(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 790 732**

(51) Int. CI.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 17189537 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3292874**

(54) Título: **Inmunoconjugados de antimesotelina y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

29.04.2009 EP 09005909

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

(73) Titular/es:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH (100.0%)
Alfred-Nobel-Str., 10
40789 Monheim am Rhein, DE

(72) Inventor/es:

KAHNERT, ANTJE;
UNTERSCHEMMANN, KERSTIN;
HEISLER, IRING;
KOPITZ, CHARLOTTE CHRISTINE y
SCHUHMACHER, JOACHIM

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

Inmunoconjugados de antimesotelina y usos de los mismos

La presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo, que tienen especificidad para la proteína mesotelina, y un agente terapéutico. Las composiciones de dichos inmunoconjugados pueden usarse en el tratamiento, prevención o diagnóstico de trastornos relacionados con la mesotelina, por ejemplo cáncer.

Antecedentes de la invención

La aparición de cáncer se asocia con mayor frecuencia al envejecimiento, según lo cual el 65% de todos los casos nuevos de cáncer se registran para pacientes de 65 años de edad y mayores. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en Estados Unidos, superada solo por las enfermedades cardíacas. De hecho, la Sociedad estadounidense del cáncer (American Cancer Society) ha estimado que 1 de cada 4 personas morirán por cáncer en EE.UU., suponiendo que las tasas de mortalidad actuales no se muevan. Solo en EE.UU., se han previsto para 2008 1.437.180 de casos nuevos y 565.650 muertes por cáncer.

Se ha probado que los tratamientos basados en anticuerpos son muy eficaces en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluidos los tumores sólidos. Por ejemplo, HERCEPTIN® se ha usado con éxito para tratar el cáncer de mama. Crucial para el desarrollo de una terapia basada en anticuerpos con éxito es el aislamiento de anticuerpos contra proteínas de superficie celular que se ha descubierto que se expresan de forma preferente sobre las células tumorales. El polipéptido precursor de la mesotelina es una proteína de superficie celular glicosilada anclada por glicofosfatidilinositol (GPI), que se escinde proteolíticamente a un polipéptido N-terminal secretado de 30 kDa y a un polipéptido C-terminal de 40 kDa, que se produce, principalmente, en la forma unida a la membrana anclada por GPI (Chang, K. and I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, (1996) 93(1):136), y que en la presente memoria descriptiva se denomina mesotelina. La mesotelina se expresa preferentemente en ciertas células tumorales, particularmente células de mesotelioma, células de tumores pancreáticos y células de carcinoma ovárico, mientras que su expresión está limitada en los tejidos normales, lo que la convierte en una diana atractiva para el desarrollo de terapias tumorales (Argani, P. *y col.*, Clin. Cancer Res. (2001) 7(12): 3862; Hassan, R., *y col*., Clin. Cancer Res. (2004) 10 (12 Pt 1):3937). La función de la mesotelina es desconocida y no se observaron anomalías reproductoras, hematológicas o anatómicas patentes en ratones deficientes en la expresión del gen de la mesotelina (Bera, T.K. y I. Pastan, Mol. Cell. Biol. (2000) 20(8):2902).

Se ha propuesto una terapia basada en anticuerpos dirigida contra las células de cáncer que expresan mesotelina para el tratamiento del cáncer de pulmón, de ovarios y pancreático. Mab K1 fue el primer anticuerpo contra el polipéptido mesotelina unido a la membrana que se describió (Chang, K., *y col*., Int. J. Cancer, (1992) 50(3):373). Mab K1 se generó mediante inmunización de ratones. Debido a la baja afinidad y las deficientes tasas de internalización del anticuerpo, una inmunotoxina consistente en Mab K1 unida a una forma truncada químicamente modificada de la exotoxina A Pseudomonas no se consideró adecuada para el desarrollo clínico (2000) 23(4):473; Hassan, R., *y col*., Clin. Cancer Res. (2004) 10 (12 Pt 1): 3937). Posteriormente se desarrollaron anticuerpos de cadena sencilla con mayores afinidades, incluido SS1-(dsFv)-PE38, que mostró actividad destructiva de las células tumorales in vitro (Hassan, R., *y col.*, Clin. Cancer Res. (2002) 8(11): 3520) además de potencia en un modelo murino de tumores humanos que expresan mesotelina (Fan, D., *y col*., Mol. Cancer Ther. (2002) 1(8): 595). Estos datos validan la mesotelina como una diana atractiva para desarrollar inmunoterapias para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer. Se ha mostrado que SS1-(dsFv)-PE38 se elimina en sangre rápidamente y se están notificando intentos para incrementar el peso molecular mediante pegilación de la proteína de fusión (Filpula, D., *y col.*, Bioconjugate Chem. (2007) 18(3): 773).

MS-1, MS-2 y MS-3 son anticuerpos de unión a la mesotelina que provocan una actividad efectora inmunitaria en la superficie de la célula debido a su isotipo de la IgG1 humana y la internalizan en células que expresan mesotelina (documento WO 2006/099141 A2). En la actualidad se está investigando uno de estos anticuerpos, el anticuerpo IgG1 antimesotelina no conjugado y quimérico (ratón/hombre) MORAb 009 en un estudio clínico para determinar los efectos terapéuticos en el tratamiento del cáncer pancreático. El mecanismo de acción que se ha postulado de MORAb 009 desencadena funciones efectoras inmunitarias, tales como ADCC y bloqueo de función.

Nuevas terapias con mejor potencia para luchar contra los cánceres agresivos, tales como los cánceres ovárico, pancreático y pulmonar, son altamente deseables y representarían un avance en la técnica. Como tal, la presente invención divulga nuevas composiciones inmunoconjugadas que son útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de trastornos relacionados con la mesotelina, por ejemplo cáncer.

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a inmunoconjugados que comprenden anticuerpos, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen a la mesotelina, que están conjugados con agentes citotóxicos, por ejemplo maitansinoides, o sus derivados, y/o se coadministran o formulan con uno o más agentes anticancerosos adicionales. Los inmunoconjugados de la invención se pueden usar para tratar y/o diagnosticar y/o monitorizar los trastornos relacionados con la mesotelina, por ejemplo cáncer.

Es un objeto de la divulgación proporcionar inmunoconjugados que comprenden anticuerpos, o sus fragmentos de unión al antígeno, o variantes de los mismos, que son altamente selectivos de la parte extracelular C-terminal de 40 kDa del polipéptido precursor de la mesotelina, y se unen a la mesotelina en presencia del antígeno del cáncer 125 (CA125; MUC16), y un resto efector. Las propiedades concretas de los anticuerpos frente a la mesotelina se ha descrito en el documento WO 2009/068204 A1, y en un aspecto de la invención, la combinación de su capacidad concreta para inmunorreaccionar de forma específica con la mesotelina en presencia de CA125 en combinación con un agente citotóxico, que es un maitansinoide, la conjugación proporciona mejor eficacia sobre los anticuerpos de bloqueo de función, que compiten con CA125 por la unión a la mesotelina.

En un aspecto, los anticuerpos, o sus fragmentos, de la invención son anticuerpos IgG o fragmentos de IgG. Los anticuerpos o fragmentos también pueden ser anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA, o IgM, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')2, fragmentos scFv, fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos bioespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos quiméricos (por ejemplo, que comprenden una estructura de anticuerpo humano injertado con una región de unión de anticuerpos humanos o no humanos, o una estructura de anticuerpo no humano injertado con una región de unión de anticuerpo humano o no humano). Los anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, regiones estructurales de anticuerpos de fuentes no humanas, tales como, por ejemplo, de vaca, ratón, llama, camello o conejo. Información adicional sobre la ingeniería de anticuerpos se puede encontrar en la bibliografía, por ejemplo, Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, (Sep, 2005) 23: 1126-1136. Los fragmentos mencionados en lo que antecede se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina o producirse por un medio adecuado, por ejemplo expresión recombinante, en una forma de fragmento.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención también se pueden humanizar, en los que las secuencias o regiones CDR (por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3) pueden ser no humanas, por ejemplo murinas.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, o composiciones que incluyen los anticuerpos o los fragmentos, pueden incluir un agente citotóxico que está conjugado con un anticuerpo o un fragmento del mismo. El agente citotóxico es un maitansinoide. La materia objeto no abarcada por el ámbito de las reivindicaciones no forma parte de la invención. Las composiciones de la invención pueden incluir, además de los anticuerpos y fragmentos (con o sin los agentes citotóxicos conjugados mencionados en lo que antecede) varios agentes anticancerosos, que pueden incluir, por ejemplo, bleomicina, docetaxel (Taxotere), doxorubicina, edatrexato, erlotinib (Tarceva), etopósido, finasterida (Proscar), flutamida (Eulexin), gemcitabina (Gemzar), genitinib (Lrresa), acetato de goserelina (Zoladex), granisetrón (Kytril), imatinib (Gleevec), irinotecán (Campto/Camptosar), ondansetrón (Zofran), paclitaxel (Taxol), pegaspargasa (Oncaspar), pilocarpina clorhidrato (Salagen), porfimer sódico (Photofrin), interleucina-2 (Proleukin), rituximab (Rituxan), topotecán (Hycamtin), trastuzumab (Herceptin), Triapin, tartrato de vincristina y de vinorelbinA (Navelbine), o anticuerpos terapéuticos o fragmentos de los mismos, o agente antiangiogénico, tal como, por ejemplo, angiostatina, bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos o péptidos anti-VEGF, anticuerpos o péptidos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk-1, anticuerpos o péptidos anti-Fit- 1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteinasa tisular, interferones, interleucina 12, IP-IO, Gro-β, trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CMlOl, Marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2, interferón alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4 o minociclina.

