante.

55 Se ha demostrado que la VB4-845 inhibe específicamente la síntesis de proteínas y reduce la viabilidad de células de carcinoma positivas a Ep-CAM *in vitro*. Como se demuestra en el Ejemplo 5, más adelante, después de la administración sistémica a ratones, la VB4-845 inhibió el crecimiento e indujo la regresión de xenoinjertos tumorales

derivados de carcinomas de pulmón, colon o célula escamosa. La VB4-845 mostró una distribución en órganos similar al fragmento monocatenario original (scFv) y se localizó preferentemente en xenoinjertos de tumores positivos a Ep-CAM con una relación de tumor:sangre de 5,4.

5 Como se demuestra en el Ejemplo 6, un modelo peritumoral mostró la inhibición significativa de crecimiento tumoral en animales tratados con VB4-845. De hecho, en este modelo, dos ratones con volúmenes de tumor más pequeños (90 mm³) al comienzo del tratamiento mostraron una regresión completa del tumor y permanecieron sin tumores durante el experimento (véase más adelante). En todos los estudios de eficacia, los ratones toleraron los tratamientos bien, sin mortalidad relacionada con fármacos y sin observaciones clínicas significativas que sugieran toxicidad. Estos datos apoyan la administración directa de VB4-845 para la terapia dirigida de tumores sólidos.

10 El intervalo de dosis por ciclo de VB4-845 en seres humanos puede ser de 4 microgramos/kilogramo, es decir, 113 veces inferior a las dosis dadas a ratones en los estudios de eficacia, tanto en modelos intravenosos como peritumorales (véase la nota 1 al pie de la table 7). La exposición mensual en seres humanos puede administrarse como una microdosis durante un periodo de 5 días con un efecto acumulativo de 1 dosis por semana a lo largo de la totalidad de la región tumoral.

15 **Ejemplo 2. Formas de dosificación y composiciones.**

La VB4-845 se ha estudiado como un fármaco incipiente y se ha encontrado que es eficaz en la unión a líneas celulares tumorales en algunos sistemas de modelos, previniendo el crecimiento del tumor. La VB4-845 se formula a 1 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,2, y puede administrarse por vía intratumoral con una aguja de calibre 22. Se envasa en viales de vidrio de borosilicato de 1 ml, se cierra con un tapón de butilo gris y una cubierta de aluminio. Hay disponibles actualmente dos tamaños de llenado: 0,1 y 0,2 ml (0,1 mg y 0,2 mg de VB4-845, respectivamente). El fármaco se almacena a -70 °C. El producto final no se conserva y se conserva solo para un único uso.

20 El producto de muestra se etiqueta, se almacena y se distribuye según procedimientos de operación estándar escritos y aprobados. El producto puede distribuirse en condiciones heladas (por ejemplo, en hielo seco) y puede mantenerse, por ejemplo, en un sitio de estudio en un congelador controlado a -70 °C con acceso ilimitado cuya temperatura se controla regularmente. El producto puede mantenerse en estas condiciones hasta el momento de su uso.

25 **Ejemplo 3. Estabilidad de VB4-845.**

La vida en almacenamiento del producto cuando se almacena a -70 °C es al menos de seis meses. En condiciones fisiológicas (por ejemplo, incubación del producto farmacológico durante cuatro horas a 37 °C en PBS), la mayor parte de las moléculas de inmunotoxina (al menos el 91 %) están todavía eluidas como monómeros del peso molecular apropiado (aproximadamente 70 kDa). La cantidad de VB4-845 disminuye lentamente con el tiempo estando presente no menos de aproximadamente el 47 % de la proteína inicial en forma monomérica después de veinte horas a 37 °C. Resultados similares se obtuvieron después de incubación de VB4-845 marcado con ^{99m}Tc en suero humano, corroborando adicionalmente la adecuabilidad de la inmunotoxina para la aplicación *in vivo*.

30 Se han realizado estudios de estabilidad a corto plazo para evaluar la estabilidad inherente del producto de investigación en una manipulación rutinaria en el sitio clínico. Se ha evaluado la VB4-845 en su formulación estándar a temperatura ambiente y a 2-8 °C. Además, se preparó VB4-845 en tampón de inyección de solución salina tamponada con fosfato con y sin urea 800 nM y se analizó hasta seis horas a temperatura ambiente. Los estudios de estabilidad a corto plazo también evalúa el efecto de ciclos de congelación-descongelación repetidos sobre VB4-845.

35 Se encontro que la VB4-845 conservaba su actividad biológica durante el transcurso de todos los estudios de estabilidad a corto plazo. La VB4-845 puede extraerse del congelador a -70 °C el día de dosificación y dejarla descongelar a temperatura ambiente. La VB4-845 puede prepararse en un tampón de inyección en un periodo de 4 - 6 horas después de su retirada de la condición de almacenamiento a -70 °C. Una vez el producto se formula en el tampón de inyección de solución salina tamponada con fosfatos, el producto puede inyectarse al paciente dentro de un periodo de seis horas después de su preparación. Si el producto no puede usarse dentro de un periodo de tiempo adecuado, puede obtenerse un nuevo vial del inventario para dosificación.

40 La VB4-845 es estable en su envase original durante al menos 20 horas a temperatura ambiente, y si se mantuvo refrigerado (por ejemplo, a 2-8 °C), durante al menos 24 horas. Si el producto no se usa, puede volver a congelarse para un uso posterior, particularmente si el sistema de recipiente/cierre original permanece intacto.

45 Los estudios de estabilidad a corto plazo (hasta 16 h de tiempo de incubación) en fluido biológico que incluye plasma, suero y orina humanos demostraron que la VB4-845 retiene su propiedad de unión y de toxicidad celular al menos 16 horas.

55

Ejemplo 4. Farmacología *in vitro*.

Se han realizado estudios para determinar la citotoxicidad *in vitro* de VB4-845 para cultivos de células tumorales y modelos de eficacia *in vivo* en animales.

5 Para determinar la capacidad de VB4-845 para inhibir específicamente el crecimiento de células tumorales positivas a Ep-CAM, se realizaron ensayos de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-disfeniltetrazolio)⁵³. El ensayo de MTT mide la viabilidad de células controlando la reducción de la sal de tetrazolio a formazán por enzimas contenidas solo en células vivas. Se añadieron concentraciones variables de VB4-845 a cultivos celulares y se realizó un seguimiento del crecimiento celular durante 72 horas.

10 La VB4-845 es específicamente citotóxica frente a líneas celulares positivas a Ep-CAM (por ejemplo, carcinoma colorectal HT29, adenocarcinoma de mama MCF7, carcinoma de célula escamosa CAL27, carcinoma de pulmón de célula pequeña SW2) y no afecta al crecimiento de líneas celulares negativas a Ep-CAM RL (por ejemplo, linfoma de no Hodgkin) y COLO320 (carcinoma colorrectal). Se encontró que las células SW2, CAL27 y MCF7 eran igualmente sensibles al efecto citotóxico de VB4-845 y su proliferación se inhibió con una CI_{50} de solo 0,005 pM. Se encontró que las células HT29 eran las menos sensibles (CI_{50} de 0,2 pM). La exotoxina de *Pseudomonas* inhibe la síntesis de proteínas en células de mamífero mediante la ADP-ribosilación de factor de elongación 2²¹⁻²². Para demostrar que la actividad citotóxica de VB4-845 se correlaciona con su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas en líneas celulares tumorales positivas a Ep-CAM, se realizó un seguimiento de la absorción de un metabolito marcado radioactivamente, [³H]leucina, en células SW2 positivas a Ep-CAM⁵³.

20 Después del tratamiento de células SW2 con VB4-845 durante un total de treinta horas, la síntesis de proteínas se inhibió con una CI_{50} de 0,01 pM. Este efecto mostró una relación de respuesta de dosis similar a la medida previamente en el ensayo citotóxico. La síntesis de proteínas en la línea celular negativa a Ep-CAM, RL, no se vio afectada.

Ejemplo 5. Estudios *in vivo* de administración sistémica de VB4-845.

25 Los ratones que portaban xenoinjertos tumorales de SW2 (cáncer de pulmón de célula pequeña), HT29 (carcinoma colorrectal) o CAL27 (HNSCC) positivos a Ep-CAM grandes establecidos se trataron por vía intravenosa (i.v.) con VB4-845 usando 1 de 2 regímenes de dosificación diferentes: 5 µg administrados cada dos días durante 3 semanas (45 µg en total); o 10 µg administrados cada dos días durante 1 semana (30 µg en total). Los ratones que portaban xenoinjertos tumorales de COLO320 negativos a Ep-CAM se usaron como controles. Se realizó un seguimiento del tamaño del tumor durante el transcurso del estudio (33-51 días después del inicio del tratamiento)⁵³.

30 Los resultados se resumen en la Tabla 4. Los ratones toleraron los tratamientos bien, sin mortalidad relacionada con fármacos y sin observaciones clínicas significativas que sugieran toxicidad. Como se muestra en la Figura 4, la inhibición significativa de todos los tumores positivos a Ep-CAM se logró tratando ratones con cualquiera de las agendas de dosificación. El tratamiento de ratones que portan xenoinjertos de SW2 dio como resultado una reducción del volumen del tumor a un máximo del 20 % del tamaño inicial y una ligera reanudación de crecimiento a un aumento de tamaño final de 2,6 veces al final del periodo de seguimiento. Un efecto similar se logró después del tratamiento de tumores de CAL27, que se redujeron a un máximo del 60 % del volumen inicial. Cincuenta días después del comienzo del tratamiento, la mediana del volumen del tumor no excedió 1,4 veces el tamaño inicial. Dos de siete ratones tratados con la agenda de dosificación de 5 µg mostraron una regresión total del tumor y permanecieron sin tumores. Ni los tumores de CAL27 ni los de SW2 mostraron una diferencia significativa en la respuesta del tumor a las dos agendas de tratamiento.

40 Para tumores de HT29, se logró una inhibición fuerte del crecimiento (0,7 veces el volumen inicial) con la agenda de dosificación de 5 µg. Como se ha observado ya, para tumores de CAL27, 3 de 7 ratones mostraron la regresión completa de sus tumores de HT29. La eficacia de la agenda de 10 µg fue comparativamente inferior, indicando que para estos tumores es más eficaz un tratamiento a largo plazo. No se observó ningún efecto antitumoral de VB4-845 en ratones que portaban tumores de control de COLO320 negativos a Ep-CAM.

Ejemplo 6. Estudios *in vivo* de administración directa de VB4-845.

50 Se inyectaron a ratones atímicos por vía subcutánea (s.c.) en el flanco lateral 10⁷ células de carcinoma de célula escamosa de HNSCC de CAL27⁵⁴. Después de cuatro semanas, cuando los tumores se hubieron establecido, los ratones se dividieron en dos grupos aleatoriamente con un volumen promedio de tumor de 150 mm³ cada uno. Se trataron ocho ratones mediante inyección por vía peritumoral de VB4-845 con una dosis de 5 µg administrada cada dos días (lunes/miércoles/viernes) durante 3 semanas (dosis total de 45 µg). Con cada inyección los 5 µg de inmunotoxina se distribuyeron en 2 a 3 puntos de inyección. Los ratones de control (n=5) permanecieron sin tratar.

55 Como se resume en la Tabla 5, se observó una inhibición significativa del crecimiento del tumor en animales tratados (Figura 5). Dos ratones con volúmenes de tumor más pequeños (90 mm³) al comienzo del tratamiento mostraron una regresión completa del tumor y permanecieron sin tumores durante el experimento. No pudo observarse toxicidad durante y después del tratamiento con inmunotoxina.

Ejemplo 7. Biodistribución.

En general, la literatura indica que el scFv se elimina rápidamente de la circulación, y proporciona relaciones de tumor a fondo elevadas (retención específica en la masa tumoral) en puntos temporales tempranos en modelos animales²³⁻²⁵. Las $T_{1/2}$ eran, en promedio, 2-4 horas²⁶⁻²⁷, pero pueden ser más elevadas (> 8 horas) dependiendo de la construcción de la molécula²⁸ y de la vía de administración. La absorción más elevada, dependiendo de la molécula, tiende a producirse en los riñones y el hígado después de la infusión sistémica.

La biodistribución de VB4-845 se ha evaluado en ratones que portaban xenoinjertos de SW2 positivos a Ep-CAM y de COLO320 negativos a Ep-CAM en los flancos contralaterales⁵³. La dosis máxima de VB4-845 radiomarcado detectada en tumores de SW2 fue del 2,93 % de DI/g (dosis inyectada/g) después de cuatro horas, que después disminuyó gradualmente al 1,95 % de DI/g y al 1,13 % de DI/g después de 24 y 48 horas, respectivamente. Por el contrario, la VB4-845 en los tumores de control de COLO320 se localizó con una dosis máxima del 1,65 % de DI/g después de treinta minutos, que después disminuyó rápidamente al 1,06 % de DI/g después de cuatro horas y mostró solo niveles de fondo después de 48 horas.

La VB4-845 mostró una eliminación de la sangre más lenta que el scFv original. Después de 24 horas, la dosis total de VB4-845 en la sangre era del 0,42 % de DI/g, que era 1,5 veces más que el scFv original (0,28 % de DI/g). Además, la localización de la inmunotoxina en tumores de SW2 también se retrasó en comparación con el scFv original y la distribución de VB4-845 reveló una relación tumor:sangre de 5,38 después de 48 horas, que era comparable a la relación obtenida con el scFv después de 24 horas. En cada punto temporal, la VB4-845 se acumuló en tumores de SW2 positivos a Ep-CAM en comparación con tumores de control de COLO320 con una relación SW2:COLO320 que variaba entre 1,28 y 2,95. Esto indica que la VB4-845 se retuvo en tumores positivos a Ep-CAM mediante interacciones anticuerpo-antígeno específicas y absorción celular. La acumulación marginal en tumores de control de COLO320 puede deberse al aumento en la permeabilidad vascular encontrada a menudo en tumores. El análisis en tejidos normales en estos animales reveló que la VB4-845 también se localizaba en los riñones, el bazo, el hígado y a una menor medida en los huesos.

Las observaciones realizadas durante la conducción de la farmacocinética y modelos de eficacia en ratones indican que el producto fue bien tolerado sin ningún signo clínico indicativo de toxicidad. Todos los animales estuvieron vivos a lo largo del transcurso de los estudios y no hubo mortalidad relacionada con fármacos.

Ejemplo 8. Estudios de toxicidad (Ejemplo comparativo).

Se realizó un estudio no GLP para acceder a la toxicidad potencial de dosis escalonadas de VB4-845 en los 3 tejidos, hígado, bazo y huesos, que se observó para tener el nivel de localización más elevado de VB4-845 radiomarcada durante el estudio de farmacocinética.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

La VB4-845 se administró a ratones C57BL/6 inmunocompetentes que eran más sensibles a daños en el hígado mediados por ETA de tipo silvestre que los ratones atómicos usados en los modelos de eficacia previos. La VB4-845 se administró a los ratones i.v. a o bien 5 µg (250 µg/kg) o bien 10 µg (500 µg/kg) cada dos días durante tres dosis, o 20 µg (1000 µg/kg) cada dos días durante dos dosis. Veinticuatro horas después de la última dosis, la actividad de transaminasa en plasma se determinó y se comparó con ratones tratados con PBS (es decir, 0 µg de VB4-845/kg). No se observó una elevación de los niveles de ALT/AST en el plasma de ratones 24 horas después de completar los regímenes de dosificación de 5 µg y 10 µg (Figura 6). Solo se observó una actividad de transaminasas elevada después de la administración de la dosis de 20 µg. En el punto temporal de 24 horas después de la dosis, los animales se sacrificaron y se tiñeron especímenes de tejidos del hígado y del bazo por medio de hematoxilina/eosina y se analizaron con el microscopio óptico.