La presente invención además proporciona, en otro aspecto, inmunoconjugados para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno relacionado con la mesotelina mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los inmunoconjugados de la invención, o las composiciones de la invención que incluyen los inmunoconjugados de la invención. El trastorno relacionado con la mesotelina puede incluir, por ejemplo, cáncer, tal como, cáncer de tumor sólido. El tumor sólido puede estar, u originarse en, ovarios, páncreas, tracto respiratorio, pulmón, colon, estómago, esófago, cuello uterino, hígado, mama, cabeza y cuello.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la eficacia antitumoral del inmunoconjugado antimesotelina MF-T-SPDB-DM4 en células de carcinoma de páncreas humano transfectadas con mesotelina en un modelo de xenoinjerto (A) transfectado con mesotelina, así como en tumores control no transfectados (B).

La figura 2 muestra la eficacia antitumoral de los inmunoconjugados antimesotelina con ligantes estables y fragmentables, así como polares y no polares, en un modelo de xenoinjerto HeLaMATU con células de carcinoma que expresan mesotelina de forma endógena,

La figura 3 muestra la eficacia antitumoral de los inmunoconjugados antimesotelina con ligantes estables y fragmentables, así como polares y no polares, en un modelo de xenoinjerto (A) transfectado con mesotelina así como en tumores control no transfectados (B).

La figura 4 muestra un ejemplo de una curva de respuesta a la dosis de toxicidad a MF-T-SPDP-DM4 en células

HelaMatu positivas a mesotelina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos inmunoconjugados que son específicos de la mesotelina, o que tienen una elevada afinidad por ella, y pueden impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Los inmunoconjugados de la invención se pueden usar en muchos contextos, que se describen más completamente en la presente memoria descriptiva.

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el significado que un experto en la técnica, a la que esta invención pertenece, entiende habitualmente. No obstante, las referencias siguientes pueden proporcionar a un experto en la técnica a la que atañe la presente invención una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención y puede hacerse referencia a ellas y usarse siempre que dichas definiciones sean consistentes con el significado habitualmente comprendido en la técnica. Dichas referencias incluyen, entre otras, Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991); y Lackie y col., The Dictionary of Cell & Molecular Biology (3ª ed. 1999); y Cellular and Molecular Immunology, Eds. Abbas, Lichtman y Pober, 2ª Edición, W.B. Saunders Company. Se puede consultar cualquier recurso técnico adicional disponible para el experto en la técnica que proporcione definiciones de términos usados en la presente memoria descriptiva que tengan el significado habitualmente entendido en la técnica. Para los fines de la presente invención, los términos siguientes se definen con más profundidad. Términos adicionales se definen en otra parte de la descripción. Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas “uno”, “una” “la“ y “el" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un gen” es una referencia a uno o más genes e incluye equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “anticuerpo” incluye moléculas de inmunoglobulina (por ejemplo, cualquier tipo, incluidas las IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY, y/o cualquier clase, incluidas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e Ig A2) aisladas de la naturaleza o preparadas por medios recombinantes. Con anticuerpos también se pretende abarcar los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, tales como Fab, F(ab')2, scFv (Fv de cadena sencilla), Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, que se preparan a partir de inmunoglobulinas intactas o por medios recombinantes.

Los anticuerpos y/o los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno de la presente invención pueden ser monoespecíficos (por ejemplo, monoclonales), biespecíficos, triespecíficos o de multiespecificidad mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos de diferentes epítopos de un antígeno o pueden ser específicos de epítopos de más de un antígeno. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, y col., 1991, J. Immunol. 147:60 69; las patentes de EE.UU. nº 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny y col., 1992, J. ImmunoL 148:1547 1553.

Los fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno pueden comprender la(s) región/regiones variable(s) solo o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: regiones bisagra, dominios CH1, CH2, CH3 y CL. En la invención también están incluidos los fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno que comprenden cualquier combinación de región/regiones variable(s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2, CH3 y CL.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno son humanos o humanizados. Como se usa en la presente memoria descriptiva, anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas, de linfocitos B humanos, o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.939.598 de Kucherlapati y col. El término anticuerpo también se extiende a otras estructuras proteicas que pueden orientar los insertos de CDR de los anticuerpos hacia la misma conformación de unión activa que la que se encuentra en los anticuerpos naturales, de modo que dicha unión del antígeno diana observada con estas proteínas quiméricas se mantiene respecto a la actividad de unión del anticuerpo natural del que derivaron las CDR. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región hipervariable (por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad, “CDR”) del receptor son sustituidos por residuos de la región hipervariable (CDR) de una especie no humana (anticuerpo del donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana pueden reemplazarse por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones se realizan para perfeccionar más el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, o normalmente

dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado puede también comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para una revisión, véanse Jones, y col., (Nature 321:522-525, 1986); Reichmann, y col., (Nature 332:323-329, 1988); y Presta, (Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992). La preparación de anticuerpos humanizados se puede encontrar en las patentes de EE.UU. nº 7.049.135, 6.828.422, 6.753.136, 6.706.484, 6.696.248, 6.692.935, 6.667.150, 6.653.068, 6.300.064, 6.294.353 y 5.514.548.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “Fv de cadena sencilla” o fragmentos de anticuerpos “sFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un ligante polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que la sFV forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión, véase Pluckthun (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Vol. 113, Rosenburg y Moore eds. Springer- Verlag, New York, pp. 269- 315, 1994).

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligante que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger, y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993).

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a los anticuerpos descritos en la técnica, en, por ejemplo, Zapata, y col., (Protein Eng. 8(10): 1057-1062, 1995). Brevemente, dichos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CHI-VH- CHI) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecificos.

El término “anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir anticuerpos individuales 10 que comprenden una población idéntica excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, es decir están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler, y col., (Nature 256:495, 1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante {véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales pueden también aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col., (Nature 352:624-628,1991) y Marks, y col., (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria descriptiva también incluyen anticuerpos “quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “muestra biológica”, o “muestra de un paciente” como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una muestra obtenida de un organismo o de componentes (por ejemplo, células) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico. La muestra puede ser una “muestra clínica”, que es una muestra derivada de un paciente. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, esputo, sangre, suero, plasma, células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos), muestras de tejido, muestras de biopsia, orina, fluido peritoneal y fluido pleural, saliva, semen, exudado de mama, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, linfa, citosoles, ascitis, líquido amniótico, lavados vesicales y lavados bronquioalveolares o células de los mismos, entre otras muestras de fluidos corporales. Las muestras de pacientes pueden ser frescas o congeladas, y pueden tratarse con heparina, citrato o EDTA. Las muestras biológicas pueden también incluir secciones de tejidos, tales como secciones congeladas tomadas con fines histológicos.

El término “cáncer” incluye, pero no se limita a, tumores sólidos, tales como cáncer de páncreas, mama, del tracto respiratorio, cerebral, de órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, ocular, de hígado, de piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides, y sus metástasis distantes. El término también incluye sarcomas, linfomas, leucemias y mielomas de células plasmáticas.

Los tumores del aparato respiratorio incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas (microcítico y amicrocítico), así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar. Los tumores de mama incluyen, pero no se limitan a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ. Los tumores cerebrales incluyen, pero no se limitan a, glioma hipoftálmico y del tallo encefálico, astrocitoma cerebelar y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como tumores neuroectodérmicos y de la glándula pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de endometrio, cervical, de ovarios, vaginal y vulvar, así como el sarcoma del útero. Los tumores del aparato digestivo incluyen, pero no se limitan a, cáncer anal, de colon, colorrectal, esofágico, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivares. Los tumores del aparato urinario incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, de pene, renal, de pelvis renal, de uréter y de uretra. Cánceres oculares incluyen, pero no se limitan a, melanoma intraocular y retinoblastoma. Tumores del hígado incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular (carcinomas de células hepáticas con o sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel distinto al melanoma. Los cáncer de cabeza y cuello incluyen, pero no se limitan a, el cáncer de laringe/ hipofaringe / nasofaringe / orofaringe, y el cáncer de cavidad oral y labios. Los linfomas incluyen, pero no se limitan a, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a, el sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, el histiocitoma fibroso maligno, el linfosarcoma y el rabdomiosarcoma. Las leucemias incluyen, pero no se limitan a, entre otras, la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mielógena crónica y la leucemia de células peludas.