En consecuencia con la actividad de transaminasa observada, solo unos pocos sitios con hepatocitos necróticos se encontraron después del tratamiento con el régimen de dosificación de inmunotoxina de 20 µg (1000 µg/kg), exposición total de 40 µg (2000 µg/kg) (Figura 7). No se observaron signos de cambios histopatológicos o mielosupresión en ninguna dosis en el bazo y componentes celulares de muestras de sangre completa.

Una dosis inicial baja de VB4-845 en seres humanos pueden ser 20 µg (0,29 µg/kg para un adulto de 70 kg) administrados diariamente mediante administración de microdosis a diferentes secciones del tumor cada día durante cinco días, con una exposición acumulativa de ciclo único de 100 µg/tumor (1,43 µg/kg para un adulto de 70 kg). Una dosis superior puede ser 280 µg (4,0 µg/kg para un adulto de 70 kg) administrados del mismo modo para una exposición acumulativa de ciclo único de 1400 µg/tumor (20 µg/kg para un adulto de 70 kg). En una base de peso corporal, la dosis inicial es aproximadamente 1585 veces inferior a la dosis más elevada que es 113 veces inferior a la exposición mensual mediante administración intravenosa usada en los estudios en ratones descritos anteriormente (Tabla 7). En base a este margen de seguridad, dicho intervalo de dosificación se considera seguro con respecto a las dosis usadas de un modo repetido en ratones que dieron como resultado ninguna observación clínica indicativa de toxicidad y la dosis inicial es 1056 inferior a la exposición mensual a VB4-845 que no mostró ninguna elevación en los niveles de transaminasas o cambios histopatológicos en ratones.

Para la purificación, el aglomerado obtenido a partir de un cultivo de un litro se volvió a suspender en 25 ml de tampón de lisis, que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, MgSO₄ 2 mM y estaba suplementado con un cóctel de EDTA-inhibidor de proteasa libre (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y DNase I. La suspensión bacteriana se lisó con dos ciclos en una prensa French Pressure Cell (SLS Instruments, Urbana, IL), se centrifugó a 48.000 g en un rotor SS-34 durante 30 min a 4 °C y subsiguientemente se esterilizó mediante un filtro (0,22 mm). La inmunotoxina presente en el sobrenadante retirado se purificó mediante cromatografía usando un sistema BIOCAD (Perceptive, BioSystems) con una columna de Ni²⁺-iminodiacético (IDA) y una columna de intercambio aniónico HQ/M acoplada en línea tal como se describe por Pluckthun y col.⁶⁴ Antes de cargar el lisado, la columna de Ni²⁺-IDA se equilibró con Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM. Después de la carga, la columna se lavó tres veces con diferentes soluciones salinas, todas tamponadas con Tris 20 mM (pH 7,5), en el orden de NaCl 300 mM, 510 mM y 90 mM. Subsiguientemente, la columna se lavó con Tris 20 mM (pH 7,5), imidazol 10 mM, NaCl 90 mM, antes de eluir la inmunotoxina unida con la misma solución que contenía imidazol 200 mM (pH 7,5).

El eluato se cargó directamente en la columna de intercambio aniónico HQ/M y la inmunotoxina se eluyó con un gradiente de sal de NaCl 90-1000 mM, tamponado con Tris 20 mM (pH 7,5). Las fracciones que contenían 4D5MOCB-ETA se recogieron y se concentraron usando un filtro de corte de 10 kDa mediante centrifugación a 2000 g y 4 °C (unión de proteína baja Ultrafree-MC, Millipore). La calidad de VB4-845 (4D5MOCB-ETA) purificada se analizó mediante un SDS al 10 %-gel de poli(acrilamida) e inmunotransferencia Western usando un anticuerpo antitetrahistidina conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (QIAGEN, Hilden, Alemania) diluido 1:5000 según las recomendaciones del fabricante.

Filtración en gel analítica y determinación de la estabilidad térmica. Se diluyeron diez microgramos de VB4-845 (4D5MOCB-ETA) purificada en 50 ml de PBS, pH 7,4, que contenía el 0,005 % de Tween-20 y subsiguientemente se incubaron a 37 °C. Las muestras se analizaron en diferentes puntos temporales (después de 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 10 h y 20 h) mediante filtración en gel usando el sistema Smart (Pharmacia, Uppsala) con una columna Superose-12 PC3.2/30. La columna se calibró en el mismo tampón con tres patrones proteicos: alcohol dehidrogenasa (Mr 150.000), albúmina de suero bovino (Mr 66.000) y anhidrasa carbónica (Mr 29.000). La misma disposición analítica se usó para evaluar la estabilidad térmica de la inmunotoxina marcada con ^{99m}Tc después de una incubación de 20 h a 37 °C en suero humano. La cantidad de monómeros de inmunotoxina se determinó mediante recuento por centello de las fracciones eluidas.

Radiomarcado y determinación de la afinidad de unión a antígeno. La VB4-845 (4D5MOCB-ETA) se marcó radioactivamente mediante coordinación específica del sitio estable de trihidrato de ^{99m}Tc-tricarbonilo a las colas de hexahistidina presentes en la secuencia de proteínas.⁶⁵ Esta reacción espontánea se indujo mezclando 30 ml de solución de inmunotoxina (1 mg/ml) con un tercio del volumen de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) 1 M, pH 6,8, y un tercio del volumen del compuesto de ^{99m}Tc-tricarbonilo sintetizado recientemente. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y la reacción se detuvo desalando a través de una columna Biospin-6 (BioRad, Hercules, CA) equilibrada con PBS que contenía el 0,005 % de Tween-20, según las recomendaciones del fabricante. El porcentaje de inmunotoxina inmunorreactiva se evaluó tal como se describe por Lindmo y col.⁶⁶ La afinidad de unión de la inmunotoxina marcada con ^{99m}Tc se determinó en células SW2 en un radioinmunoensayo (RIA), esencialmente tal como se ha descrito para el scFv 4D5MOCB.

Ejemplo 10. Proceso de fabricación de VB4-845.

Fermentación de VB4-845 de E. coli. La producción de VB4-845 se llevó a cabo en matraces de 2 litros con agitación usando un agitador incubador rotatorio en un laboratorio de investigación. El agitador rotatorio se encuentra dentro de un espacio de control ambiental en el que la temperatura puede regularse en un margen de un grado Celsius. La inoculación de medio de sembrado, medio de producción y todas las manipulaciones asepticas tienen lugar en una cabina de seguridad biológica de tipo II/B con filtración de HEPA y clasificación de aire de 100. La separación de células, la concentración y la diafiltración tienen lugar en un laboratorio de investigación.

La VB4-845 se produce a partir de VB4-845 de un banco celular primario (MCB, *Master Cell Bank*) de células huésped E104 de E. coli de (Se usó el plásmido pING3302 de Xoma Ireland Ltd para la construcción del vector de expresión). La escala inicial de (fermentación) propagación celular para la producción de VB4-845 de grado clínico ha sido al nivel de 26 x matraces de 2 l con agitación con un volumen de trabajo de 1 l por matraz, volumen total de 26 l. El MCB de E. coli con VB4-845 se cultiva en un medio de nitrógeno complejo que contiene glicerina como fuente de carbono principal para el crecimiento celular. El procedimiento de fermentación se describe más adelante.

Preparación del inóculo. Durante un proceso de un matraz con agitación de 26 l, se prepara un cultivo de 500 ml de MCB de E. coli con VB4-845 como preinóculo. Para cada cultivo, se extrae un vial de MCB del tanque de almacenamiento a -18 °C y se deja descongelar a temperatura ambiente. El vial se limpia externamente con etanol al 70 % y se deja secar al aire en una cabina de seguridad biológica. Se añade la suspensión celular de MCB (1,5 ml) a un matraz Erlenmeyer de 2 l que contiene 500 ml de medio de sembrado estéril (medio 2YT modificado y 25 mg/l de tetraciclina). El matraz se transfiere a un equipo agitador rotatorio a 200 rpm y se cultiva a 25 ± 1 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 3,0 ± 0,2 o superior (10,5 ± 1 h, fase semi-log de crecimiento). El inóculo se usa después como cultivo de siembra para inocular los 26 matraces con agitación de producción.

Fermentación en 26 x matraces con agitación de 2 l. La fermentación se lleva a cabo en matraces de 2 l sin deflectores que contiene cada uno 1 l de medio de producción. Un proceso de producción típico para VB4-845 de grado clínico ha sido 26 x matraces de 2 l que contenían 1 l de medio de producción (Terrific Broth, TB, modificado) por matraz. El medio de fermentación se siembra con el 1 % de inóculos a partir del cultivo anterior y se incuba en un agitador (200 rpm) a 25 ± 1 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 1,2 (aproximadamente 6-7 horas) en el último matraz con agitación inoculado. Un intervalo de DO600 típico en inducción es 1,2-1,5. La expresión de VB4-845 se induce mediante la adición del 0,1 % de L-arabinosa. Las células se recogen aproximadamente 6 horas después de la inducción.

Separación de células. Al cosechar, todos los matraces con agitación se retiran de la cabina con agitación para la inoculación, retirando primero el primer matraz inoculado. El contenido del primer matraz con agitación se añade al segundo matraz con agitación bajo una cubierta biológica. Todos los matraces con agitación se retiran igualmente. Los matraces con agitación reunidos se disponen en refrigeración a 2-8 °C. Las células de E. coli E104 con VB4-845 se retiran en grupos de 6 a partir de los cultivos de fermentación anteriores mediante centrifugación a 6.800 g de fuerza durante 15 minutos a 2-8°C en una centrifugadora de Sorvall and Beckman. Las células se descartan mientras que el caldo exento de células se mantiene para un procesamiento posterior. La suspensión de células concentrada se recoge, se inactiva y se elimina mediante procedimientos establecidos. El sobrenadante resultante se reúne y se reserva una muestra de 5 ml para la cuantificación del producto. Las centrifugadoras, rotores y frascos de centrifugadora se limpian a conciencia antes de procesar el caldo de fermentación.

Concentración/diafiltración. La concentración y la diafiltración del sobrenadante de cultivo recogido se realizan usando un sistema Pellicon de flujo tangencial con una membrana Sartorius (Hydrosart) con un corte molecular de 10 kD de NMW (peso molecular nominal) y que tiene un área superficial de 3 pies cuadrados (0,278 metros cuadrados). El sistema de filtración de Pellicon se lava a conciencia antes de su uso. La concentración se realiza con una velocidad de alimentación de 4 l/min y una velocidad de permeado de 500 ml/min. Se toma una muestra de 5 ml en la etapa de concentración final. La diafiltración se realiza frente a fosfato de sodio 0,02 M, pH $7,2 \pm 0,2$. Se requieren cinco cambios de volumen para lograr la conductividad deseada de < 10 mS. El producto concentrado diafiltrado se aclara en una centrifugadora Sorvall a 6.800 g de fuerza durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura establecida de 2-8 °C. La solución transparente que contiene el producto de interés se filtra antes de la purificación usando un filtro de punto muerto de 0,22 μ m. La etapa de clarificación comprende, después de la diafiltración, centrifugación, paso a través del filtro de 0,2 μ m, adición de Triton X-100, ajuste de conductividad, ajuste del pH y después sigue la purificación.

Procedimientos de purificación de VB4-845. La purificación de VB4-845 se realiza en una planta piloto de Viventia Biotech, un área controlada con GMPc con filtración de HEPA y controlada ambientalmente con una clasificación de aire de 10.000. La proteína VB4-845 se aísla mediante cromatografía quelante de afinidad con metal y se purifica adicionalmente mediante una elusión de cromatografía de intercambio aniónico. El procedimiento de purificación se resume en el diagrama de flujo de la Figura 9 y se describe más adelante

Cromatografía de interacción de sefarosa-metal quelante. La columna de afinidad a metal se prepara empaquetando resina de sefarosa HP quelante en una columna de vidrio XK26/20, con un volumen de columna de aproximadamente 17 ± 1 ml. El empaquetamiento se realiza a una presión posterior de 300 kPa. La relación de flujo lineal (LFR) de trabajo es 90 cm/h. Se hicieron pasar cinco volúmenes de columna (CV) de agua para inyección (WFI) a través de la columna de sefarosa quelante. Para cargar la columna de sefarosa quelante con iones metálicos, se hicieron pasar 5 CV de solución de cloruro de níquel 0,1 M a través de la columna. El remanente del cloruro de níquel no enlazado se retiró mediante lavado con 5 CV de WFI. La columna se equilibra después con 10 CV de fosfato de sodio 20 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM y el 0,1 % de Triton X-100, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$ (tampón de equilibrado de sefarosa quelante).

La conductividad de la solución concentrada/diafiltrada que contiene VB4-845 se había ajustado a 15 ± 1 mS con cloruro de sodio y el pH se ajusta a $7,2 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. La solución que contiene VB4-845 se aplica a la columna HP de sefarosa quelante a una LFR de 90 cm/h u 8 ml/min. La columna se lava después con 20 CV de tampón de lavado, fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$ que contiene imidazol 20 mM y el 0,1% de Triton X-100 (tampón de lavado). La VB4-845 se eluye a partir de la columna con seis CV de fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$, que contiene imidazol 500 mM (tampón de elución de sefarosa quelante). El producto se recoge en una fracción de 3 CV partiendo del comienzo del máximo de elución.

Cromatografía de intercambio aniónico de Q-sefarosa. La resina HP de Q-sefarosa se empaqueta en una columna de vidrio XK16/20 con un volumen de columna final de $5,0 \pm 0,5$ ml. La velocidad de flujo lineal de trabajo es 156 cm/h. La columna se lava con 10 CV de WFI, después se lava con 5 CV de cloruro de sodio 1 M en fosfato de sodio 20 mM, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$ y se equilibra con 10 CV de fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 90 mM, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$ (tampón de equilibrado de 2-sefarosa). La elución de la columna de sefarosa quelante se diluye con fosfato de sodio 20 mM, tampón de pH $7,2 \pm 0,1$ hasta alcanzar una conductividad de 10 ± 1 mS. La VB4-845 parcialmente purificada se carga en una columna de Q-sefarosa a un caudal de 5,2 ml/min para reducir adicionalmente niveles de endotoxina y ADN. Una vez el producto se ha enlazado, la columna de intercambio iónico se lava con 15 CV de tampón de equilibrado de Q-sefarosa. Los contaminantes se encuentran en el flujo a través y

las etapas de lavado. El producto se eluye con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, tampón de pH 7,2 ± 0,1 como una fracción de 3 ml.

Ejemplo 11. Ensayo de competencia de VB4-845.