Como se usa en la presente divulgación, el término “epítopo” significa cualquier determinante antigénico localizado sobre un antígeno, por ejemplo la proteína mesotelina, al que el anticuerpo se une a través de un sitio de unión antigénico. Los determinantes o determinantes antigénicos normalmente constan de grupos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas.

El término “específicamente inmunorreactivo” se refiere a una reacción de unión entre un anticuerpo y una proteína, compuesto o antígeno, que tiene un epítopo reconocido por el sitio de unión antigénico del anticuerpo. Esta reacción de unión es determinante de la presencia de una proteína, antígeno o epítopo que tiene el epítopo reconocido entre la presencia 10 de una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. En el contexto de un inmunoensayo, los anticuerpos específicamente inmunorreactivos se pueden unir a una proteína que tenga el epítopo reconocido y unirse, si lo hacen, en un grado detectablemente menor, a otras proteínas que carezcan del epítopo que estén presentes en la muestra. En un contexto in vivo, "específicamente inmunorreactivo" se puede referir a las condiciones en las que un animal forma una respuesta inmunitaria contra una vacuna o antígeno, por ejemplo una respuesta humoral al antígeno (la producción de anticuerpos contra una vacuna, proteína o compuesto o antígeno presentado a los mismos en condiciones inmunológicamente reactivas) o una respuesta mediada por células (también denominada en la presente memoria descriptiva “respuesta inmunitaria celular”, es decir una respuesta mediada por los linfocitos T contra la vacuna, proteína, compuesto o antígeno presentado a los mismos). Como se usa en la presente memoria descriptiva "condiciones inmunológicamente reactivas” se usa en el contexto de un inmunoensayo o una reacción in vitro, en las que las condiciones físicas de la reacción, incluidas, por ejemplo, la temperatura, la concentración de sales, el pH, los reactivos y sus concentraciones, y las concentraciones del antígeno y del anticuerpo conocido que es específicamente inmunorreactivo frente al antígeno, se proporcionan o ajustan para permitir la unión del anticuerpo conocido al antígeno. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión al anticuerpo y, normalmente, son éstas las utilizadas en los protocolos de inmunoensayo. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo. El término “paciente” o “sujeto”, como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye mamíferos (por ejemplo, seres humanos y animales).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “unión invariable” de un anticuerpo concreto a la mesotelina se refiere a su capacidad para unirse a la mesotelina en un amplio abanico de líneas de células cancerosas que expresan mesotelina, que expresan diferentes formas de mesotelina. La unión invariable puede deberse, pero no se restringe a, al hecho de que los anticuerpos, o sus fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, o sus variantes, reconocen un epítopo de mesotelina que no está enmascarado por otro antígeno extracelular, tal como el antígeno canceroso 125 (CA125), que interacciona con la mesotelina. Para los anticuerpos de unión invariable, los valores de CE50 determinados mediante valoración por FACS en dos líneas de células cancerosas distintas podrían diferir en no más de 10 veces o, preferentemente, 5 veces, y más preferentemente entre 1 y 3 veces.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “inmunoconjugado” se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, unido a un agente citotóxico, por ejemplo a un maitansinoide o a un derivado del mismo, preferentemente mediante un grupo de unión adecuado o un precursor del mismo.

Inmunoconjugados de la invención

La invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico y un anticuerpo humano o humanizado, en el que dicho anticuerpo comprende: i) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 23 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 27, o ii) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 24 o iii) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 21 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 25 y en el que el agente citotóxico es un maitasinoide.

La presente invención se refiere a inmunoconjugados para su uso en procedimientos para inhibir el crecimiento de células de cáncer positivas a mesotelina y la progresión de la enfermedad neoplásica proporcionando inmunoconjugados antimesotelina. Los restos de anticuerpo de los inmunoconjugados proporcionados son específicamente inmunorreactivos al dominio C-terminal de 40 kDa del polipéptido precursor de mesotelina (SEQ ID NO: 36), que, en la presente memoria descriptiva, se denomina "mesotelina".

Los maitansinoides que se pueden usar en la presente invención son bien conocidos en la técnica y se pueden aislar a partir de fuentes naturales de acuerdo con procedimientos conocidos o prepararse de forma sintética de acuerdo con procedimientos conocidos.

Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Ejemplos análogos de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

Ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) C-19-decloro (patente de EE.UU. nº 4.256.746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-decloro (patentes de EE.UU. nº 4.361.650 y 4.307.016) (preparado mediante desmetilación usando Streptomyces o Actinomyces o decloración usando LAH); y

(3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (patente de EE.UU. nº 4.294.757) (preparados mediante afiliación usando cloruros de acilo).

Ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen modificaciones en otras posiciones incluyen:

(1) C-9-SH (patente de EE.UU. nº 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H2S o P2S5);

(2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH2OR) (patente de EE.UU. nº 4.331.598);

(3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH2OH o CH2OAc) (patente de EE.UU. nº 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia);

(4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. nº 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol mediante Streptomyces);

(5) C-15-metoxi (patentes de EE.UU. nº 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora);

(6) C-18-N-desmetilo (patentes de EE.UU. nº 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol mediante Streptomyces); y

(7) 4,5-desoxi (patente de EE.UU. nº 4.371.533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

La síntesis de maitansinoides que contienen tiol útiles en la presente invención se desvela completamente en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064 y 7.276.497.

Cabe esperar que todos los maitansinoides con un resto tiol en la posición C-3, la posición C-14, la posición C-15 o la posición C-20 sean útiles. Se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida. También se prefiere el maitansinoide con resto tiol en C-3 que contiene N-metil-alanina y un maitansinoide con resto tiol en C-3 que contiene N-metil-cisteína, y los análogos de cada uno. Maitansinoides preferidos son los que se describen en las patentes de EE.UU. 5.208.020; 5.416.064; 6.333.410; 6.441.163; 6.716.821; RE39.151 y 7.276.497, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia. En una forma de realización preferida, el maitansinol preferido se selecciona de N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1, CAS nº reg. 139504-50-0), N2'-deacetil-N2'-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3, CAS nº reg. 796073-54-6), y N2'-deacetil-N2'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4 CAS nº reg. 796073-69-3).

A lo largo del presente documento se hace referencia a los siguientes anticuerpos representativos de la invención: "MF-J", "MOR06640", "MF-226" y "MF-T". MF-J representa un anticuerpo que tiene una región variable pesada correspondiente a la SEQ ID NO: 28 (ADN)/SEQ ID NO: 20 (proteína) y una región variable ligera correspondiente a la SEQ ID NO: 32 (ADN)/SEQ ID NO: 24 (proteína). MOR 06640 representa un anticuerpo que tiene una región variable pesada correspondiente a la SEQ ID NO: 29 (ADN)/SEQ ID NO: 21 (proteína) y una región variable ligera

correspondiente a la SEQ ID NO: 33 (ADN)/SEQ ID NO: 25 (proteína). MF-226 representa un anticuerpo que tiene una región variable pesada correspondiente a la SEQ ID NO: 30 (ADN)/SEQ ID NO: 22 (proteína) y una región variable ligera correspondiente a la SEQ ID NO: 34 (ADN)/SEQ ID NO: 26 (proteína). MF-T representa un anticuerpo que tiene una región variable pesada correspondiente a la SEQ ID NO: 31 (ADN)/SEQ ID NO: 23 (proteína) y una región variable ligera correspondiente a la SEQ ID NO: 35 (ADN)/SEQ ID NO: 27 (proteína).

En un aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados que son específicamente inmunorreactivos a la mesotelina en presencia del antígeno canceroso 125 (CA 125/MUC 16) y, por tanto, están dirigidos de forma eficiente a células de cáncer que expresan tanto mesotelina como CA125, por ejemplo células OVCAR-3.

En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados que tienen una región de unión al antígeno que es específicamente inmunorreactiva, o que tiene afinidad elevada por ellas, a una o más regiones de la mesotelina, cuya secuencia de aminoácidos se representa por la SEQ ID NO:: 36. Se dice que un inmunoconjugado tiene una “afinidad elevada” por un antígeno si la medición de la afinidad es de al menos 100 nM (afinidad monovalente del fragmento Fab). Preferentemente, un inmunoconjugado de la invención puede ser específicamente inmunorreactivo a la mesotelina con una afinidad inferior a aproximadamente 100 nM, más preferentemente inferior a aproximadamente 60 nM, y todavía más preferentemente inferior a aproximadamente 30 nM. Son además preferentes anticuerpos que se unen a la mesotelina con una afinidad inferior a aproximadamente 10 nM, y más preferentemente inferior a aproximadamente 3 nM. Por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo de la invención contra la mesotelina puede ser de aproximadamente 9,1 o 0,9 nM (afinidad monovalente del formato IgG1).