La línea celular positiva a Ep-Cam CAL-27 ($0,9 \times 10^6$) se preincuba con una cantidad no saturante de scFv VB4-845 biotinilado (0,5-1,0 µg) durante 10 min a 4 °C PBS-5 % de FCS enfriado con hielo. Después de ello, el anticuerpo de ensayo (competidor) se diluye en PBS-5 % de FCS enfriado con hielo y se añade a la mezcla a una cantidad equimolar a la cantidad de scFv VB4-845 no biotinilado capaz de inhibir completamente la unión del scFv VB4-845 biotinilado. Después de la incubación durante 1h a 4 °C, las células se lavan con PBS-5 % de FCS enfriado con hielo y se incuban durante 30 min adicionales a 4 °C en presencia de Cy estreptavidina conjugada con cromo (Pharmingen, 1:120) diluida en tampón de lavado. Las células se lavan al final del periodo de incubación y se analizan mediante citometría de flujo. Como control negativo, se incubaron células tumorales CAL-27 con scFv 4B5, un scFv específico anti-idiotipo que reacciona con anticuerpo específico de GD2 14G2a pero no con CAL-27, en lugar de scFv VB4-845. Alternativamente, se añade un no competidor (anti-HER-2/neu) que se une a CAL-27 en lugar de scFv de 4B5. En cada caso, se detecta de ningún cambio a un cambio mínimo en la mediana de la fluorescencia a partir de esa medición para el scFv VB4-845 biotinilado solo. Para cada anticuerpo, el porcentaje de inhibición se calcula según la siguiente ecuación:

$$PI = [(F_{M\acute{a}x} - F_{Bgd}) - (F_T - F_{Bgd}) / (F_{M\acute{a}x} - F_{Bgd})] \times 100$$

en la que:

PI = porcentaje de inhibición; $F_{M\acute{a}x}$ = mediana máxima de fluorescencia con scFv VB4-845 biotinilado; F_T = mediana de fluorescencia de scFv VB4-845 biotinilado en presencia del anticuerpo de ensayo; F_{Bgd} = mediana de fluorescencia de fondo, la diferencia en la mediana de fluorescencia entre scFv VB4-845 biotinilado solo y scFv VB4-845 biotinilado en presencia de cualquiera de los anticuerpos de control negativos. Véase también Willuda y col., 1998, "High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment," Cancer Res. 59:5758-5767.

Ejemplo 12. Ensayos clínicos de HNSCC

En dos ensayos clínicos en HNSCC dirigidos principalmente a determinar la dosis tolerada máxima y a evaluar diferentes protocolos de dosificación, los sujetos con HNSCC avanzado recibirán inyección por vía intratumoral de VB4-845 según diferentes protocolos de dosificación. La dosis inicial (20 microgramos/tumor/día durante 5 días) representa menos de un ciento veinteavo de la exposición intravenosa a dosis única más elevada observada en estudios en ratones de 3 semanas (en base al área superficial corporal) y menos de un setentavo de la exposición intravenosa del día 5 más elevada en estudios en ratones de 3 semanas (sobre una base de área superficial corporal).

El primer ensayo (un estudio de seguridad y tolerabilidad, de un solo brazo, abierto) es continuo y se ha completado o iniciado el tratamiento de al menos 13 sujetos. Se han completado dos ciclos de hasta 130 microgramos/tumor/día durante 5 días (nivel de dosis 4; 650 microgramos por tumor por ciclo, exposición total de 1300 microgramos por tumor) en la mayor parte de estos sujetos. En este ensayo, el fármaco se inyecta directamente en el sitio del tumor o en uno de los crecimientos secundarios (metástasis) en la región de la cabeza y el cuello. La lesión accesible más grande o mejor se selecciona para la inyección (lesión indicadora o diana). El ensayo comprende un esquema de escala de dosis de 2 ciclos. Cada ciclo tiene 4 semanas o 28 días de duración. En los primeros 5 días consecutivos del ciclo los sujetos reciben diariamente inyecciones por vía intratumoral del fármaco con una dosis inicial de 20 microgramos/tumor/día durante 5 días consecutivos, proporcionando así 100 microgramos por tumor por ciclo (nivel de dosis 1). El periodo de 5 días viene seguido por un periodo de descanso de 23 días durante el que no se administrará fármaco. El sujeto se someterá semanalmente a seguimientos que incluyen exámenes clínicos y análisis de muestras de sangre y de orina. Después se repite un segundo ciclo de 28 días antes de la evaluación final. Se dosifican en cada nivel de dosis un mínimo de 1 y hasta 3 sujetos. Los 6 niveles de dosis son 100, 200, 400, 650, 1000 y 1400 microgramo/tumor/ciclo (o 20, 40, 80, 130, 200 y 280 microgramos/tumor/día durante 5 días consecutivos). La mañana de la dosificación, cada vial se diluyó con hasta 900 µl de solución salina tamponada con fosfatos (PBS), y la cantidad requerida de VB4-845 se introdujo en la jeringa. La tasa de dilución se ajusta para lograr que el volumen que se va a inyectar no exceda aproximadamente el 30 % del volumen estimado de la masa tumoral que se va a inyectar. En el periodo de 5 días y las 24 horas siguientes a su última dosis, los sujetos se tratan en una unidad de cuidados intensivos. Se toman muestras de orina y de sangre diariamente para realizar un seguimiento de las funciones del hígado y los riñones y determinar la concentración de fármaco en sangre. En cada evento de dosificación, se realiza una punción de la piel o la mucosa bucal en un sitio a aproximadamente el 80 % de distancia del centro del tumor fuera de la periferia del tumor, asegurando que la punción se realiza en un sitio diferente a las punciones previas. Se realizan de seis (6) a ocho recorridos de aguja que surgen radialmente desde el sitio de punción y se inyectan volúmenes iguales de solución en cada área. Se administrarán analgésicos durante el tratamiento. El uso tóxico o sistémico de corticosteroides se restringirá a toxicidad sintomática de piel o mucosa

de grado 3 o 4.

En un segundo ensayo, el fármaco se inyecta también directamente en el sitio del tumor o en uno de los crecimientos secundarios (metástasis) en la región de la cabeza y el cuello. Si el sujeto tiene más de una lesión, se inyectará la lesión más accesible dentro de una distancia de 5 cm en cualquier dimensión más grande. Si solo hay disponibles lesiones pequeñas, pueden tratarse lesiones múltiples en una dimensión más grande combinada de 5 cm. Los sujetos reciben dosificación una vez a la semana, durante cuatro semanas consecutivas. Este periodo de 4 semanas vendrá seguido por un periodo de descanso de 4 semanas, durante el que se realizará un seguimiento del estado del sujeto. El nivel de dosis inicial de VB4-845 es 100 µg/tumor/semana y los otros niveles de dosis son 200, 330, 500, 700, 930 y 1240 microgramos/tumor/semana. La mañana de la dosificación, el vial o los viales se diluyen con hasta 800 µl de PBS, y después la cantidad requerida de VB4-845 se introduce en la jeringa. El volumen final que se va a inyectar se ajusta usando un volumen de suspensión de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) de modo que no exceda el 30 % del volumen estimado de la masa tumoral que se va a inyectar. El fármaco se debe administrar de modo que se intente incluir la totalidad del volumen del tumor en cada día de dosificación. Para la administración, se insertan agujas pequeñas (25 a 27 de calibre) unidas a jeringas Luer-lock de 1 cc en la base del tumor con un ángulo de aproximadamente 45 grados. Dependiendo del tamaño y de la ubicación del tumor, la inyección puede realizarse adecuando la dirección del producto a través del tumor desde un único sitio de punción o inyectando el tumor desde múltiples sitios, con aumentos de 1 cm, en filas paralelas de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm de distancia y desembolsando a lo largo de todo el tumor. Las respuestas del tumor se evaluarán antes del tratamiento en la visita de línea base y la dosis previa en cada dosis subsiguiente, la semana 4 y al final del estudio. Cuando sea posible, se realiza una tomografía computerizada (CT) en el cribado, semana 4 y semana 8 (o visita final). En el caso de que se observe una respuesta completa o parcial, se realizará una CT 4 semanas después de confirmar el resultado. Otras evaluaciones se realizarán mediante medición directa del tumor mediante observación clínica y manipulación. Una respuesta completa (CR) indicaría la desaparición total del tumor inyectado (confirmada a las 4 semanas); una respuesta parcial (PR) una reducción en al menos el 30 % del diámetro más largo del tumor tratado (confirmada a las 4 semanas); enfermedad estable mediante una regresión del tumor inferior al 30 % o progresión inferior al 20 % y progresión del tumor (TP) un aumento del 20 % en el diámetro más largo del tumor tratado, no habiéndose documentado previamente CR, PR o SD. El dolor puede evaluarse usando una escala de dolor análoga antes del tratamiento y antes de cada dosis y en la semana 4 y en la semana 8 (o visita final). Se tomaron biopsias aspiradas con aguja fina aleatorias del tumor diana para explorar los efectos de VB4-845 a un nivel celular. La toxicidad sistémica y local puede evaluarse usando procedimientos estándar y tendrán lugar evaluaciones en continuo para determinar eventos adversos, toxicidades de laboratorio y el estado de dolor del sujeto a lo largo del tratamiento.

Ejemplo 13. Actividad biológica de VB4-845 contra líneas de células tumorales de vejiga Sumario

La VB4-845 [proteína de fusión de scFv anti-Ep-CAM y exotoxina A de Pseudomonas que carece del dominio de unión a células (ETA252-608)] se evaluó mediante citometría de flujo para determinar la reactividad de superficie celular frente a una panel de líneas celulares de tumor humanas que incluyen 14 líneas celulares de cáncer de vejiga para determinar el grado y la amplitud de la expresión de Ep-CAM en estas indicaciones clínicas potenciales. La VB4-845 muestra una reactividad fuerte frente a 10 de 14 líneas celulares cancerosas de vejiga y una reactividad débil frente a otras. La VB4-845 muestra una citotoxicidad fuerte en once líneas celulares de cáncer de vejiga positivas a VB4-845; los valores de CI_{50} variaron de 0,001 a 320 pM para una exposición de 72 horas. Por el contrario, no se detectó citotoxicidad frente a las tres líneas celulares negativas a VB4-845. Se determinó que cuatro líneas celulares de cáncer de vejiga (T-24, SW-870 UM-UC-10 y 1A6) eran las más sensibles al tratamiento con VB4-845. En otro experimento sobre un subconjunto de líneas celulares en el que el tiempo de exposición se limitó a 2 horas, la VB4-845 ejerció una citotoxicidad eficaz (> 93 %) contra la línea de células de cáncer de vejiga escamosas, SCaBER y la línea celular de carcinoma de vejiga transicional, 5637. Por el contrario, para una exposición de 2 horas de 5637 a la inmunotoxina de control, 4B5-PE, se mostró que la citotoxicidad no específica era mínima (< 10 %) a 500 pM y permanecía en el mismo nivel incluso después de aumentar la dosis 100 veces (50.000 pM). En resumen, la actividad antitumoral in vitro potente de VB4-845 sobre líneas celulares de cáncer de vejiga sugiere que la VB4-845 tiene utilidad para el desarrollo preclínico y clínico de terapia anticancerosa contra cánceres de vejiga.

50 Diseño experimental

El diseño experimental para analizar la reactividad de VB4-845 con líneas celulares tumorales mediante citometría de flujo se ha descrito 3.4. Las proteínas de fusión scFv-ETA, VB4-845 (Nº de lote 02203, 1 mg/ml) y el control negativo 4B5scFv-ETA (Nº de lote 032403, 1,5 mg/ml) se generaron tal como se ha descrito y se almacenaron a -80 °C. El panel de líneas celulares tumorales usadas en el estudio y sus características están en la Tabla 9. Todas las células tumorales se propagaron en medio de cultivo que contenía el 10-20 % de FCS y suplementos apropiados, siguiendo protocolos de ATCC o de ECACC. Las células tumorales se recogieron cuando los cultivos eran el 50-70 % confluentes con viabilidad superior al 90 %. La línea celular CAL-27 expresa un nivel elevado de antígeno Ep-CAM y se usó como control positivo, mientras que la línea celular que expresa Ep-CAM a un nivel bajo COLO 320 se usó como control negativo.

60

Ensayo de reactividad de VB4-845 frente a líneas celulares tumorales mediante citometría de flujo

La VB4-845 purificada se analizó frente al panel de líneas celulares tumorales para determinar la reactividad de superficie celular mediante citometría de flujo. Brevemente, se incubaron células tumorales ($0,9 \times 10^6/300 \mu\text{l}$) con VB4-845 purificada o scFv 4B5 como control negativo, a $10 \mu\text{g/ml}$ durante 2 horas en hielo. Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-EGFR (Oncogene Research, N° de cat. OP15, a $1 \mu\text{g/ml}$) como control positivo. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS-5 % de FBS y se incubaron o bien con anticuerpo anti-HIS-Tag (Amersham Pharmacia N° de cat. 27-4710-01, diluido 1:800) para VB4-845 o bien IgG antirratón conjugada con biotina para anti-EGFR (Pierce NH° de cat. 31174, diluido 1:200) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-5 % de FBS, proceso seguido por la incubación con o bien IgG antirratón de cabra conjugada con FITC (The binding Site N° de cat. AF271, diluido 1:100, para células tratadas anti-HIS), o bien estreptavidina-Cy-cromo (Pharmingen N° de cat. 13038A, diluido 1:120) durante 30 minutos en hielo. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en $0,5 \text{ ml}$ de tampón que contenía yoduro de propidio (Molecular Probes N° de cat. P-1304) a $0,6 \mu\text{g/ml}$. La unión a la célula tumoral se determinó usando un FACSCalibur. Los anticuerpos se consideraron positivos si las células tumorales tratadas con anticuerpo mostraban un desplazamiento positivo en fluorescencia que da como resultado $> 30 \%$ de células positivas (1,3 veces el control) sobre el control negativo.

Evaluación de citotoxicidad mediada por VB4-845 mediante el ensayo de proliferación celular

La toxicidad de VB4-845 se midió mediante determinación de la inhibición de la proliferación celular mediante el ensayo MTS. Brevemente, se prepararon placas de microvaloración de 96 pocillos sembrando células tumorales a $5000 \text{ células}/50 \mu\text{l}$ /pocillo en medio de cultivo que contenía el 10% de FCS. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37 °C en presencia del 5% de CO_2 . Se realizaron diluciones seriadas diez veces de VB4-845 en este momento y se añadieron cantidades variables de VB4-845 ($0,00005$ a 500 pM) a cada pocillo en un volumen de $50 \mu\text{l}$, para llevarlo a un volumen final de $100 \mu\text{L}$. Como control negativo se usó 4B5 scFv-ETA en las mismas concentraciones. Las células de control y los pocillos de control (vacíos) se incubaron con $100 \mu\text{l}$ de medio solo, en grupos de cuatro. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C en presencia del 5% de CO_2 . Cada ensayo se repitió dos veces para demostrar la reproducibilidad y la consistencia de los resultados. Después de la incubación, se realizó un ensayo MTS para medir la viabilidad celular. Brevemente, se añadieron $75 \mu\text{l}$ de metosulfato de fenazina, PMS ($0,92 \text{ mg/ml}$ en PBS) a $1,5 \text{ ml}$ de un compuesto de tetrazolio, MTS (Promega, N° de cat. G111A y G109C, 2 mg/ml en PBS) y se añadieron $20 \mu\text{L}$ de la mezcla PMS/MTS a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C en presencia del 5% de CO_2 . Subsiguientemente, las placas se leyeron a 490 nm usando un lector de placas de ELISA.

Determinación del tiempo de exposición mínimo a la inmunotoxina requerido para la citotoxicidad mediada por VB4-845

La CI_{50} (la concentración de VB4-845 que destruye el cincuenta por ciento de células en comparación con las células tratadas con medio solo) se determinó exponiendo la VB4-845 a cada línea celular de cáncer de vejiga durante 72 horas. Se seleccionaron cinco líneas celulares sensibles de sensibilidad variable en la destrucción (SW-780, UC-MC-10, 1A6, UC-MC-14 y 5637) para establecer el tiempo de exposición mínimo requerido para destruir el 50% de células tumorales usando una concentración fijada que se aproximaba a la CI_{50} . Las células tumorales se expusieron a VB4-845 a una concentración fijada ($0,01$, $0,6$ o 6 pM) durante 2, 4, 24, 48 y 72 horas. Excepto para 72 horas, en cada punto temporal, el medio que contenía VB4-845 se reemplazó por un medio de cultivo nuevo para minimizar el tiempo de exposición a la inmunotoxina (VB4-845). En ensayo MTS se realizó después de 72 horas de incubación para determinar la citotoxicidad (50% de destrucción de células tumorales) en comparación con el control (células con medio solo). Para evaluar adicionalmente el efecto de VB4-845 sobre una línea celular de carcinoma de célula escamosa menos sensible (SCaBER) y una línea celular de carcinoma transicional de vejiga sensible (5637) y otras dos líneas celulares de cáncer de vejiga (UM-UC-10 y UM-UC-14), las células se expusieron durante 2 horas a una concentración fijada o a dosis variables de VB4-845. Después de 2 horas de incubación, las células se lavaron para eliminar la VB4-845, se incubaron con medio nuevo y se realizó el ensayo de MTS después de 72 horas. Además, para establecer el efecto citotóxico específico de VB4-845, se expusieron células 5637 a dosis variables (500 , 5000 , 50000 pM) de VB4-845 y la inmunotoxina de control negativa, 4B5-PE para determinar el efecto de destrucción a concentraciones más elevadas. Después de la incubación en cada punto temporal, 2, 6, 12, 24 y 48 horas, las células se lavaron con medio para eliminar VB4-845, se incubaron con medio nuevo y se realizó el ensayo de MTS después de 72 horas para determinar la citotoxicidad. El intervalo de dosificación se seleccionó en base a los resultados iniciales de CI_{50} con la esperanza de que la dosis mínima de VB4-845 que se está usando proporcionara la máxima destrucción de esta línea celular.