Procedimientos de uso

El término “tratamiento” incluye cualquier procedimiento, acción, aplicación, terapia o similar, en el que a un sujeto (o paciente), incluido un ser humano, se le proporciona ayuda médica con el objeto de mejorar la afección del sujeto, directa o indirectamente, o ralentizar la progresión de una afección, o trastorno en el sujeto, o aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en tratamiento.

El término “terapia de combinación” o “coterapia” quiere decir la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una enfermedad, afección y/o trastorno. Dicha administración abarca la coadministración de dos o más agentes terapéuticos de un modo sustancialmente simultáneo, tal como en una única cápsula que tiene una proporción fija de ingredientes activos, o en múltiples cápsulas distintas para cada agente inhibidor. Además, dicha administración abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de forma secuencial. El orden de administración de dos o más agentes terapéuticos coadministrados de forma secuencia no está limitado. La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” quiere decir la cantidad de cada agente administrado que alcanzará el objetivo de mejora de la gravedad de una enfermedad, afección y/o trastorno, y/o sus síntomas, mientras que evita o minimiza los efectos secundarios adversos asociados con el tratamiento terapéutico administrado.

El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el artículo sujeto es adecuado para usar en un producto farmacéutico.

Cabe esperar que los inmunoconjugados de la presente invención sean valiosos como agentes terapéuticos. De acuerdo con esto, una forma de realización de la presente invención incluye inmunoconjugados para su uso en un procedimiento para tratar varias afecciones en un paciente (incluidos mamíferos), que comprende administrar a dicho paciente una composición que contiene una cantidad de un inmunoconjugado de la invención que es efectiva en el tratamiento de la afección diana.

Los inmunoconjugados de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o prevención de enfermedades y/o comportamientos que están asociados con la proteína mesotelina. Estas enfermedades y/o comportamientos incluyen, por ejemplo, cáncer, tal como carcinomas de páncreas, ovarios, estómago, esófago, cuello uterino, colon, hígado, aparato respiratorio y pulmones. La presente invención también se refiere a procedimientos de alivio de síntomas de un trastorno en el que la mesotelina está elevada o, de otro modo, se expresa de forma anormal. Estos trastornos incluyen, sin limitación, carcinomas de páncreas, ovario, estómago, esófago, cuello uterino, colon, hígado, aparato respiratorio y pulmones (véase, por ejemplo, (Liao, Cancer Res. 57:2827-2831, 1997; Turner, Hum. Pathol. 28:740-744, 1997; Liao, y col., Am. J. Pathol. 145:598-609, 1994; Saarnio, y col., Am. J. Pathol. 153:279-285, 1998; Vermylen, y col., Eur. Respir. J. 14:806-811, 1999). En una forma de realización de la invención, una dosis terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado de la invención se administra a un paciente que tenga un trastorno en el que la mesotelina está elevada.

Los inmunoconjugados de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un inmunoconjugado de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos, así como la administración del inmunoconjugado de la presente invención y cada agente terapéutico en su propia formulación de dosificación farmacéutica aparte. Por ejemplo, un inmunoconjugado de la presente invención y un agente terapéutico se pueden administrar al paciente juntos en una única composición de dosificación oral o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación oral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación distintas, el inmunoconjugado de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse

esencialmente al mismo tiempo (por ejemplo, de forma concurrente) o a tiempos separados escalonados (por ejemplo, secuencialmente). El orden de administración del agente no está limitado.

Por ejemplo, en un aspecto, la coadministración de un inmunoconjugado antimesotelina de la invención junto con uno o más agentes anticancerosos para potenciar el efecto del inmunoconjugado antimesotelina o el(los) agente(s) anticanceroso(s) o ambos se contempla para usar en el tratamiento de trastornos relacionados con la mesotelina, tales como cáncer. Dichas terapias de combinación también pueden usarse para prevenir el cáncer, la recurrencia del cáncer, prevenir la diseminación o metástasis de un cáncer o reducir o aliviar los síntomas asociados con el cáncer.

El o los agentes anti-cancerosos pueden incluir cualquier compuesto conocido y adecuado en la técnica, tal como, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, otros inmunoterapéuticos, vacunas contra cáncer, agentes anti-angiogénicos, citocinas, terapias hormonales, terapias génicas y radioterapias. Un agente químico (o "agente anticanceroso" o "agente antitumoral o agente terapéutico contra el cáncer") se refiere a cualquier molécula o compuesto que ayuda en el tratamiento de un cáncer. Ejemplos de agentes químicos contemplados por la presente invención incluyen, entre otros, citosina arabinósido, taxoides (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), agentes anti-tubulina (p.ej., paclitaxel, docetaxel, epotilona B, o sus análogos), macrólidos (por ejemplo, rizoxina) cisplatino, carboplatino, adriamicina, tenopósido, mitozantron, discodermolida, eleuterobina, 2- clorodesoxiadenosina, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis- diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, tiotepa), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, flavopiridol, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozolamida), asparaginasa, bacilos de Calmette y de Guerin, toxina diftérica, hexametilmelamina, hidroxiurea, LYSODREN.RTM., análogos nucleosídicos, alcaloides vegetales (por ejemplo, Taxol, paclitaxel, camptotecina, topotecán, irinotecán (CAMPTOSAR, CPT-I l), vincristina, alcaloides de la vinca (tales como vinblastina), podofilotoxina (incluidos los derivados, tales como epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), VM-26 (tenipósido)), citocalasina B, colchicina, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, procarbazina, mecloretamina, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina), doxorubicina, doxorubicina liposomal), dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, agentes antimitóticos, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador del plasminógeno tisular, aldesleukina, alutamina, anastrozol, bicalutamida, biaomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, clorambucilo, cladribina, citarabina, dactinomicina, estramustina, floxuridina, gemcitabina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, leuprólido, acetato, levamisol, lomustina, mecloretamina, megestrol, acetato, mercaptopurina, mesna, mitotane, pegaspergasa, pentostatina, picamyein, rituximab, campath-1, estraptozocina, tioguanina, tretinoína, vinorelbina, o cualquier fragmento, miembros de la familia o sus derivados, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables. Las composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP) también se contemplan en la presente invención. FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona.

El agente quimioterapéutico puede ser un agente antiangiogénico, tal como, por ejemplo, angiostatina, bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos o péptidos anti-VEGF, anticuerpos o péptidos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk- 1, anticuerpos o péptidos anti-Fit- 1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteinasa tisular, interferones, interleucina 12, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CMIOl, Marimastat, pentosán polisulfato, angiopoyetina 2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento 16K de prolactina, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM- 1470, factor plaquetario 4 o minociclina.

En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es gemcitabina a una dosis que varía de 100 a 1000 mg/m^2/ciclo En una forma de realización, dicho agente quimioterapéutico es dacarbazina a una dosis que varía de 200 a 4.000 mg/m^2/ciclo. En otro aspecto, dicha dosis varía de 700 a 1000 mg/m^2/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es fludarabina a una dosis que varía de 25 a 50 mg/m^2/ciclo En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es citosina arabinósido (Ara-C) a una dosis que varía de 200 a 2.000 mg/m^2/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es docetaxel a una dosis que varía de 1,5 a 7,5 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es paclitaxel a una dosis que varía de 5 a 15 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es cisplatino a una dosis que varía de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo a una dosis que varía de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es doxorubicina a una dosis que varía de 2 a 8 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es epipodofilotoxina a una dosis que varía de 40 a 160 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es ciclofosfamida a una dosis que varía de 50 a 200 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es irinotecán a una dosis que varía de 50 a 150 mg/m^2/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es vinblastina a una dosis que varía de 3,7 a 18,5 mg/m^2/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es vincristina a una dosis que varía de 0,7 a 2 mg/m^2/ciclo. En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es metotrexato a una dosis que varía de 3,3 a 1000 mg/m^2/ciclo

En otro aspecto, los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención se administran en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos, tales como anticuerpos o inmunomoduladores, que incluyen, entre otros,

Herceptin®, Retuxan®, OvaRex, Panorex, BEC2, IMC-C225, Vitaxin, Campath I/H, Smart MI95, LymphoCide, Smart I D 10 y Oncolym, rituxán, rituximab, gemtuzumab o trastuzumab.