Resultados

Reactividad de células tumorales a VB4-845

La reactividad de superficie celular de VB4-845 se evaluó frente a un panel de líneas celulares tumorales de vejiga. La VB4-845 mostró una reactividad positiva frente a 11 de las 14 líneas celulares de cáncer de vejiga. Los datos se resumen en la tabla 10.

Efecto citotóxico de VB4-845 frente a líneas celulares de cáncer de vejiga in vitro

Las células tumorales se incubaron con VB4-845 durante 72 horas a concentraciones que variaban de 0,00005 a 500 pM y se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante ensayo de MTS. Los resultados se resumen en la Tabla 10. La VB4-845 no inhibió la proliferación celular en las tres líneas celulares negativas a EGP-2 (J-82, UM-UC-3 and UM-UC-13) pero mostró una inhibición fuerte (CI_{50} de 0,001-0,033 pM) en la cuarta línea celular con una expresión muy elevada de antígeno de Ep-CAM (T-24, SW-780, UM-UC-10 y 1A6) y la inhibición intermedia de otras líneas celulares.

Tiempo de exposición mínimo requerido para lograr una citotoxicidad mediada por VB4-845 frente a líneas celulares de cáncer de vejiga in vitro

En el ensayo de proliferación celular estándar, se expusieron células de carcinoma de vejiga a VB4-845 durante 72 horas, después de lo cual se evaluó la inhibición de la proliferación celular. Para cáncer de vejiga, los tiempos de permanencia de la terapia intravesicular son raramente superiores a dos horas. Por lo tanto, se realizó un ensayo de proliferación celular para determinar el tiempo de exposición mínimo requerido para destruir el 50 % de células tumorales después de la exposición a VB4-845 a una concentración fijada a, o cercana a, la CI_{50} (0,01 o 0,6 pM). En el primer experimento, se expusieron dos líneas celulares de cáncer de vejiga sensibles a VB4-845 (SW-780 y 1A6) a VB4-845 a una concentración 0,01 pM durante 2, 4, 6, 24, 48 o 72 horas. La VB4-845 mostró una citotoxicidad fuerte en las líneas celulares de cáncer de vejiga SW-780 y 1A6 incluso después de un tiempo de exposición corto. Para la línea celular de cáncer de vejiga muy sensible SW-780, (con una CI_{50} 0,002 pM), se destruyeron el 50 % de las células tumorales después de 3 horas de exposición, mientras que para una línea celular menos sensible, 1A6, (CI_{50} 0,033 pM), se logró el mismo resultado después de 37 horas de exposición. Una serie de datos similares se obtiene en el segundo experimento, después de una exposición de tres líneas celulares de cáncer de vejiga a VB4-845 a una concentración 0,6 pM. Los resultados indicaron que el 50 % de células UM-UC-10, 5637 o UM-UC-14 se destruyeron después de 4, 16 y 20 horas de exposición, respectivamente. El orden de rango de sensibilidad de estas tres líneas fue el mismo que para sus CI_{50} .

En un experimento aparte, después de la exposición a VB4-845 a una concentración más elevada (6,0 pM) durante 2 horas, el 96, el 89 y el 93 % de células UM-UC-10, 5637 y UM-UC-14 se destruyeron, respectivamente. En una evaluación posterior, después de la exposición a una línea celular menos sensible (SCaBER) y a una línea celular sensible (5637) durante 2 horas con una dosis variable de VB4-845, se logró un efecto citotóxico fuerte con > 93 % de destrucción de células SCaBER con una dosis de 3900 pM, cuando se había logrado el mismo grado de toxicidad con una dosis mucho menor para células (< 498 pM) para células 5637. Así, se confirmó que la dosis mínima de VB4-845 requerida para lograr el efecto de citotoxicidad máximo depende de la sensibilidad de la línea celular. Además, en un experimento aparte, la exposición de 5637 a VB4-845 durante 2 horas a una concentración 500 pM mostró una destrucción eficaz (> 93 %) de las células con una citotoxicidad no específica mínima (< 10 %) demostrada mediante la inmunotoxina de control (4B5-PE). De hecho, durante una exposición de 2 horas, se mantuvo la destrucción no específica a un nivel mínimo incluso después de aumentar la concentración de 4B5-PE 100 veces.

Ejemplo 14. Unión a vejiga clínica humana

Se obtuvieron especímenes de tejido de vejiga humano por cirugía y necropsia y se analizaron para determinar la unión a Ep-CAM usando VB4-845. Los especímenes se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. La validación del procedimiento se realizó en muestras congeladas nuevas y fijadas para confirmar la adecuación del espécimen fijado para este ensayo y para determinar la concentración de anticuerpo (VB4-845) óptima para usar (minimizando la tinción no específica).

Se tiñeron diecisiete carcinomas de célula transicional de vejiga de grado III y estadios II o III y 12 muestras de control de vejiga normales con anticuerpo VB4-845 a 4 microgramos/ml (~57 nM). La preparación de las platinas y el bloqueo se realizaron según procedimientos de inmunohistoquímica bien conocidos. La detección de la VB4-845 unida al tejido se realizó usando un anticuerpo anti-exotoxina de Pseudomonas de conejo (Sigma P2318), seguido por un anticuerpo secundario anticonejo biotinilado (BA-1000 anti-conejo de Vector) y el sistema de detección ABC-AP de Vector usando rojo Vector como sustrato.

Los carcinomas mostraron un tinción aumentada con respecto al epitelio transicional normal y la tinción más fuerte observada en los casos positivos estaba asociada a membrana. Dentro de los carcinomas, la tinción fue variable en intensidad e irregular en distribución. Hubo también una tinción aumentada dentro de áreas que muestran grados de débiles a moderados de diferenciación (es decir, diferenciación transicional o columnal) en comparación con áreas dentro del mismo tumor o los mismos tumores que muestran menos diferenciación o altos grados de anaplasia nuclear y pleomorfismo.

De los 17 carcinomas transicionales teñidos, ocho muestras mostraron áreas de tinción de membrana de débiles a moderadas (2-3 en una escala de intensidad de tinción de 0-4 (muestras 2, 6, 8, 11, 13, 15 y 16), uno mostró áreas de tinción débiles (muestra 9) y las otras muestras fueron negativas a la tinción de membrana. La tinción era variable dentro de los tumores y parecía asociada con el grado de diferenciación dentro de la muestra. Dentro de las 12

muestras de vejiga normales, dos muestras mostraron tinción de membrana de frecuencia débil a moderada (muestras 2 y 11). No se observó tinción con una inmunotoxina de control negativo (scFv-PE de un anticuerpo a un antígeno irrelevante).

- 5 La tinción citoplásmica y, más raramente, la nuclear se observó en algunos especímenes normales y de carcinoma. En un estudio de validación, la concentración máxima de VB4-845 dio como resultado más "coloración roja" o tinción citoplásmica pero una tinción de membrana más intensa en un porcentaje superior de células de carcinoma. En un ajuste clínico (in vivo) ya que el citoplasma y el núcleo no se exponen al producto podría usarse una concentración más elevada de VB4-845 para aumentar la unión a células con un número más reducido de receptores.

Ejemplo 15. Ensayo clínico de vejiga

- 10 En un ensayo clínico para evaluar la dosis máxima tolerada de VB4-845, el fármaco se administra por vía intravesicular a sujetos con carcinoma de célula transicional refractaria a BCG (TCC) de la vejiga. El ciclo de tratamiento incluye 6 semanas de terapia y 4 a 6 semanas de seguimiento. La dosis apropiada de VB4-845 se administrará mediante cateterización directamente en la vejiga (tumor) una vez a la semana durante 6 semanas consecutivas. Los 7 niveles de dosis de VB4-845 son 100, 200, 335, 500, 700, 930 y 1240 microgramos en 50 ml en cada uno de los 6 días de dosificación.

- 15 Inmediatamente antes de la administración del fármaco, la vejiga debe vaciarse después de lo cual se insertará un catéter. Para un sujeto varón, se usará un catéter 16 French Coude con un Urojet y para un sujeto mujer se usará un catéter de goma roja 14 French con lubricante estéril. La solución de VB4-845 reconstituida se diluirá en 50 ml de solución salina normal, instilada en una vejiga vacía mediante cateterización, y se mantendrá durante 2 horas con el catéter pinzado en el sitio. Al finalizar las 2 horas, la vejiga se vaciará despinzando el catéter.

- 20 La seguridad, es decir, los datos de experiencia de laboratorio y adversa (AE) en cada nivel de dosis se evaluarán después de 3 semanas de tratamiento antes de la escala de dosis. El sujeto continuará con la terapia semanal a un determinado nivel de dosis durante un periodo de 6 semanas o hasta que haya una toxicidad limitante de dosis (DLT) asociada con el fármaco. Se realizarán visitas de seguimiento dentro de un periodo de 4 a 6 semanas después de la última semana de administración del fármaco. Un sujeto que experimenta una DLT, pero muestra evidencias clínicas de beneficio de terapia recibirá ciclos adicionales de tratamiento al nivel de dosis más bajo siguiente una vez se han resuelto todas las toxicidades. El tratamiento no se terminará, sin embargo, para un sujeto que experimenta una segunda DLT a una dosis reducida. La respuesta del tumor se evaluará mediante citología, citoscopia y biopsia.

- 30 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera en el presente documento que son los ejemplos preferentes, se entiende que la invención no está limitada a los ejemplos divulgados.

Tabla 1. Especificaciones de producto de la muestra de VB4-845

Ensayo	Criterios
Apariencia	Solución transparente a 2 - 8 °C
Proteína (BCA)	1,0 ± 0,2 mg/ml
pH	7,2 ± 0,2
SDS-PAGE (no reductor: Coomassie Blue)	Banda principal ~70 kDa (área ≥ 90%)
Actividad biológica (FACS)	aumento ≥ 50 veces en fluorescencia sobre el anticuerpo de control
Citotoxicidad (CI ₅₀)	≤ 0,50 pM
ADN total	≤ 1,0 ng/mg
Endotoxina (LAL)	≤ 2000 UE/mg
Esterilidad	Sin crecimiento

35

Tabla 2. Resumen del efecto de VB4-845 frente a células tumorales *in vitro*

Información del sistema de ensayo:	Hospital Universitario de Zürich, Departamento de Medicina Interna, División de Oncología Médica, Zürich, Suiza Líneas celulares: Carcinoma de pulmón de célula pequeña SW2 Carcinoma de célula escamosa CAL27 Carcinoma colorrectal HT29 Carcinoma colorrectal COLO320 Adenocarcinoma de mama MCF7 Linfoma de no Hodkin RL
Forma de dosificación:	VB4-845: 0,0001-100 pM
Ensayo:	Ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-disfeniltetrazolio)
Duración de estudio:	72 horas
Parámetros evaluados:	Inhibición del crecimiento celular por VB4-845
Efectos observados y conclusiones:	Se halló que las células SW2, CAL27 y MCF7 eran igualmente sensibles al efecto citotóxico de VB4-845 ($CI_{50} = 0,005$ pM). Se halló que las células HT29 eran las menos sensibles ($CI_{50} = 0,2$ pM).

5 Tabla 3 Resumen del efecto de VB4-845 frente a la síntesis de proteínas en células tumorales *in vitro*

Información del sistema de ensayo:	Hospital Universitario de Zürich, Departamento de Medicina Interna, División de Oncología Médica, Zürich, Suiza Líneas celulares: Carcinoma de pulmón de célula pequeña SW2 Linfoma de no Hodkin RL
Forma de dosificación:	VB4-845 – cantidades variables
Ensayo:	Absorción de [4,5- ³ H]leucina
Duración de estudio:	30 horas
Parámetros evaluados:	Absorción de [³ H]leucina (medida de síntesis de proteínas)
Efectos observados y conclusiones:	La síntesis de proteínas se inhibió mediante VB4-845 en SW2 positivas a Ep-CAM con una CI_{50} 0,01 pM. La síntesis de proteínas en la línea celular de control negativa a Ep-CAM RL no se vio afectada

Tabla 4. Resumen del efecto de VB4-845 sobre tumores sólidos en modelos de xenoinjerto en ratones de cáncer

Información de animales de ensayo:	Ratón, atímico desnudo Hospital Universitario de Zürich, Departamento de Medicina Interna, División de Oncología Médica, Zürich, Suiza Animales implantados s.c. con uno de: Carcinoma de pulmón de célula pequeña SW2 Carcinoma de célula escamosa CAL27 Carcinoma colorrectal HT29 Carcinoma colorrectal COLO320
Forma de dosificación:	VB4-845: 5 y 10 µg (véase más adelante)
Vía de administración:	Intravenosa
Régimen de tratamiento:	i) 5 µg cada dos días durante 3 semanas (45 µg en total) ii) 10 µg cada dos días durante 1 semana (30 µg en total)
Duración de estudio:	50 días
Parámetros evaluados:	Tamaño del tumor primario

(continuación)

Efectos observados y conclusiones:	<p>SW2: reducción del volumen del tumor a un máximo del 20 % del tamaño inicial y una ligera reanudación de crecimiento a un aumento de tamaño final de 2,6 veces al final del periodo de seguimiento.</p> <p>CAL27: tumores reducidos a un máximo del 60 % del volumen inicial. La mediana del volumen tumoral no excede 1,4 el tamaño inicial 50 días después del inicio del tratamiento. Dos de 7 ratones tratados con la dosis de 5 µg mostraron una regresión total del tumor y permanecieron sin tumores. Ni los tumores de CAL27 ni los de SW2 mostraron una diferencia significativa en la respuesta del tumor a las dos agentes de tratamiento.</p> <p>HT29: el tamaño del tumor disminuyó 0,7 veces con el régimen de dosificación de 5 µg. Tres (3) de 7 ratones mostraron regresión completa de sus tumores HT29. La eficacia de la agenda de 10 µg fue comparativamente inferior, indicando que para estos tumores es más eficaz un tratamiento a largo plazo.</p> <p>No se observó ningún efecto antitumoral de VB4-845 en ratones que portaban tumores de control de COLO320 negativos a Ep-CAM.</p>
------------------------------------	---

Tabla 5. Resumen del efecto de inyecciones por vía peritumoral de VB4-845 sobre tumores de carcinoma de célula escamosa CAL27 en modelos de xenoinjerto en ratones de cáncer

5

Información de animales de ensayo:	<p>Ratón, atímico desnudo Hospital Universitario de Zürich, Departamento de Medicina Interna, División de Oncología Médica, Zürich, Suiza</p> <p>Animales implantados s.c. con carcinoma de célula escamosa CAL27</p>
Forma de dosificación:	VB4-845: 5 µg (véase más adelante)
Vía de administración:	Peritumoral
Régimen de tratamiento:	5 µg cada dos días (lunes/miércoles/viernes) durante 3 semanas (45 µg en total)
Duración de estudio:	80 días
Parámetros evaluados:	Tamaño del tumor primario
Efectos observados y conclusiones:	<p>Se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral en animales tratados. Dos ratones mostraron una regresión del tumor completa y permanecieron sin tumores durante la duración del experimento.</p>

Tabla 6 Resumen del efecto de dosis repetidas en escala de VB4-845 sobre el hígado, el bazo y los huesos de ratones inmunocompetentes

Información de animales de ensayo:	<p>Ratón, inmunocompetente C57BL/6 Hospital Universitario de Zürich, Departamento de Medicina Interna, División de Oncología Médica, Zürich, Suiza</p>
Forma de dosificación:	<p>VB4-845: 5 µg (véase más adelante)</p> <p>10 µg 20 µg</p>
Vía de administración:	i.v.
Régimen de tratamiento:	<p>5 o 10 µg cada dos días durante 3 dosis (15 o 30 µg en total, respectivamente)</p> <p>20 µg cada dos días durante 2 dosis (40 µg en total)</p>
Grupos de estudio:	<p>3 animales / grupo 5 grupos</p>
Duración de estudio:	7 días
Parámetros evaluados:	<p>ALT / AST en plasma Hallazgos histopatológicos, hígado, bazo y huesos</p>

10

(Continuación)

Efectos observados y conclusiones:	<p>Ninguna elevación en enzimas del hígado 24 horas después del final de la dosificación en los ratones de régimen de dosificación de 5 o 10 µg.</p> <p>Niveles de ALT / AST observados 24 horas después de la dosis final en los animales de 20 µg de dosis.</p> <p>Ningún hallazgo histopatológico en los grupos de dosis de 5 y 10 µg.</p> <p>Se hallaron unos pocos sitios con hepatocitos necróticos en el grupo de tratamiento de 20 µg.</p> <p>No se observó ningún cambio histopatológico o mielosupresión en ningún grupo de dosificación en el bazo o componentes celulares de muestras de sangre completa.</p>
------------------------------------	---

Tabla 7: Relación entre dosis usadas en estudios con ratones y la dosis baja y alta propuestas de VB4-845 en seres humanos.

Especie	Exposición a una dosis única (µg/kg)	Múltiplo de dosis humanas (dosis baja/alta) ¹	Exposición general mensual (µg/kg)	Múltiplo de dosis humanas mensuales (dosis baja/alta) ²	Exposición total (µg/kg)	Múltiplo de dosis humanas totales (dosis baja/alta) ³
	Ratón		Ratón		Ratón	
Ratón atómico	250	862/63	2250	1585/113	2250	523/38
Ratón atómico	500	1724/125	1500	1056/75	1500	349/25
Ratón atómico	250	862/63	2250	1585/113	2250	523/38
Ratón C57BL/6	250	862/63	750	528/38	750	174/13
Ratón C57BL/6	500	1724/125	1500	1056/75	1500	349/25
Ratón C57BL/6	1000	3448/250	2000	1408/100	2000	465/3

¹ 0.29 y 4 µg/kg es la dosis única baja y alta propuesta, respectivamente, para la administración humana (es decir, 20 µg y 280 µg administrados a un individuo de 70 kg).

² 1,4 y 20 µg/kg es la dosis mensual baja y alta propuesta, respectivamente, para administración humana (es decir, 20 µg y 280 µg administrados a un individuo de 70 kg cada día durante cinco días consecutivos con un periodo de lavado de tres semanas).

³ 4,3 y 60 µg/kg es la dosis total baja y alta propuesta, respectivamente, para administración humana (es decir, 20 µg y 280 µg administrados a un individuo de 70 kg cada día durante cinco días consecutivos con un periodo de lavado de tres semanas).

5

Tabla 8

Número de muestra	Grado de carcinoma	Estadio del carcinoma	Tinción de membrana positiva	% de células positivas
1	III	II	-	-
2	III	II	Sí	40 %
3	III	II	-	-
4	III	II	-	-
5	III	II	-	-
6	III	II	Sí	10 %
7	III	II	-	-
8	III	II	Sí	40 %
9	III	III	Sí	70 %
10	III	III	-	-
11	III	III	Sí	25 %
12	III	III	-	-
13	III	III	Sí	30-40 %
14	III	III	-	-
15	III	III	Sí	10 %
16	III	III	Sí	30 %

(continuación)

Número de muestra	Grado de carcinoma	Estadio del carcinoma	Tinción de membrana positiva	% de células positivas
17	III	III	-	-

Tabla 9: Características de líneas celulares de cáncer de vejiga

Nº de ref.	Líneas celulares de cáncer de vejiga	Tejido de tumor primario de origen	Grado del tumor	Estadio del tumor	Diferenciación
1	1A6	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Buena
2	T-24	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
3	SW-780	TCC de vejiga	Bajo	Invasivo	Sin datos
4	HT-1197	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
5	RT-4	TCC de vejiga	Bajo	Superficial (no invas.)	Buena
6	SCaBER	SqCC de vejiga	Sin datos	Invasivo	Moderada
7	HT-1376	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
8	TCCSUP	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
9	J-82	SqCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
10	UM-UC-3	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Mala
10	UM-UC-13	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Sin datos
11	UM-UC-10	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
11	UM-UC-14	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
1	5636	TCC de vejiga	Alto	Invasivo	Sin datos

Referencias: 1: A clone of the parent cell line, 5637, Immunobiol. 172:175-184 (1986), Urol. Res. 21:27-32 (1993); 2: Int. J. Cancer 11: 765-773 (1973), J. Uro 149: 1626-1632 (1993); 3: Cancer Res. 44: 3997-4005 (1984); 4: J. Natl. Cancer Inst. 58: 881-890 (1977); 5: J. Urol. 161: 692-698 (1999); 6: Int. J. Cancer 17: 707-714 (1976); 7: J. Natl. Cancer Inst. 58: 881-890 (1977); 8: Br. J. Cancer 35:142151 (1977); 9: Br. J. Cancer 38: 64-76 (1978); 10: J. Urol. 146: 227-231 (1991); 11: AntiCancer Inc, Cell lines.
TCC: Carcinoma de célula transicional. SqCC: Carcinoma de célula escamosa.

5

Tabla 10: Reactividad de superficie celular tumoral de VB4-845

Líneas celulares de cáncer de vejiga	Reactividad ¹ : Veces de aumento en fluorescencia	Citotoxicidad CI ₅₀ (pM)	Citotoxicidad: Sensitividad relativa frente a CAL27 ²
1A6	154,7 ± 15,2	0,033 ± 0,01	8,8
T-24	134,1 ± 35,9	0,001 ± 0,0	290
UM-UC-10	124,6 ± 5,3	0,024 ± 0,00	12,1
5637	97,0 ± 11,2	0,38 ± 0,13	0,8
SW-780	86,7 ± 3,1	0,002 ± 0,00	145
HT-1197	56,5 ± 2,3	0,23 ± 0,05	1,3
RT-4	55,3 ± 16,4	0,20 ± 0,10	1,4
SCaBER	54,0 ± 2,1	10,1 ± 0,0	0,03
HT-1376	40,7 ± 0,3	3,3 ± 1,2	0,1
UM-UC-14	25,7 ± 1,2	0,17 ± 0,2	1,6
TCCSUP	7,2 ± 0,1	320,0 ± 102,0	0,0009
J-82	1,2 ± 0,1 ²	> 500	n/a
UM-UC-3	1,2 ± 0,1 ²	> 500	n/a
UM-UC-13	1,3 ± 0,1 ²	> 500	n/a
CAL-27(Control positivo)	87,0 ± 3,0	0,29 ± 0,1	1,0
COLO-320(Control negativo)	1,1 ± 0,1 ²	> 500	n/a

¹ Veces de aumento de la mediana de la fluorescencia sobre el control. Los valores se expresan como media ± SEM. La reactividad del anticuerpo para una indicación dada se determinó mediante veces de aumento medio, en promedio, en la mediana de la fluorescencia calculada para cada línea celular en esa indicación.
² Las líneas celulares que muestran un desplazamiento positivo en la fluorescencia < 30 % (1,3 veces de aumento) se consideraron negativas.

REFERENCIAS

1. Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R (1999) Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res JID* - 8102988 19:2237-2242
- 5 2. Salter ER, Tichansky D, Furth EE, Herlyn AM (2001) Tumor-associated antigen expression and growth requirements predict tumorigenesis in squamous cell carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim JID* - 9418515 37:530-535
3. Takes RP, Baatenburg dJR, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res JID* - 8102988 18:4793-4800
- 10 4. Oppenheimer NJ, Bodley JW (1981) Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP-ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *J Biol Chem JID* - 2985121R 256:8579-8581
5. Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578
6. Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129
- 15 7. Grossbard ML, Nadler LM (1993) Monoclonal antibody therapy for indolent lymphomas. *Semin Oncol* 20:118-135
8. Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992
9. Grossbard ML, Fidiias P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114
- 20 10. Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314
11. Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120
12. Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201
- 25 13. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247
14. Schwartzberg LS (2001) Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol JID* - 8916049 40:17-24
- 30 15. Adkins JC, Spencer CM (1998) Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A). *Drugs JID* - 7600076 56:619-626
16. Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol JID* - 0375356 125:437-446
- 35 17. Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, Pluckthun A (1999) High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res JID* - 2984705R 59:5758-5767
18. Proca DM, Niemann TH, Porcell AI, DeYoung BR (2000) MOC31 immunoreactivity in primary and metastatic carcinoma of the liver. Report of findings and review of other utilized markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol JID* - 100888796 8:120-125
- 40 19. Pavlovskis OR, Gordon FB (1972) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin: effect on cell cultures. *J Infect Dis JID* - 0413675 125:631-636
20. Leppla SH (1976) Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun JID* - 0246127 14:1077-1086
- 45 21. Kreitman RJ, Pastan I (1998) Accumulation of a recombinant immunotoxin in a tumor in vivo: fewer than 1000 molecules per cell are sufficient for complete responses. *Cancer Res JID* - 2984705R 58:968-975
22. Perentesis JP, Miller SP, Bodley JW (1992) Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors JID* - 8807441 3:173-184

23. Milenic DE, Yokota T, Filpula DR, Finkelman MA, Dodd SW, Wood JF, Whitlow M, Snoy P, Schlom J (1991) Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Res.* 51:6363-6371
- 5 24. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52:3402-3408
25. Verhaar MJ, Keep PA, Hawkins RE, Robson L, Casey JL, Pedley B, Boden JA, Begent RH, Chester KA (1996) Technetium-99m radiolabeling using a phage-derived single-chain Fv with a C-terminal cysteine. *J.Nucl.Med.* 37:868-872
- 10 26. Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF, Bookman MA, Fand I, Houston LL, Weiner LM (1993) Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res.* 53:4026-4034
27. Deonarain MP, Rowlinson-Busza G, George AJ, Epenetos AA (1997) Redesigned anti-human placental alkaline phosphatase single-chain Fv: soluble expression, characterization and in vivo tumour targeting. *Protein Eng.* 10:89-98
- 15 28. Friedman PN, McAndrew SJ, Gawlak SL, Chace D, Trail PA, Brown JP, Siegall CB (1992) BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53:334-339
29. Begent RH, Verhaar MJ, Chester KA, Casey JL, Green AJ, Napier MP, Hope-Stone LD, Cushen N, Keep PA, Johnson CJ, Hawkins RE, Hilson AJ, Robson L (1996) Clinical evidence of efficient tumor targeting based on singlechain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat.Med.* 2:979-984
- 20 30. Mayer A, Tsiompanou E, O'Malley D, Boxer GM, Bhatia J, Flynn AA, Chester KA, Davidson BR, Lewis AA, Winslet MC, Dhillon AP, Hilson AJ, Begent RH (2000) Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clin Cancer Res* 6:1711-1719
31. Kreitman RJ, Wilson WH, Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I (1999) Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. *Blood* 94:3340-3348
- 25 32. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, Waldmann TA, Pastan I (2000) Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18:1622-1636
33. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE (1996) Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and nonconjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res.* 16:661-674
- 30 34. Multani PS, Grossbard ML (1998) Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J.Clin.Oncol.* 16:3691-3710
- 35 35. White CA, Larocca A, Grillo-Lopez AJ (1999) Anti-CD20 monoclonal antibodies as novel treatments for non-Hodgkin's lymphoma. *PSTT* 2:95-101
36. Saleh MN, Posey JA, Khazaeli MB, Thurmond LM, Khor SP, Lampkin TA, Wissel PS, LoBuglio AF (1998) Phase I trial testing multiple doses of humanized monoclonal antibody (MAb) 3622W94. ASCO 1998 meeting #1680 (Resumen)
37. Raum T, Gruber R, Riethmuller G, Kufer P (2001) Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens. *Cancer Immunol Immunother JID - 8605732* 50:141-150
- 40 38. Kroesen BJ, Nieken J, Sleijfer DT, Molema G, de Vries EG, Groen HJ, Helfrich W, The TH, Mulder NH, de Leij L (1997) Approaches to lung cancer treatment using the CD3 x EGP-2-directed bispecific monoclonal antibody BIS- 1. *Cancer Immunol Immunother JID - 8605732* 45:203-206
39. Haller DG (2001) Update of clinical trials with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal cancer. *Semin Oncol* 28:25-30
- 45 40. Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol JID - 8309333* 16:1788-1794
- 50 41. Dencausse Y, Hartung G, Franz A, Strum J, Edler L, Bornbusch D, Gonnermann M, Post S, Hehlmann R, Queisser W (2000) Prospective randomized study of adjuvant therapy with edrecolomab (PANOREX) of stage II colon cancer: Interum analysis. *Ann.Oncol.* 11:47(Resumen)

42. de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV (1999) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol JID* - 0204634 188:201-206
43. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med JID* - 9504370 77:699-712
- 5 44. Herlyn D, Sears HF, Ernst CS, Iliopoulos D, Steplewski Z, Koprowski H (1991) Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol JID* - 8207754 14:371-378
45. Begent RH, Chester KA (1997) Single-chain Fv antibodies for targeting cancer therapy. *Biochem.Soc.Trans.*25:715-717
- 10 46. Chester KA, Mayer A, Bhatia J, Robson L, Spencer DI, Cooke SP, Flynn AA, Sharma SK, Boxer G, Pedley RB, Begent RH (2000) Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl:S8-12
47. Chester KA, Bhatia J, Boxer G, Cooke SP, Flynn AA, Huhlov A, Mayer A, Pedley RB, Robson L, Sharma SK, Spencer DI, Begent RH (2000) Clinical applications of phage-derived sFvs and sFv fusion proteins. *Dis Markers* 15:53-62
- 15 48. Grossbard ML, Freedman AS, Ritz J, Coral F, Goldmacher VS, Eliseo L, Spector N, Dear K, Lambert JM, Blattler WA (1992) Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of daily bolus infusion. *Blood* 79:576-585
49. Amlot PL, Stone MJ, Cunningham D, Fay J, Newman J, Collins R, May R, McCarthy M, Richardson J, Ghetie V (1993) A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy. *Blood* 82:2624-2633
- 20 50. Vitetta ES, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D (1991) Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res* 51:4052-4058
51. Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, Headlee D, Collins RH, Figg WD, Stetler-Stevenson M, Jain V, Jaffe ES, Solomon D, Lush RM, Senderowicz A, Ghetie V, Schindler J, Uhr JW, Vitetta ES (1996) A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood JID* - 7603509 88:1188-1197
- 25 52. Messmann RA, Vitetta ES, Headlee D, Senderowicz AM, Figg WD, Schindler J, Michiel DF, Creekmore S, Steinberg SM, Kohler D, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Chen H, Ghetie V, Sausville EA (2000) A phase I study of combination therapy with immunotoxins IgG-HD37-deglycosylated ricin A chain (dgA) and IgG-RFB4-dgA (Combotox) in patients with refractory CD19(+), CD22(+) B cell lymphoma. *Clin Cancer Res JID* - 9502500 6:1302-1313
- 30 53. Di Paolo, C., Willuda, J., Kubetzko, S., Lauffer, I., Tschudi, D., Waibel, R., Pluckthun, A., Stahel, R.A. y Zangemeister-Witte, U. A recombinant immunotoxin derived from a humanized Ep-CAM-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. (remitido)
- 35 54. Di Paolo, C. y Zangemeister-Witte, U., Personal communication, Zurich.
55. Schümann, J., Angermüller, S., Bang, R., Lohoff, M. y Tiegs, G. Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. *J. Immunol.*, 161: 5745-5754,1998.
- 40 56. Schümann, J., Wolf, D., Pahl, A., Brune, K., Papadopoulos, T., van Rooijen, N. y Tiegs, G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am. J. Pathol.*, 157:1671-1683, 2000.
57. Sizmann N y Korting HC. Prolonged Urticaria with 17-1A Antibody. *BMJ* 317:1631.
58. Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmuller G, Baeuerle PA, Dreier T. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. *Int J Cancer* 100(1):101-10, 2002.
- 45 59. Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, Pluckthun A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein- 2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 59(22):5758-67,1999
60. Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B. y Hynes, N. E. EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer*, 60: 137-144, 1995.
- 50