La invención también contempla administrar los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención con uno o más agentes anti-angiogénicos, que incluyen, pero no se limitan a, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpin (inhibidor de la serínproteasa) anti-trombina, fragmentos proteolíticos de 29 kDa en N-terminal y de 40 kDa en C-terminal de fibronectina, fragmento proteolítico de 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico de 7,8 kDa del factor-4 plaquetario, un péptido β-aminoácido correspondiente a un fragmento del factor-4 plaquetario (Maione y col., 1990, Cancer Res. 51:2077), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento del colágeno I (Tolma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de la trombospondina I (Tolsma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de la SPARC (Sage y col., 1995, J. Cell. Biochem. 57. 1329), o cualquier fragmento, miembros de la familia o sus derivados, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables. También se han descrito otros péptidos que inhiben la angiogénesis y corresponden a fragmentos de laminina, fibronectina, procolágeno y EGF (Véase la revisión de Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales y los pentapéptidos cíclicos, que bloquean ciertas integrinas que se unen a proteínas RGD (es decir, que poseen el motivo peptídico Arg-Gly- Asp) tienen actividades anti-vascularización (Brooks y col., 1994, Science 264:569; Hammes y col., 1996, Nature Medicine 2:529). Además, la inhibición del receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa por antagonistas inhibe la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (Min y col., 1996, Cancer Res. 56:2428-33; Crowley y col, 1993, Proc Natl Acad. Sci. USA 90:5021). En la presente invención también se contempla el uso de dichos agentes antiangiogénicos.

En otro aspecto, los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención se administran en combinación con un régimen de radiación.

Los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención también se pueden administrar en combinación con una o más citocinas, que incluyen, pero no se limitan a, linfocinas, factor de necrosis tumoral, citocinas similares al factor de necrosis tumoral, linfotoxina-a, linfotoxina-β, interferón-β, macrófago, proteínas inflamatorias, factor estimulador de las colonias de granulocitos monocitos, interleucinas (incluidas, pero no limitadas a, entre otras, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12, interleucina-15, interleucina- 18), ligandos OX40, CD27, CD30, CD40 o CD 137, ligando Fas-Pas, 4- IBBL, proteína activadora de monocitos endoteliales o cualquier fragmento, miembros de la familia o sus derivados, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención también se pueden administrar en combinación con una vacuna contra el cáncer, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, células o tejidos antólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna con microorganismos vivos contra BCG, proteínas de linaje melanocítico (por ejemplo, gplOO, MART-1/MelanA, TRP-I (gp75), tirosinasa, antígenos ampliamente compartidos asociados con tumores, incluidos los específicos de tumores (por ejemplo, BAGE, GAGE-I, GAGE-2, MAGE-I, MAGE-3, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, pl5), antígenos mutados que están asociados con tumores (β-catenina, MUM-I, CDK4), antígenos no melanoma (por ejemplo, HER-2/neu (carcinoma de mama o de ovario), papilomavirus humano 5 E6, E7 (carcinoma cervical), MUC- 1 (carcinoma de mama, de ovario y de páncreas). Para los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T, véase, generalmente, Robbins y Kawakami, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8:628. Las vacunas contra el cáncer pueden o no ser preparaciones purificadas.

En otra forma de realización más, los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención se usan junto con un tratamiento hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales comprenden agonistas hormonales, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprólido (LUPRON), antagonistas de la LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento de hormonas, y esteroides (p- ej., dexametasona, retinoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestinas), antigestágenos (por ejemplo, mifepristona, onapristona) y antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

Los inmunoconjugados antimesotelina de la invención se pueden usar en combinación con, por ejemplo coadministrarse con, un agente fenotípico anti-MDR (resistencia a múltiples fármacos). Muchos cánceres humanos expresan de forma intrínseca o desarrollan espontáneamente resistencia a varias clases de fármacos anticancerosos al mismo tiempo, a pesar de que cada una de las clases farmacológicas tienen diferentes estructuras y mecanismos de acción. Este fenómeno, que se puede imitar en células de mamífero cultivadas, se denomina generalmente resistencia a múltiples fármacos (“MDR”) o el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. El fenotipo MDR presenta obstáculos significativos a los tratamientos quimioterapéuticos con éxito para cáncer en pacientes humanos. La resistencia de los tumores malignos a múltiples agentes quimioterapéuticos es una causa mayoritaria del fallo del tratamiento (Wittes y col., Cancer Treat. Rep. 70:105 (1986); Bradley, G. y col., Biochim. Biophys. Acta 948:87 (1988); Griswald, D. P. y col., Cancer Treat. Rep. 65(S2):51 (1981); Osteen, R. T. (ed.), Cancer Manual, (1990)). Los tumores que inicialmente son sensibles a los agentes citotóxicos a menudo recurren o se convierten en refractarios a múltiples fármacos quimioterapéuticos (Riordan y col., Pharmacol. Ther. 28:51 (1985); Gottesman y col., Trends Pharmacol. Sci. 9:54 (1988); Moscow y col., J. Natl. Cancer Inst. 80:14 (1988); Croop, J. M. y col., J. Clin. Invest. 81:1303 (1988)). Las células o tejidos obtenidos de tumores y cultivados en presencia de un fármaco citotóxico seleccionado puede

tener como resultado la resistencia cruzada a otros fármacos en dicha clase además de en otras clases de fármacos, incluidas, pero no limitados a, las antraciclinas, alcaloides de vinca y epipodofilotoxinas (Riordan y col., Pharmacol. Ther. 28:51 (1985); Gottesman y col., J. Biol. Chem. 263:12163 (1988)). Por tanto, la resistencia adquirida a un único fármaco tiene como resultado una resistencia simultánea a un grupo diverso de fármacos que no están ni estructural ni funcionalmente relacionados. Dicha resistencia puede ser un problema para los tumores en forma sólida y en forma líquida (por ejemplo, cánceres de la sangre o de la linfa).

Un mecanismo importante de resistencia a múltiples fármacos en células de mamífero implica el incremento de la expresión del sistema de bomba de glicoproteínas de membrana plasmática de 170 kDa (Juranka y col., FASEB J 3:2583 (1989); Bradley, G. y col., Blochem. Biophys. Acta 948:87 (1988)). El gen que codifica este sistema de bomba, en ocasiones denominado un transportador de múltiples fármacos, se ha clonado en células humanas cultivadas y generalmente se denomina mdrl. Este gen se expresa en varias clases de tejidos normales, pero los sustratos fisiológicos transportados para el producto del gen mdrl en estos tejidos no se han descrito. El producto MDRl es un miembro de la superfamilia de las proteínas transportadoras ABC, un grupo de proteínas que tiene la función de exportación dependiente de energía. El producto proteico del gen mdrl, generalmente conocido como glicoproteína P ("P-170", "P-gp"), es una proteína transmembrana plasmática de170 kDa que constituye la bomba de eflujo dependiente de energía mencionada en lo que antecede. La expresión de P-gp sobre la superficie de la célula es suficiente para hacer que las células sean resistentes a múltiples fármacos citotóxicos, incluidos muchos agentes anticancerosos. La MDR mediada por la P-gp parece ser un componente clínico importante de la resistencia tumoral en tumores de diferentes tipos y la expresión del gen mdrl se correlaciona con la resistencia a la quimioterapia en diferentes tipos de cáncer. La secuencia nucleotídica del gen mdrl (Gros, P. y col., Cell 47:371 (1986); Chen, C. y col., Cell 47:381 (1986)) indica que codifica un polipéptido similar o idéntico a la glicoproteína P y que estos son miembros de la clase altamente conservada de proteínas de membrana similares a los transportadores bacterianos e implicados en los procesos de transportes fisiológicos normales. El análisis de la secuencia del gen mdrl indica que la Pgp consta de 1280 aminoácidos distribuidos entre dos mitades homólogas (identidad del 43%). Cada mitad de la molécula tiene seis dominios transmembrana hidrófobos y cada una tiene un sitio de unión a ATP dentro de los grandes bucles citoplasmáticos. Solo aproximadamente el 8% de la molécula es extracelular y el resto de carbohidrato (aproximadamente 30 kDa) está unido a los sitios en esta región.

Por tanto, se apreciará que las células de mamífero que tienen una “resistencia a múltiples fármacos” o fenotipo de “.resistencia a múltiples fármacos” se caracterizan por la capacidad para secuestrar, exportar o expeler una pluralidad de sustancias citotóxicas (por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos) del medio intracelular. Las células pueden adquirir este fenotipo como resultado de la presión de selección impuesta por la exposición a un único fármaco quimioterapéutico (la toxina de selección). Como alternativa, las células pueden exhibir el fenotipo antes de la exposición a la toxina, ya que la exportación de sustancias citotóxicas puede implicar un mecanismo en común con la exportación normal de los productos de secreción celular, metabolitos y similares. La resistencia a múltiples fármacos difiere de la resistencia simple adquirida a la toxina de selección en que la célula adquiere competencia para exportar citotoxinas adicionales (otros fármacos quimioterapéuticos) a las que la célula no ha sido expuesta anteriormente. Por ejemplo, Mirski y col. (1987), 47 Cancer Res. 2594-2598, describen el aislamiento de una población celular resistente a múltiples fármacos cultivando la línea celular H69, derivada de un carcinoma humano de pulmón de células pequeñas, en presencia de adriamicina (doxorubicina) como toxina de selección. Se encontró que las células supervivientes resistían a los efectos citotóxicos de los análogos de antraciclina (por ejemplo, daunomicina, epirubicina, menogarilo y mitoxantrona), acivicina, etopósido, gramicidina D, colchicina y alcaloides derivados de Vinca (vincristina y vinblastina) así como adriamicina. Se pueden aplicar técnicas de cultivo de selección similares para generar poblaciones celulares adicionales resistentes a múltiples fármacos. De acuerdo con esto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir adicionalmente compuestos que actúan para inhibir el fenotipo MDR y/o las condiciones asociadas con el fenotipo MDR. Dichos compuestos pueden incluir cualquier compuesto inhibidor de MDR conocido en la técnica, tales como anticuerpos específicos de componentes de MDR (por ejemplo, anticuerpos transportadores anti-MDR) o inhibidores de moléculas pequeñas de transportadores de MDR, incluidos, específicamente, tamoxifeno, verapamilo y ciclosporina A, que son agentes de los que se conoce que invierten o inhiben la resistencia a múltiples fármacos. (Lavie y col. J. Biol. Chem. 271: 19530-10536, 1996). Dichos compuestos se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. nº 5.773.280, 6.225.325 y 5.403.574. Dichos compuestos inhibidores de MDR se pueden coadministrar con los inmunoconjugados antimesotelina de la invención con varios fines, incluidos, invertir el fenotipo de MDR tras la detección del fenotipo de MDR para ayudar o potenciar un tratamiento quimioterapéutico. El inhibidor de MDR, tal como, por ejemplo, tamoxifeno, verapamilo o ciclosporina A, puede usarse junto con los compuestos de la invención para ayudar en la detección del fenotipo de MDR. De acuerdo con este aspecto, un inhibidor de MDR puede potenciar la captación y la acumulación de un compuesto de la invención en una célula de cáncer MDR, ya que la capacidad del sistema de transporte de MDR en el transporte o “bombeo hacia fuera” del compuesto especular en relación con el dominio del sustrato disminuiría en presencia de un inhibidor de MDR.

En otra forma de realización más, los inmunoconjugados antimesotelina de la presente invención se usan junto con un programa de terapia génica en el tratamiento del cáncer. La terapia génica con células recombinantes que secretan interleucina 2 se puede administrar en combinación con los inmunoconjugados de la invención para prevenir o tratar el cáncer, particularmente el cáncer de mama (véase, por ejemplo, Deshmukh y col., 2001, J. Neurosurg. 94:287).

Pata evaluar la capacidad de un inmunoconjugado concreto para ser terapéuticamente útil para tratar el cáncer, como ejemplo, el inmunoconjugado puede analizarse in vivo en un modelo de tumor xenoinjertado de ratón. Ejemplos de

modelos terapéuticos se detallan en los ejemplos 1 y 2. La actividad del anticuerpo puede también analizarse usando un ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos tal como se describe en el ejemplo 3.

Composiciones y dosificaciones farmacéuticas

Los inmunoconjugados descritos en la presente memoria descriptiva se pueden proporcionar en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser no pirógeno. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier transportador farmacéutico estéril, biocompatible, incluidos, pero no limitados a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Se pueden emplear una variedad de vehículos acuosos, incluidos, pero no limitados a, solución salina, glicina o similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulado. Éstas soluciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas (por ejemplo, filtración).

Generalmente, la frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” está reconocida en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administrar a mamíferos compuestos de la presente invención. Los vehículos incluyen cargas líquidas o sólidas, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicados en el transporte del agente sujeto de un órgano, una porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta, gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones de inmunoconjugado de la invención.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metasulfito sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, y similares. La concentración del inmunoconjugado de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar considerablemente y puede seleccionarse principalmente sobre la base de volúmenes de fluido, viscosidades etc., de acuerdo con el modo de administración concreto seleccionado. Si se desea, más de un tipo de anticuerpo o inmunoconjugado puede incluirse en una composición farmacéutica (por ejemplo, un anticuerpo con diferentes Ka para la unión a la mesotelina).

Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier número de vías, incluidas, pero no limitadas a, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral, tópica, sublingual o rectal.

Las composiciones de la invención adicionalmente contemplan inmunovehículos adecuados, tales como proteínas, polipéptidos o péptidos tales como albúmina, hemocianina, tiroglobulina y sus derivados, particularmente seroalbúmina bovina (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH), polisacáridos, hidratos de carbono, polímeros y fase sólidas. Otras sustancias derivadas de proteínas o no derivadas de proteínas son conocidas para los expertos en la técnica.

En aspectos que implican vacunas, por ejemplo vacunas contra el cáncer junto con los anticuerpos de la invención, las composiciones de la invención se pueden administra con o sin un coadyuvante. La administración se puede llevar a cabo en ausencia de un coadyuvante con el fin de evitar cualquier toxicidad inducida por coadyuvante. El experto en la técnica a la que atañe la presencia invención, por ejemplo un médico especializado en cáncer, apreciará y entenderá cómo determinar si se debe usar o no un coadyuvante y puede depender de la historia médica del un sujeto, los datos familiares, los datos de toxicidad, los resultados de las pruebas relacionadas con alergia etc. En formas de

realización en los que se usa un coadyuvante, es ventajoso que el coadyuvante estimule la formación de anticuerpos protectores, tales como anticuerpos IgG protectores. Cualquier coadyuvante adecuado conocido para un experto en la técnica se contempla en la presente invención y se adapta fácilmente a la presente invención. Coadyuvantes adecuados para usar en la vacunación de animales pueden incluir, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio, saponina y su componente purificado Quit A, coadyuvante completo de Freund (ACF) y coadyuvante incompleto de Freund (AIF). Se ha mostrado que el sulfato de dextrano es un potente estimulador de anticuerpos IgG2 contra los antígenos de superficie celular estafilocócicos y también es adecuado como coadyuvante. El experto en la técnica apreciará que algunos coadyuvantes pueden ser más preferibles para aplicación veterinaria, mientras que otros coadyuvantes serán preferibles para usar en seres humanos y que las toxicidades del coadyuvante son una consideración que el experto en la técnica debe tener en cuenta antes de la administración del compuesto a un ser humano.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular y similares; vehículos farmacéuticos adecuados; y técnicas para la formulación y la administración se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., Vigésima edición, 2000). La formas de dosificación líquidas para administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyente inerte de uso habitual en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular aceites de algodón, aceite de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, como se usan en la presente memoria descriptiva, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal y la infusión. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un inmunoconjugado que puede usarse para tratar de forma eficaz una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en comparación con la eficacia que es evidente en ausencia de la dosis terapéuticamente efectiva.

La dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en modelos de animales (por ejemplo, ratas, ratones, conejos, perros o cerdos). El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad (por ejemplo, DE50, la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL50, la dosis letal para el 50% de la población, de un inmunoconjugado se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. El cociente entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse en forma del cociente DL50/DE50. Los datos obtenidos de los estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en dichas composiciones puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

El médico puede determinar la dosificación exacta a la luz de los factores relacionados con el paciente que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración pueden ajustarse para proporcionar niveles suficientes del inmunoconjugado o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinación/combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Los polinucleótidos que codifican inmunoconjugados de la invención se pueden construir e introducir en una célula, bien ex vivo o in vivo, usando técnicas bien establecidas incluidas, entre otras, transferencia de ADN mediada por transferrina-policationes, fusión celular, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas con ADN, fusión de protoplastos, infección vírica, electroporación, “disparo génico” y DEAE, o transfección mediada por fosfato cálcico.

Las dosificaciones eficaces in vivo de componentes de toxóforo de un inmunoconjugado están en el intervalo de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg/kg del peso corporal del paciente. El modo de administración de las composiciones farmacéuticas que contienen inmunoconjugado de la presente invención puede ser cualquier vía adecuada que libere el anticuerpo en el huésped. Como ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para administración parenteral (por ejemplo, administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intranasal). Generalmente, la divulgación anterior describe la presente invención. Un entendimiento más completo se puede obtener por referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Eficacia del inmunoconjugado en un modelo en ratón de xenoinjerto de carcinoma pancreático