61. Ge, L., Plückthun, A., Pack, P., Freund, C. y Plückthun, A. Expressing antibodies in Escherichia coli. In C. A. K. Borrebaeck (ed.), *Antibody engineering*, pp. 229-261. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- 5 62. Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U. y Plückthun, A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res.*, 59: 5758-5767, 1999.
63. Bass, S., Gu, Q. y Christen, A. Multicopy suppressors of prc mutant Escherichia coli include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA. *J. Bacteriol.*, 178: 1154-1161, 1996.
- 10 64. Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K. y Riesenberg, D. Producing antibodies in Escherichia Coli: from PCR to fermentation. In J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, and D. J. Chiswell (eds.), *Antibody engineering*, pp. 203-252. Oxford: IRL Press, 1996.
65. Waibel, R., Alberto, R., Willuda, J., Finnern, R., Schibli, R., Stichelberger, A., Egli, A., Abram, U., Mach, J. P., Plückthun, A. y Schubiger, P. A. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat. Biotechnol.*, 17: 897-901, 1999.
- 15 66. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J. y Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*, 72: 77-89, 1984.

ABREVIATURAS

- ADME: administración, distribución, metabolismo y excreción
- 20 ADP: adenosina fosfato
- ALT: alanina aminotransferasa (SGPT)
- AST: aspartato aminotransferasa (SGOT)
- BCA: procedimiento de ácido bicinconínico
- 25 $C_{m\acute{a}x}$: concentración máxima
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Ep-CAM: molécula de adhesión a célula epitelial
- ETA: exotoxina A de *Pseudomonas*
- UE: unidades de exotoxina
- FACS: procedimiento de selección de células activadas por fluorescencia
- 30 GLP: buenas prácticas de laboratorio
- HNSCC: carcinoma de célula escamosa de la cabeza y el cuello
- Cl_{50} : concentración de inhibición al 50 %
- i.t.*: intratumoral
- i.v.*: intravenoso
- 35 kDa: kilodalton
- LAL: lisado de amebocitos de limulus
- MAB: anticuerpos monoclonales
- mg: miligramo
- ml: mililitro
- 40 mM: milimolar
- MTD: dosis máxima tolerada
- MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-disfeniltetrazolio
- NaCl: cloruro de sodio
- ng: nanogramo
- 45 PBS: solución salina tamponada con fosfatos
- pI: punto isoeléctrico
- PK: farmacocinética
- pM: picomolar
- p.t.: peritumoral
- 50 s.c.: subcutáneo
- scFv: fragmento de anticuerpo monocatenario
- SCLC: cáncer de pulmón de célula pequeña
- DT: desviación típica
- SDS PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
- 55 $t_{1/2}$: semivida
- $T_{m\acute{a}x}$: tiempo a la concentración máxima
- μ g: microgramo
- VLS: síndrome de fuga vascular
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- 60 wt: tipo silvestre

El ámbito de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas anteriormente. Serán evidentes muchas modificaciones de la presente invención, además de las indicadas específica y anteriormente para los expertos en la técnica de la presente divulgación. Se pretende que estas modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Zangemeister-Wittke, Uwe Di Paolo, Claudio Tschudi, Dominique C. Fitsialos, Dimitri Glover, Nicholas R.

<120> Procedimientos de tratamiento del cáncer usando una inmunotoxina

10 <130> 10241-10

<150> 60/466,608

<151> 30-04-2003

15 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

20 <211> 2084

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> VB4-845

<220>

<221> CDS

30 <222> (66)..(2084)

<223>

<400> 1

ES 2 639 301 T3

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag	60
tcata atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc	110
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
gct gcc caa cca gcg atg gcg cac cat cat cac cat cac gat atc cag	158
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His His Asp Ile Gln	
20 25 30	
atg acc cag tcc ccg tcc tcc ctg agt gct tct gtt ggt gac cgt gtt	206
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val	
35 40 45	
acc atc acc tgc cgt tcc acc aaa tcc ctc ctg cac tcc aac ggt atc	254
Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile	
50 55 60	
acc tac ctt tat tgg tat caa cag aaa ccg ggt aaa gct ccg aaa ctt	302
Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
65 70 75	
ctg atc tac cag atg tcc aac ctg gct tcc ggt gtt ccg tct cgt ttc	350
Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
80 85 90 95	
tcc agt tct ggt tct ggt acc gac ttc acc ctg acc atc tct tct ctg	398
Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
100 105 110	
cag ccg gaa gac ttc gct acc tac tac tgc gct cag aac ctg gaa atc	446
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile	
115 120 125	
ccg cgt acc ttc ggt cag ggt acc aaa gtt gaa ctt aag cgc gct acc	494
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr	
130 135 140	
ccg tct cac aac tcc cac cag gtt cca tcc gca ggc ggt ccg act gct	542
Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala	
145 150 155	
aac tct gga act agt gga tcc gaa gta cag ctg gtt cag tcc ggc ccg	590
Asn Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro	
160 165 170 175	
ggt ctt gtt caa ccg ggt ggt tcc gtt cgt atc tct tgc gct gct tct	638
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser	
180 185 190	
ggt tac acg ttc acc aac tac ggc atg aac tgg gtc aaa cag gct ccg	686
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro	
195 200 205	
ggt aaa ggc ctg gaa tgg atg ggc tgg atc aac acc tac acc ggt gaa	734
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu	
210 215 220	

ES 2 639 301 T3

tcc acc tac gct gac tcc ttc aaa ggt cgc ttc act ttc tcc ctc gac	782
Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp	
225 230 235	
aca agt gct agt gct gca tac ctc caa atc aac tcg ctg cgt gca gag	830
Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu	
240 245 250 255	
gat aca gca gtc tat tac tgc gcc cgt ttc gct atc aaa ggt gac tac	878
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr	
260 265 270	
tgg ggt caa ggc acg ctg ctg acc gtt tcc tcg gaa ttt ggt ggc gcg	926
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Glu Phe Gly Gly Ala	
275 280 285	
ccg gag ttc ccg aaa ccg tcc acc ccg ccg ggt tct tct ggt tta gag	974
Pro Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Leu Glu	
290 295 300	
ggc ggc agc ctg gcc gcg ctg acc gcg cac cag gcc tgc cac ctg ccg	1022
Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro	
305 310 315	
ctg gag act ttc acc cgt cat cgc cag ccg cgc ggc tgg gaa caa ctg	1070
Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu	
320 325 330 335	
gag cag tgc ggc tat ccg gtg cag cgg ctg gtc gcc ctc tac ctg gcg	1118
Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala	
340 345 350	
gcg cga ctg tca tgg aac cag gtc gac cag gtg atc cgc aac gcc ctg	1166
Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu	
355 360 365	
gcc agc ccc ggc agc ggc ggc gac ctg ggc gaa gcg atc cgc gag cag	1214
Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln	
370 375 380	
ccg gag cag gcc cgt ctg gcc ctg acc ctg gcc gcc gcc gag agc gag	1262
Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu	
385 390 395	
cgc ttc gtc cgg cag ggc acc ggc aac gac gag gcc ggc gcg gcc agc	1310
Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser	
400 405 410 415	
gcc gac gtg gtg agc ctg acc tgc ccg gtc gcc gcc ggt gaa tgc gcg	1358
Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala	
420 425 430	
ggc ccg gcg gac agc ggc gac gcc ctg ctg gag cgc aac tat ccc act	1406
Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr	
435 440 445	
ggc gcg gag ttc ctc ggc gac ggt ggc gac gtc agc ttc agc acc cgc	1454
Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg	
450 455 460	

ES 2 639 301 T3

ggc acg cag aac tgg acg gtg gag cgg ctg ctc cag gcg cac cgc caa 1502
 Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
 465 470 475

ctg gag gag cgc ggc tat gtg ttc gtc ggc tac cac ggc acc ttc ctc 1550
 Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
 480 485 490 495

gaa gcg gcg caa agc atc gtc ttc ggc ggg gtg cgc gcg cgc agc cag 1598
 Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
 500 505 510

gat ctc gac gcg atc tgg cgc ggt ttc tat atc gcc ggc gat ccg gcg 1646
 Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
 515 520 525

ctg gcc tac ggc tac gcc cag gac cag gaa ccc gac gcg cgc ggc cgg 1694
 Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
 530 535 540

atc cgc aac ggt gcc ctg ctg cgg gtc tat gtg ccg cgc tcc agc ctg 1742
 Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
 545 550 555

ccg ggc ttc tac cgc acc ggc ctg acc ctg gcc gcg ccg gag gcg gcg 1790
 Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
 560 565 570 575

ggc gag gtc gaa cgg ctg atc ggc cat ccg ctg ccg ctg cgc ctg gac 1838
 Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
 580 585 590

gcc atc acc ggc ccc gag gag gaa ggc ggg cgc ctg gag acc att ctc 1886
 Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
 595 600 605

ggc tgg ccg ctg gcc gag cgc acc gtg gtg att ccc tcg gcg atc ccc 1934
 Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
 610 615 620

acc gac ccg cgc aac gtc ggt ggc gac ctc gac ccg tcc agc atc ccc 1982
 Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
 625 630 635

gac aag gaa cag gcg atc agc gcc ctg ccg gac tac gcc agc cag ccc 2030
 Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
 640 645 650 655

ggc aaa ccg ccg cat cac cac cat cac cat aaa gac gaa ctg tag tga 2078
 Gly Lys Pro Pro His His His His His His Lys Asp Glu Leu
 660 665

ctc gag 2084
 Leu Glu
 670

<210> 2
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VB4-845

ES 2 639 301 T3

<400> 2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His His Asp Ile Gln Met
 20 25 30

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 35 40 45

Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr
 50 55 60

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 85 90 95

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 100 105 110

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro
 115 120 125

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr Pro
 130 135 140

Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
 165 170 175

ES 2 639 301 T3

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 180 185 190

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
 195 200 205

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
 210 215 220

Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 245 250 255

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
 260 265 270

Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Glu Phe Gly Gly Ala Pro
 275 280 285

Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Leu Glu Gly
 290 295 300

Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu
 305 310 315 320

Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu
 325 330 335

Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala
 340 345 350

Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala
 355 360 365

Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro
 370 375 380

Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg
 385 390 395 400

Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala
 405 410 415

ES 2 639 301 T3

Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly
 420 425 430

Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly
 435 440 445

Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly
 450 455 460

Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu
 465 470 475 480

Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu
 485 490 495

Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp
 500 505 510

Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu
 515 520 525

Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile
 530 535 540

Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro
 545 550 555 560

Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 565 570 575

Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala
 580 585 590

Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly
 595 600 605

Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr
 610 615 620

Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp
 625 630 635 640

Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly
 645 650 655

Lys Pro Pro His His His His His His Lys Asp Glu Leu
 660 665

ES 2 639 301 T3

<210> 3
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de unión a Ep-CAM

<400> 3

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
 20           25           30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50           55           60

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65           70           75           80

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

Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100          105          110

Arg Ala Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly
 115          120          125

Pro Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln
 130          135          140

Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys
    
```

10

ES 2 639 301 T3

145					150						155				160
Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys
				165					170					175	
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr
			180					185					190		
Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe
		195					200					205			
Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Ser	Leu
	210					215					220				
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys
225					230					235					240
Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Ser	Ser		
				245					250						

5 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 (L)

10 <400> 4

Arg	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

15 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 (L)

20 <400> 5

Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

25 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 639 301 T3

<220>

<223> CDR3 (L)

<400> 6

Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr
1 5

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR1 (H)

<400> 7

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

15

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> CDR2 (H)

<400> 8

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

25

Gly

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> CDR3 (H)

<400> 9

Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr
1 5

35

<210> 10

<211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 639 301 T3

<220>
 <223> Cebador Tox1

<400> 10

ctcggaaatc ggtggcgcg cggagttccc gaaaccgtcc accccgcccgg gttcttctgg 60

5 tta 64

<210> 11
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador Tox2

15 <400> 11

gtcaagcttc tacagttcgt cttatggtg atgggtgga tgcggcggtt tcccgggctg 60

20 <210> 12
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 12

ctagataacg agggcaaaaa atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactgggctg 60

gtttcgctac cgt 73

<210> 13
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido

35 <400> 13

gccactgcaa tcgcatagc tgccttttc atttttgcc ctcgttat 48

40 <210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 14

agcgcaggcc gaccaccatc atcaccatca cgat 34

50 <210> 15
 <211> 55

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 639 301 T3

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 15

5 atcgtgatgg tgatgatggt ggtcggcctg cgctacggta gcgaaaccag ccagt 55

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello administrándola directamente al sitio del cáncer por vía intratumoral o peritumoral y en el que dicha inmunotoxina comprende:
- 5 (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM en la célula cancerosa unido a;
(b) una toxina que es citotóxica para la célula cancerosa.
2. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es murino, humanizado o un anticuerpo o fragmento quimérico.
- 10 3. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab'. (Fab')₂, scFv o dsFv, en el que, de manera opcional, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv.
- 15 4. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera como se define por las SEQ ID NO:4-6 y las CDR de cadena pesada como se definen por las SEQ ID NOS:7-9.
- 20 5. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o la prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 1, en la que la inmunotoxina consiste en la secuencia de aminoácidos como se define por la SEQ ID NO:2.
6. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según las reivindicaciones 1, en el que el fragmento de anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos como se define por la SEQ ID NO:3 o una variante de la misma.
- 25 7. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo o fragmento se une a Ep-CAM humana con una constante de disociación (K_D) inferior a $2,0 \times 10^{-8}$.
- 30 8. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la toxina comprende un agente que actúa alterando el ADN, un agente que actúa alterando la tubulina, un agente alquilante, un agente antimitótico, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, un antimetabolito de ARN o de ADN, sulfato de vinblastina o un polipéptido inactivador de ribosomas, en el que opcionalmente es seleccionada la toxina del grupo que consiste en gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena de ricina A, briodina, differia y restrictocina, en particular, en el que la toxina es exotoxina A de Pseudomonas o una variante de la misma.
- 35 9. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que adicionalmente comprende el uso de productos terapéuticos contra el cáncer adicionales para el tratamiento o prevención de forma simultánea, separada o secuencial de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en el que los productos terapéuticos contra el cáncer adicionales se seleccionan de los grupos que consisten en:
- 40 (A) una o más citosinas incluyendo una linfocina, factor de necrosis tumoral, citocina similar al factor de necrosis tumoral, linfotoxina, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos y de monocitos e interleucina, y una variante de los mismos, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos;
- 45 (B) antibióticos incluyendo bleomicina, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, agentes antihistamínicos o agentes antináuseas;
- (C) productos terapéuticos hormonales incluyendo flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida, dexametasona, retinoide, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoide, mineralocorticoide, estrógeno, testosterona o progestina;