humano que expresa mesotelina

Con el fin de analizar si los inmunoconjugados antimesotelina podían reducir el crecimiento de los tumores de un modo dependiente de mesotelina, se realizó una transfección estable de células de carcinoma pancreática humana (MiaPaCa-2) con mesotelina y se usaron para establecer un modelo de ratón de tumor en crecimiento subcutáneo. Se usó la línea celular de carcinoma de colon humano HT29 para establecer tumores control negativos a mesotelina en el estudio de eficacia. Las células MiaPaCa se mantuvieron como cultivos adherentes en medio DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v), suero de caballo al 2,5% (v/v), 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, glutamina 4mM y 0,4 % (v/v) de higromicina. Las células HT29 se cultivaron en medio 5a de McCoy con glutamina 1,5 mM, 2,2g/l de bicarbonato sódico y FCS al 10% (v/v). La expresión de mesotelina por las células MiaPaCa-2 y la ausencia de mesotelina en las células HT29 se confirmó mediante FACS (no mostrado). Para evaluar el crecimiento in vivo de las células tumorales, en ratones hembra atímicos NMRI se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho 3 x 10^6 células MiaPaCa-2 o 1 x 10^6 células HT29, resuspendidas en 50% de Matrigel™ y 50% de medio. Como inmunoconjugados antimesotelina MF-J-SPDB-DM4, MF-T-SPDB-DM4, MF226-SPDB-DM4 y MOR6640-SPDB-DM4 se han investigado a dosis terapéuticas de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg y 0,2 mg/kg (en relación con la cantidad de toxóforo). MF-J-SPDB-DM4, MF-T-SPDB-DM4, MF226-SPDB-DM4 y MOR6640-SPDB-DM4 se generaron mediante el procedimiento siguiente: Los anticuerpos antimesotelina se modificaron con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-[2-piridilditio]butanoico (SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. A 8 mg/ml de anticuerpo se usó un exceso molar de ~6 veces de SPDB (solución madre ~20mM en EtOH) para modificar el anticuerpo. Los anticuerpos modificados se hicieron reaccionar con un exceso molar de 1,7 veces de la forma de tiol libre de maitansinoide con respecto a tiopiridilo. La reacción se llevó a cabo a 2,5 mg/ml de anticuerpo en presencia de 3% de dimetilacetamida (3% v/v) durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción de conjugación se purificó a partir del fármaco sin reaccionar y los subproductos de la reacción usando una columna Sephadex G25 para desalado. El número de moléculas de maitansinoide por anticuerpo se calculó midiendo las absorbancias a 252 nm y a 280 nm, usando coeficientes de extinción de 224000 M^{-1} cm^{-1} por anticuerpo y 5180 M^{-1} cm^{-1} por DM4 a 280 nm. La proporción de las absorbancias 252 nm/280 nm es de 0,37 para el anticuerpo y de 5,05 para DM4.

El tratamiento comenzó tras el establecimiento del tumor el día 5 después de la inoculación de las células tumorales, seguido por dos tratamientos adicionales los días 8 y 12 después de la inoculación de las células tumorales. Los ratones control se trataron con 0,2 mg/kg del inmunoconjugado no dirigido a la diana (anti-lisozima-SPDB-DM4) o con volúmenes iguales de vehículo solo (histidina 10 mM, glicina 130 mM, sacarosa al 5% (p/v), pH 5,5). Los tratamientos se produjeron con un volumen de dosificación de 100 µl/10g de peso corporal mediante aplicación intravenosa. Los grupos estaban constituidos por 6 animales cada uno. El estado de salud de los ratones se analizó diariamente. Se midieron la longitud y la anchura de los tumores subcutáneos usando un compás electrónico dos veces a la semana. El área del tumor se calculó mediante la fórmula: área tumoral [mm^2] = longitud [mm] x anchura [mm]. Todos los datos obtenidos mediante el experimento se documentaron. Un ejemplo de la eficacia anti-tumoral del inmunoconjugado antimesotelina MF-T-SPDB-DM4 sobre células de carcinoma de páncreas humano transfectados con mesotelina a diferentes dosis de tratamiento se muestra en la figura 1. En ratones hembra atímicos NMRI se inoculó en su flanco derecho 3 x 10^6 células de carcinoma de páncreas humano MiaPaCa-2 positivas a mesotelina (A) o 1 x 10^6 células de carcinoma de colon humano HT29 negativas a mesotelina (B) resuspendidas en 50% de Matrigel™/50% de medio. Una vez transcurridos 5, 8 y 12 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones recibieron 0,01, 0,03, 0,05, 0,2 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4, (todas las concentraciones respecto a la cantidad de toxóforo) o de vehículo solo. La longitud y la anchura de los tumores se midieron dos veces a la semana y se calculó el área del tumor mediante multiplicación de la anchura por la longitud. Se representan los valores medios y la desviación estándar para cada grupo y el punto de tiempo medido. Todas las n = 6. Los asteriscos indican los valores $P < 0,05$.

El tratamiento de los ratones portadores del tumor reveló que todos los inmunoconjugados antimesotelina analizados pudieron suprimir el crecimiento de los tumores MiaPaCa-2 positivos para mesotelina in vivo a dosis de 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg y 0,2 mg/kg. A dosis de 0,05 mg/kg y 0,2 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4 se produjo una erradicación completa del tumor sin recrecimiento de los tumores hasta el final del periodo de observación de 132 días. La concentración de 0,05 mg/kg de SPDB-DM4-anti-lisozima control no dirigida a la diana no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor MiaPaCa positivo para mesotelina (Tabla 1). En comparación con los tumores no tratados y tratados con vehículo, el crecimiento de los tumores HT29 negativos para mesotelina no se redujo significativamente con la dosis más elevada de 0,2 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4. Esto demuestra que la fuerte eficacia inhibidora del tumor de MF-T-SPDB-DM4 depende de la expresión de mesotelina en el interior del tumor.

Tabla 1: Eficacia de inhibición del tumor de los inmunoconjugados antimesotelina en el modelo de tumor de xenoinjerto MiaPaCa positivo para mesotelina.

	MF-J-DM4	MOR-6640-DM4	MF-T-DM4	MF-226-DM4	αlisozima-DM4 (control)
DM4/Ab	2,8	3,6	3,6	3,3	4,0-4,1
0,01 mg/kg	-	-	-	-	nd
0,03 mg/kg	nd	+	+	+	nd
0,05 mg/kg	+	+	++a)	+	-

0,2 mg/kg	+	++b)	++a)	++	+b)
++ Erradicación del tumor **+ Reducción/Regresión** **- Sin signos. Efecto, duración del experimento 20-30 d** **nd no determinado** **a) Erradicación completa en 132 d** **b) Recrecimiento del tumor en todos los animales (n= 6) en 132 d**					

EJEMPLO 2: Eficacia en tumores que expresan mesotelina de forma endógena y comparación de diferentes ligantes