- (D) radioterapia, de manera opcional, en combinación con cisplatino, fluorouracil, carboplatino y/o paclitaxel;
- 50 (E) terapia génica;
- (F) uno o más agentes terapéuticos incluyendo bleomicina, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbacina, docetaxel, fludarabina, fluorouracil, flutamida, gemcitabina, hidroxiurea, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina 2, metotrexato, mitomicinas, oxaliplatino, paclitaxel, tamoxifeno, vincristina, gemtuzumab, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, temozamida, hexametilmelamina, análogos de nucleósido, camptotecina, topotecán, irinotecán, Irinotecán, vinca alcaloides, antraciclinas, acetato de leuprolida,
- 55 (G) al menos otro inmunoterapéutico incluyendo rituximab, gemtuzumab y trastuzumab; o

(H) tartrato de vinorelbina y/o paclitaxel.

- 5 10. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la inmunotoxina es administrada a una dosis de 10 a 3000 µg de inmunotoxina/tumor/día, de manera opcional, a una dosis de 20 a 1240 µg de inmunotoxina/tumor/día.
11. Una cantidad eficaz de una inmunotoxina para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la inmunotoxina es administrada durante 1-6 ciclos, en los que cada ciclo comprende una dosis diaria durante 1 a 7 días.
- 10 12. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello que comprende una cantidad eficaz de una inmunotoxina que comprende (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM en la célula cancerosa unido a; (b) una toxina que es citotóxica para la célula cancerosa.
13. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 12, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab; Fab', (Fab')₂, scFv o dsFv, en el que opcionalmente el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv.
- 15 14. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera definidas por las SEQ ID NO: 4-6 y las CDR de cadena pesada como se define por las SEQ ID NO: 7-9 y en el que la inmunotoxina se administra directamente al sitio del cáncer por vía intratumoral o peritumoral.
- 20 15. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 12, en el que la inmunotoxina consiste en la secuencia de aminoácidos como se define por la SEQ ID NO: 2 y en el que la inmunotoxina se administra directamente al sitio del cáncer por vía intratumoral o peritumoral.
- 25 16. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la reivindicación 12, en el que el fragmento de anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos como se define por la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma, y en el que la inmunotoxina se administra directamente al sitio del cáncer por vía intratumoral o peritumoral.

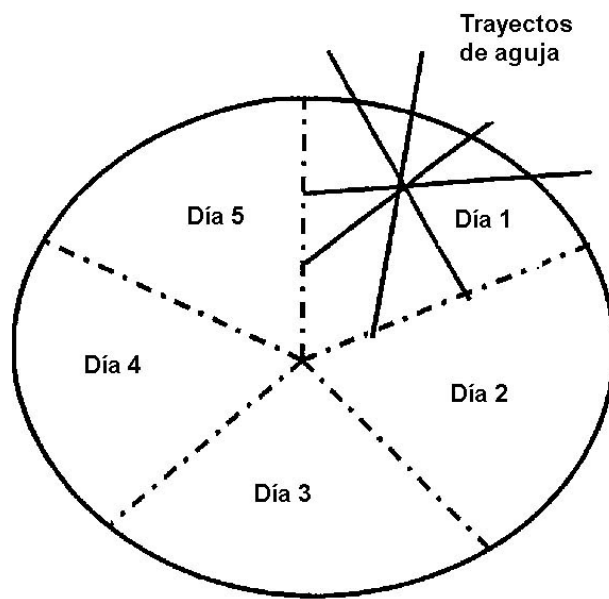


FIGURA 1

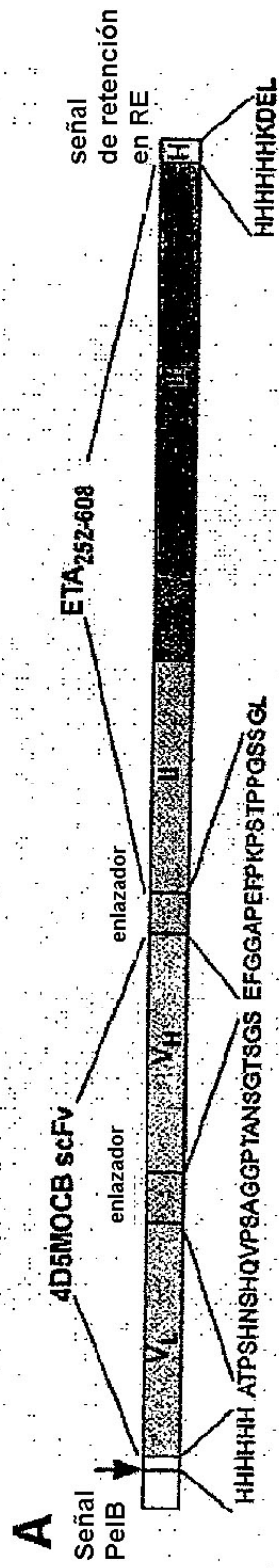


FIGURA 2A

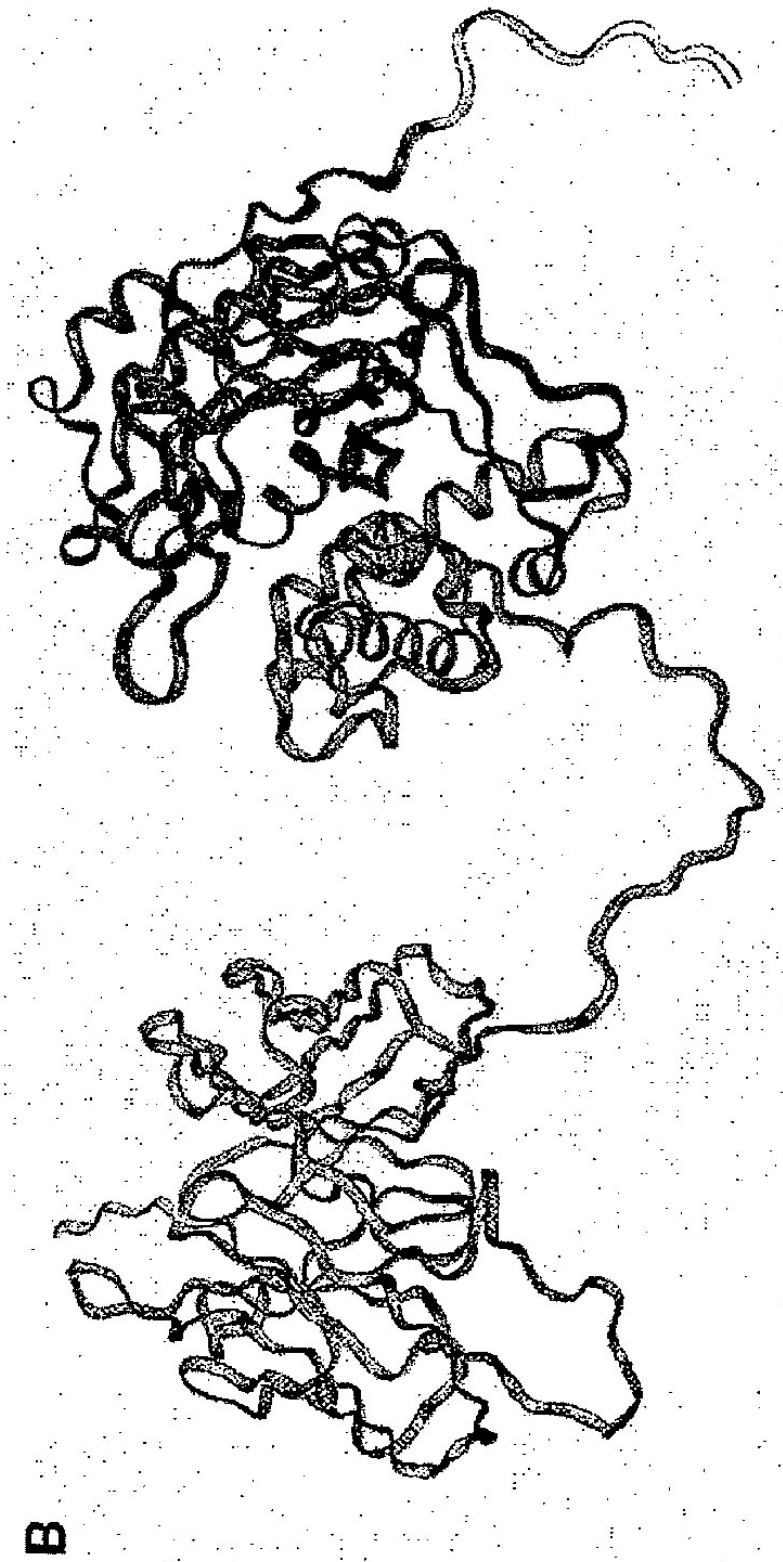


FIGURA 2B

FIGURA 3A

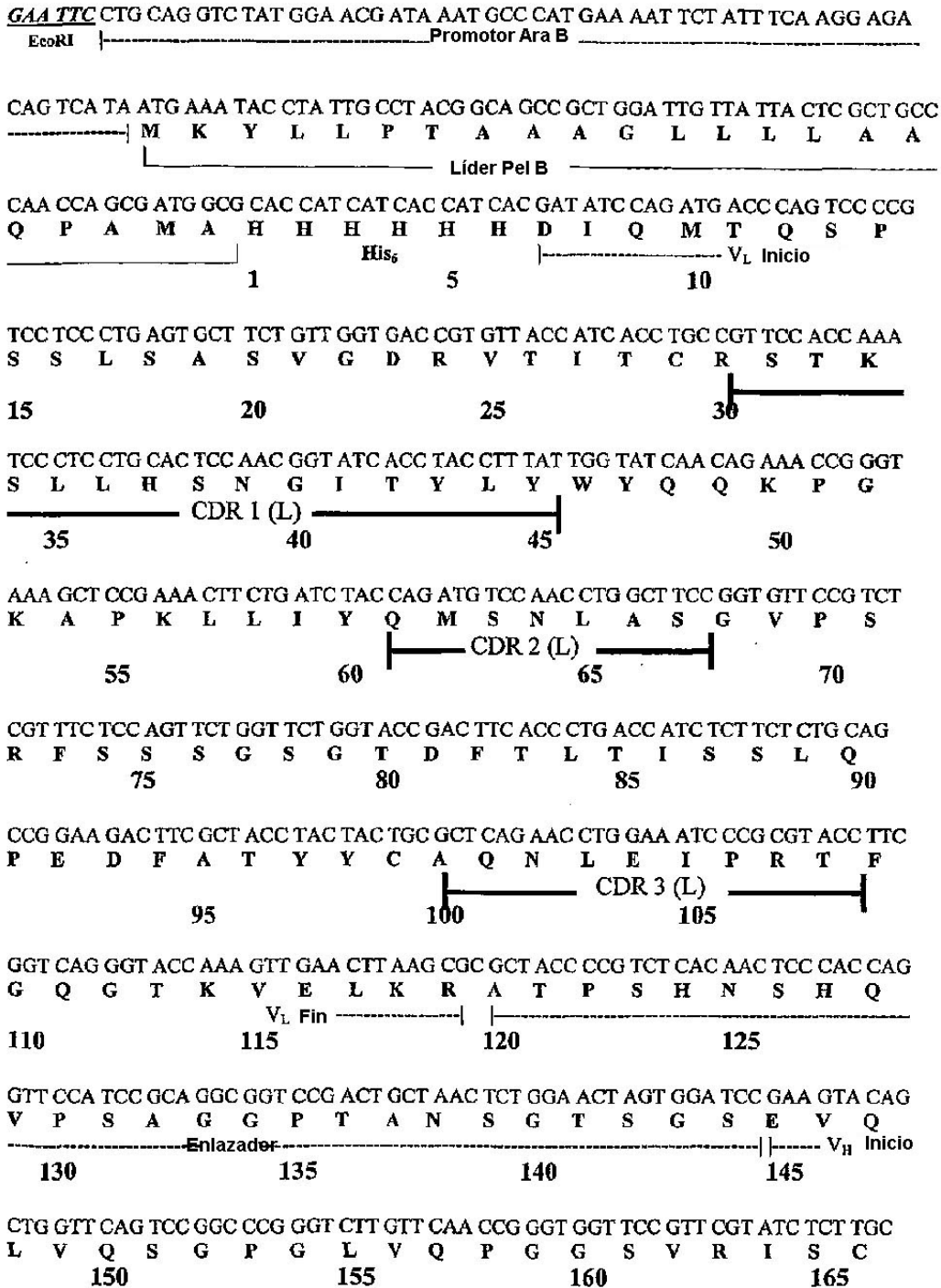


FIGURA 3B

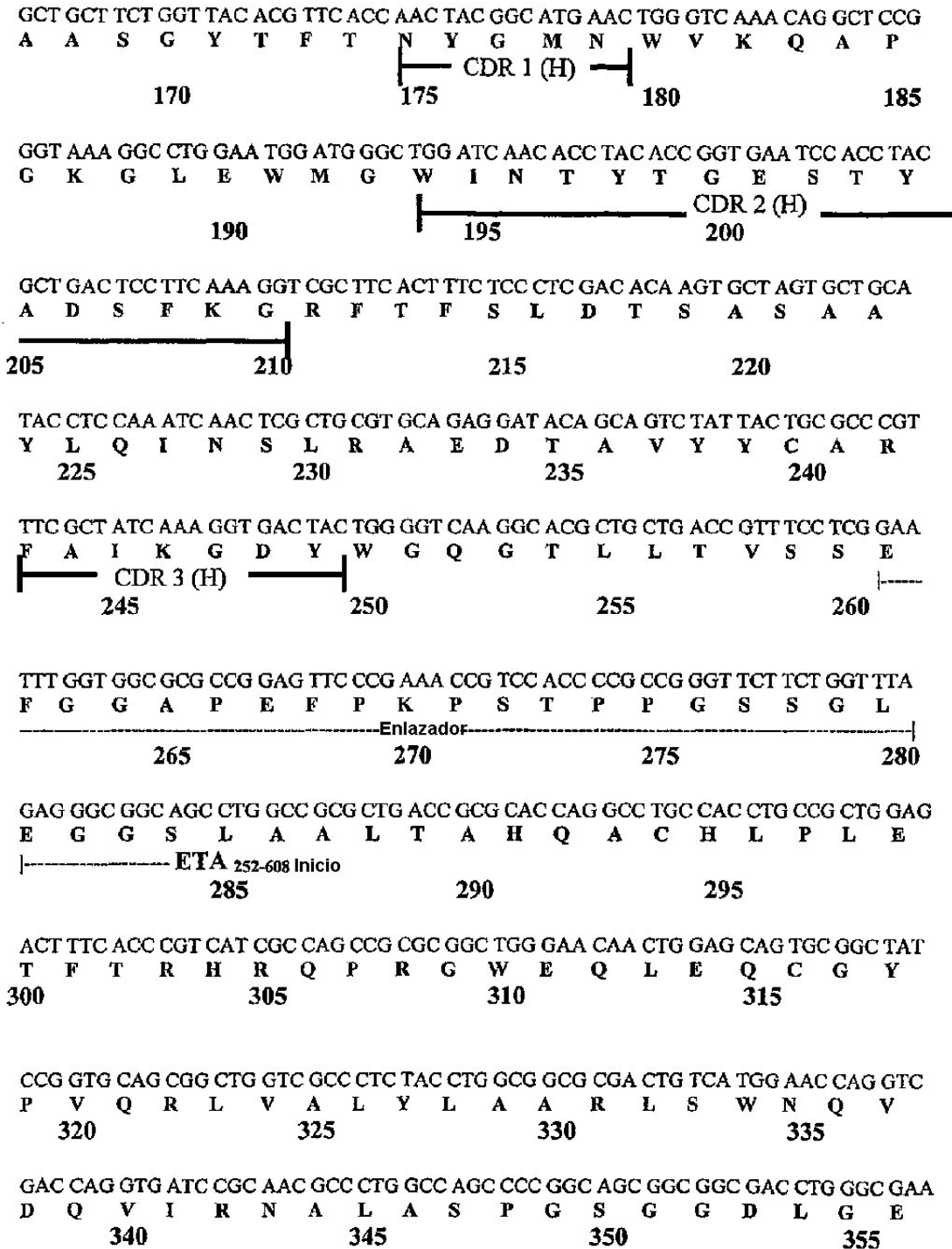


FIGURA 3C

GCG ATC CGC GAG CAG CCG GAG CAG GCC CGT CTG GCC CTG ACC CTG GCC GCC GCC GAG
 A I R E Q P E Q A R L A L T L A A A E
 360 365 370 375

AGC GAG CGC TTC GTC CCG CAG GGC ACC GGC AAC GAC GAG GCC GGC GCG GCC AGC GCC
 S E R F V R Q G T G N D E A G A A S A
 380 385 390

GAC GTG GTG AGC CTG ACC TGC CCG GTC GCC GCC GGT GAA TGC GCG GGC CCG GCG GAC
 D V V S L T C P V A A G E C A G P A D
 395 400 405 410

AGC GGC GAC GCC CTG CTG GAG CGC AAC TAT CCC ACT GGC GCG GAG TTC CTC GGC GAC
 S G D A L L E R N Y P T G A E F L G D
 415 420 425 430

GGT GGC GAC GTC AGC TTC AGC ACC CGC GGC ACG CAG AAC TGG ACG GTG GAG CGG CTG
 G G D V S F S T R G T Q N W T V E R L
 435 440 445 450

CTC CAG GCG CAC CGC CAA CTG GAG GAG CGC GGC TAT GTG TTC GTC GGC TAC CAC GGC
 L Q A H R Q L E E R G Y V F V G Y H G
 455 460 465 470

ACC TTC CTC GAA GCG GCG CAA AGC ATC GTC TTC GGC GGG GTG CGC GCG CGC AGC CAG
 T F L E A A Q S I V F G G V R A R S Q
 475 480 485

GAT CTC GAC GCG ATC TGG CGC GGT TTC TAT ATC GCC GGC GAT CCG GCG CTG GCC TAC
 D L D A I W R G F Y I A G D P A L A Y
 490 495 500 505

GGC TAC GCC CAG GAC CAG GAA CCC GAC GCG CGC GGC CGG ATC CGC AAC GGT GCC CTG
 G Y A Q D Q E P D A R G R I R N G A L
 510 515 520 525

CTG CGG GTC TAT GTG CCG CGC TCC AGC CTG CCG GGC TTC TAC CGC ACC GGC CTG ACC
 L R V Y V P R S S L P G F Y R T G L T
 530 535 540 545

CTG GCC GCG CCG GAG GCG GCG GGC GAG GTC GAA CGG CTG ATC GGC CAT CCG CTG CCG
 L A A P E A A G E V E R L I G H P L P
 550 555 560 565

FIGURA 3D

CTG CGC CTG GAC GCC ATC ACC GGC CCC GAG GAG GAA GGC GGG CGC CTG GAG ACC ATT
 L R L D A I T G P E E E G G R L E T I
 570 575 580

CTC GGC TGG CCG CTG GCC GAG CGC ACC GTG GTG ATT CCC TCG GCG ATC CCC ACC GAC
 L G W P L A E R T V V I P S A I P T D
 585 590 595 600

CCG CGC AAC GTC GGT GGC GAC CTC GAC CCG TCC AGC ATC CCC GAC AAG GAA CAG GCG
 P R N V G G D L D P S S I P D K E Q A
 605 610 615 620

ATC AGC GCC CTG CCG GAC TAC GCC AGC CAG CCC GGC AAA CCG CCG CAT CAC CAC CAT
 I S A L P D Y A S Q P G K P P H H H H
 625 630 635 640
 ETA₂₅₂₋₆₀₈ Fin -----| His₆

CAC CAT AAA GAC GAA CTG TAG TGA CTC GAG
 H H K D E L . . L E
 Xho I
 645 651

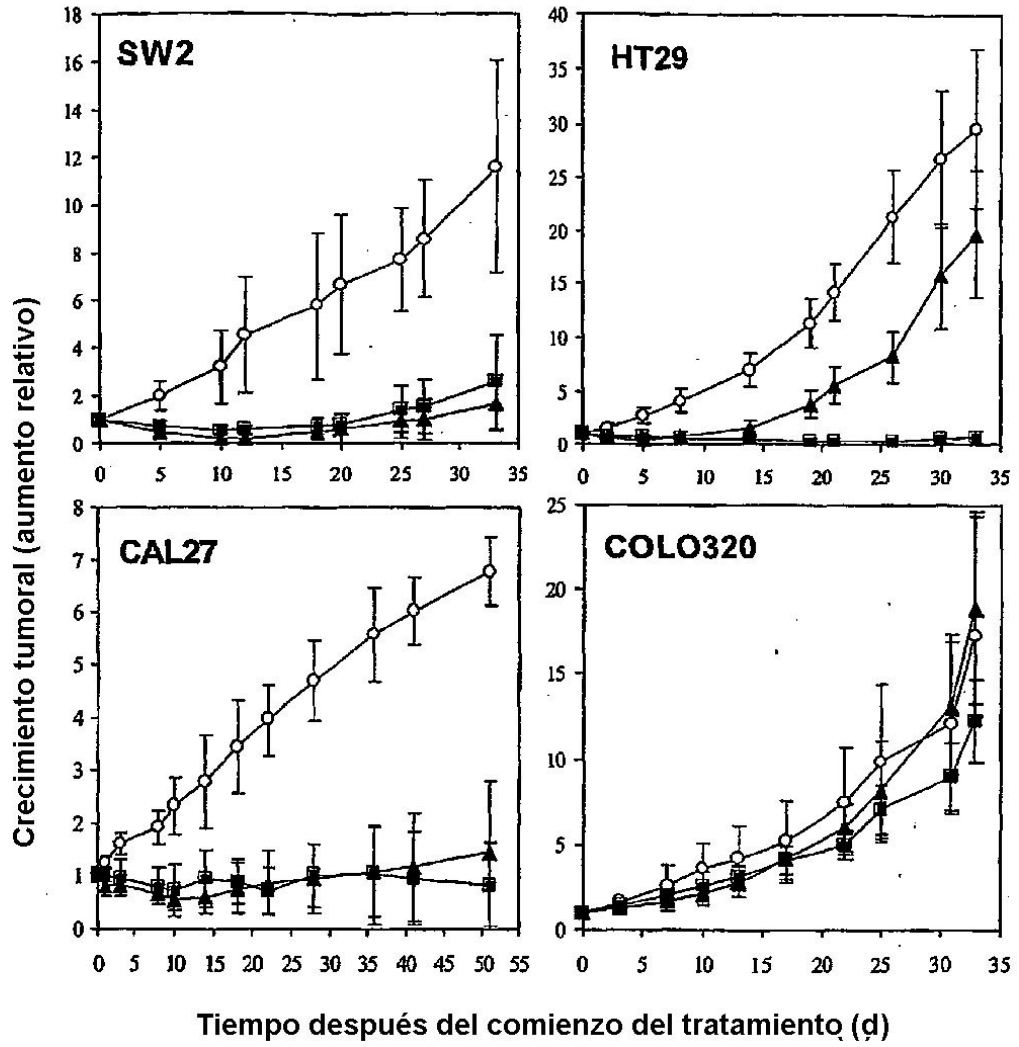


FIGURA 4

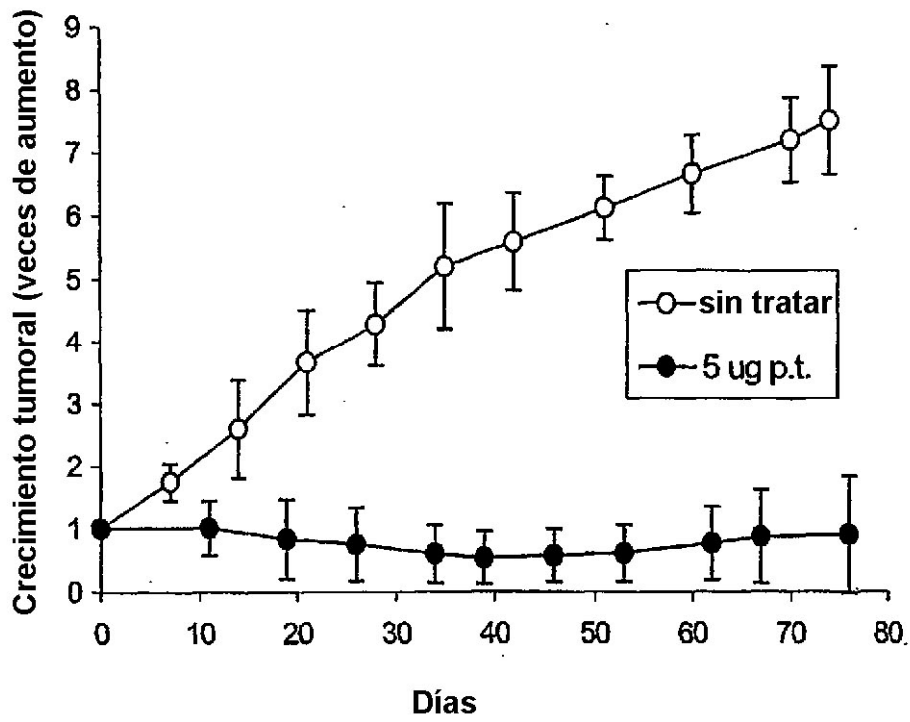


FIGURA 5

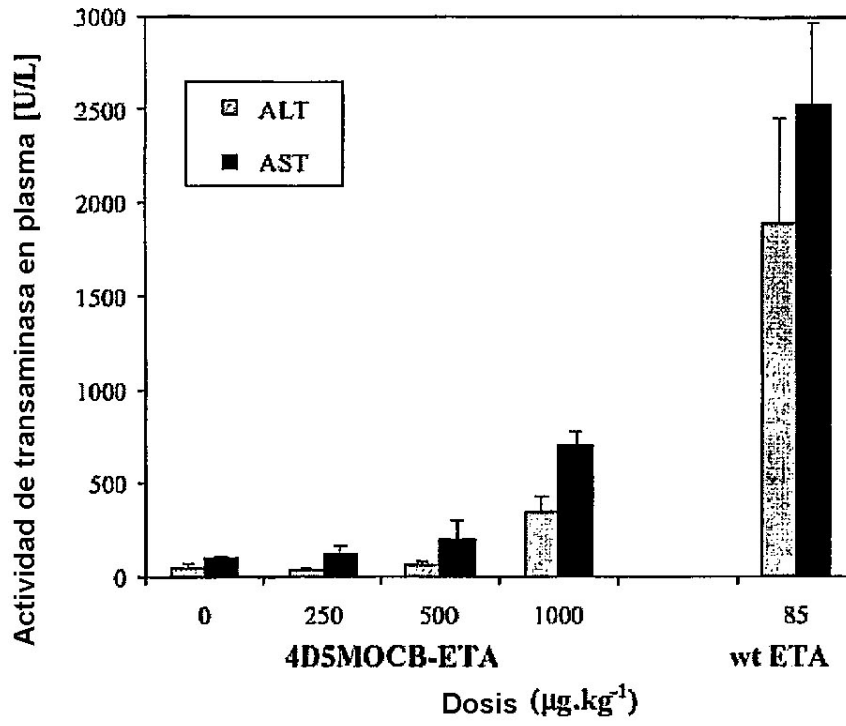


FIGURA 6

Resultados histopatológicos en hígado y bazo inducidos por VB4-845

Los círculos indican el área de hepatocitos necróticos en el grupo de dosis de 20 µg

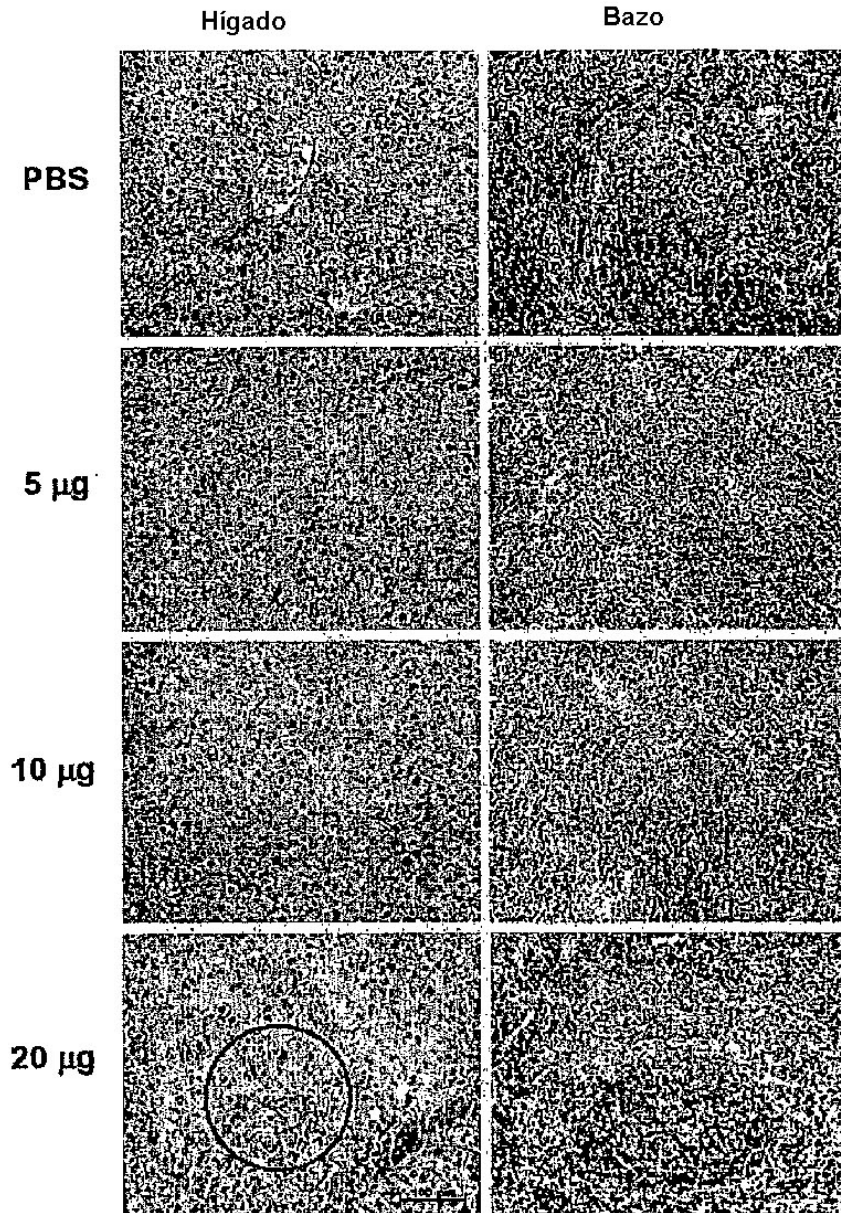


FIGURA 7