Con el fin de analizar si los inmunoconjugados antimesotelina pueden suprimir el crecimiento de las células tumorales que expresan mesotelina de forma endógena in vivo se usó un modelo de xenoinjerto con células de carcinoma de cuello uterino humano en crecimiento subcutáneamente (HeLaMATU). Las células HeLaMATU se mantuvieron como cultivos adherentes en medio DMEM/HAMS12 suplementado con FCS al 10% (v/v), suero de caballo al 2,5% (v/v), 1% de piruvato sódico y 1% de glutamina (p/v). La expresión de mesotelina se confirmó mediante análisis FACS in vitro. En ratones hembra atímicos NMRI se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho 1,5 x 10^6 células HeLaMATU resuspendidas en 50% de Matrigel™/50% de medio. Adicionalmente se abordó si el intercambio del SPDB-ligante escindible por un ligante polar (-sulfo-SPDB), por un ligante estable (-SMCC) o por un ligante polar y estable (-(PEG)4-mal) conduce a una alteración de la eficacia anti-tumoral del inmunoconjugado basado en MOR6640 in vivo. Ratones portadores de tumor HeLaMATU se trataron por vía intravenosa con 0,2 mg/kg de bien MOR6640-SPDB-DM4, MOR6640-SMCC-DM1, MOR6640-Sulfo-SPDB-DM4 o MOR6640-(PEG)4-mal-DM1 (respecto a la cantidad de toxóforo) los días 5, 8, y 12 después de la inoculación de las células tumorales. Los ratones control se trataron con 0,2 mg/kg del inmunoconjugado no dirigido a la diana (anti-lisozima-SPDB-DM4) o con volúmenes iguales de vehículo solo. Los grupos estaban constituidos por 6 animales cada uno. Se realizó una exploración diaria del estado de salud de los ratones. Se midieron la longitud y la anchura de los tumores subcutáneos usando un compás electrónico dos veces a la semana. El área del tumor se calculó mediante la fórmula: área tumoral [mm^2] = longitud [mm] x anchura [mm]. Los datos obtenidos se presentan en la figura 2. El tratamiento de los ratones portadores del tumor reveló a) que los inmunoconjugados antimesotelina eran eficaces en la supresión del crecimiento de tumores que expresan mesotelina de forma endógena in vivo y b) que los conjugados con ligantes escindibles (MOR6640-SPDB-DM4 y MOR6640) mostraban una eficacia antitumoral mayor que los conjugados con los ligantes estables (MOR6640-SMCC-DM1 y MOR6640-(PEG)4-mal-DM1). En particular, MOR6640-SPDB-DM4 y MOR6640-sulfo-SPDB-DM4 condujeron a una erradicación de los tumores de todos los animales tratados once días después del último tratamiento, mientras que el tratamiento con MOR6640-SMCC-DM1 y MOR6640-(PEG)4-mal-DM1 solo da como resultado un retraso del crecimiento tumoral. No obstante, once días después del último tratamiento, el área de los tumores tratados con MOR6640-SMCC-DM1 y MOR6640-(PEG)4-mal-DM1, respectivamente, fue significativamente menor en comparación con la de los tumores tratados con vehículo o con anti-lisozima-SPDB-DM4. El conjugado control no dirigido a la diana no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor. Con el fin de comparar la eficacia antitumoral de los diferentes ligantes en un segundo modelo de xenoinjerto, los autores emplearon el modelo con células MiaPaCa en crecimiento subcutáneo transfectadas con vector o con mesotelina (nº 37) (células de carcinoma de páncreas humano). Las células MiaPaCa-2-vector y MiaPaCa-2#37 se mantuvieron como cultivos adherentes en medio DMEM/HAMS12 suplementado con 10% (v/v) de FCS, 1% (p/v) de glutamina y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. La expresión de mesotelina se confirmó mediante análisis FACS y mediante análisis inmunohistoquímico de los tumores subcutáneos ex vivo. En ratones hembra atímicos NMRI se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho 3 x 10^6 células MiaPaCa-2-vector y células MiaPaCa-2#37 resuspendidas en 50% de Matrigel™/50% de medio, respectivamente. Los ratones portadores de tumores se trataron con 0,05 mg/kg de MOR6640-SPDB-DM4, MOR6640-SMCC-DM1, MOR6640-Sulfo-SPDB-DM4 o MOR6640-(PEG)4-mal-DM1 (respecto a la cantidad de toxóforo) los días 5, 8, y 12 después de la inoculación de las células tumorales. Los ratones control se trataron con 0,05 mg/kg del inmunoconjugado no dirigido a la diana (anti-lisozima-SPDB-DM4) o con volúmenes iguales de vehículo solo. Los grupos estaban constituidos por 6 animales cada uno. Se realizó una exploración diaria del estado de salud de los ratones. Se midieron la longitud y la anchura de los tumores subcutáneos usando un compás electrónico dos veces a la semana. El área del tumor se calculó mediante la fórmula: área tumoral [mm^2] = longitud [mm] x anchura [mm]. Los datos del crecimiento tumoral se presentan en la figura 3. En ratones portadores de tumores que expresan mesotelina, el tratamiento con MOR6640-SPDB-DM4 y MOR6640-sulfo-SPDB-DM4 condujo a una erradicación de los tumores de todos los animales tratados 12 días después del último tratamiento. No obstante, el recrecimiento de estos tumores se obtuvo diez días después (Figura 3A). El tratamiento con MOR6640-SMCC-DM1, MOR6640-(PEG)4-mal-DM1 y anti-lisozima-SPDB-DM4 no afectó significativamente al crecimiento del tumor. En contraste con los tumores que expresan mesotelina, ninguno de los tratamientos condujo a una alteración del crecimiento de las células MiaPaCa-2 transfectadas con vector in vivo (Figura 3B).

EJEMPLO 3: Citotoxicidad in vitro de inmunoconjugados antimesotelina

Para evaluar la citotoxicidad de los inmunoconjugados antimesotelina se cultivaron diferentes líneas celulares que expresan mesotelina hasta 80-90% de confluencia, se tripsinizaron y se contaron. A continuación, las células se sembraron en placas de 384 pocillos de fondo plano a 800 con 25 ul de volumen por pocillo en sus medios de

crecimiento para todas las líneas celulares. Se establecieron pocillos que solo contenían medio para la sustracción del blanco. A las 24 horas de la siembra, se dosificaron MF-J-SPDB-DM4, MF-226-SPDB-DM4 MOR6640-SPDP-DM4, MF226-SPDP-DM4 y anti-lisozima-SPDP-DM4 en el intervalo de 0,01 a 3,00 nM. Se realizaron triplicados para cada dilución. Las mediciones finales se realizaron a las 96 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante medición en ensayo WST-1 (Roche nº de cat. 1644807). Los valores de CI_{50} se muestran en la Tabla 2. En la figura 4 se muestra una curva de dosis-respuesta que demuestra la citotoxicidad in vitro de MF-T-SPDP-DM4 sobre células HelaMatu.

Tabla 2: Valores de CI_{50} nM de inmunoconjugados antimesotelina en líneas celulares que expresan mesotelina

CI50 (nM)	MF-J-SPDP-DM4	MOR06640 - SPDP- DM4	MF-T -SPDP-DM4	MF-226 - SPDP- DM4	αLisozima -SPDP-DM4 (control)
MiaPaCa-2 (Mesotelina+)	1,4	0,36	1,3	21	>100
MiaPaCa-2 (Mesotelina-)	>100	>100	>100	>100	>100
HT29 C2 (Mesotelina+)	0,3	0,21	1,5	8	18
HT29 V (Mesotelina-)	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CHO A9* (Mesotelina+)	0,35	1,2	1,0	1,3	> 50
CHO K1* (Mesotelina-)	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
DU145	5,2	5,1	9	10	-
HCT116	9,0	20,7	17,2	26,5	33,1
SW480	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
MDAMB231	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
MCF10a	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
HelaMatu	0,2	0,6	0,45	0,9	0,4
OVCAR-3	0,9	1,07	2,8	14,8	>100
KD de Fab (nM)	9,2	0,19	16,3	58,3	

Tabla 3: Secuencias de anticuerpos

Anticuerpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	Proteína VH	Proteína VL	Nucleótido VH	Nucleótido VL
	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID	SEC ID
MF-J	1	4	7	10	13	16	20	24	28	32
MOR 06640	1	4	7	10	13	17	21	25	29	33
MF-226	2	5	8	11	14	18	22	26	30	34
MF-T	3	6	9	12	15	19	23	27	31	35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Healthcare

<120> Anticuerpos antimesotelina y usos de los mismos

<130> BHC 09 1 008

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly
1               5                   10
```

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Asn Tyr Ile Asn
1               5                   10
```

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

<400> 3

```
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly
1               5                   10
```

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Trp Met Gly Val Ile Met Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro
1               5                   10                  15

Ser Phe Gln Gly
            20
```

<210> 5
<211> 20

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```
Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro His Gly Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Gln
1               5                   10                  15

Lys Phe Gln Gly
            20
```

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
Trp Met Gly Ile Ile Asp Pro Gly Asp Ser Arg Thr Arg Tyr Ser Pro
1               5                   10                  15

Ser Phe Gln Gly
            20
```

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```
Tyr Gly His Gly Met Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Val
1               5                   10
```

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```
Trp His His Gly Thr Trp Ile Phe Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

```
Gly Gln Leu Tyr Gly Gly Thr Tyr Met Asp Gly
1               5                   10
```

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Arg Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser
1               5                   10
```

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

```
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr Asn Ser Val Ser
1               5                   10
```

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Arg Ala Thr
1               5                   10
```

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```
Leu Leu Ile Tyr Asn Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1               5                   10
```

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Leu Met Ile Tyr Gly Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gln Gln Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Gln Gln Tyr Ser His Asp Pro Ser Gly
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Ser Thr Tyr Asp Arg Arg Thr Phe Ser
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Ser Ser Tyr Asp Ile Glu Ser Ala Thr Pro
1 5 10

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

```
Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Val Ile Met Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Tyr Gly His Gly Met Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Val Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 21
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Val Ile Met Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Tyr Gly His Gly Met Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Val Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

```
Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Asn
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro His Gly Gly Asp Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Trp His His Gly Thr Trp Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

```
Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

                85                  90                  95

 Ala Arg Gly Gln Leu Tyr Gly Gly Thr Tyr Met Asp Gly Trp Gly Gln
            100                 105                 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 25
<211> 111
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
    50                  55                  60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser His Asp Pro
                85                  90                  95

Ser Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110
```

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asn Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Arg Arg Thr
                85                  90                  95

Phe Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
            100                 105                 110
```

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr
            20                  25                  30

Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45

Met Ile Tyr Gly Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Ile Glu
                85                  90                  95

Ser Ala Thr Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
            100                 105                 110

Gln
```

<210> 28
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```
caggtggaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaaaatt       60

agctgcaaag gttccggata ttcctttact aattattgga ttggttgggt gcgccagatg      120

cctgggaagg gtctcgagtg gatgggcgtt atcatgccgt ctgatagcta tacccgttat      180

tctccgagct ttcagggcca ggtgaccatt agcgcggata aaagcattag caccgcgtat      240

cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgcgc gcgttatggt      300

catggtatgt atggtggtgc tcttgatgtt tggggccaag gcaccctggt gacggttagc      360

tca                                                                    363
```

<210> 29
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaaaatt 60

agctgcaaag gttccggata ttcctttact aattattgga ttggttgggt gcgccagatg 120

cctgggaagg gtctcgagtg gatgggcgtt atcatgccgt ctgatagcta tacccgttat 180

tctccgagct ttcagggcca ggtgaccatt agcgcggata aaagcattag caccgcgtat 240

cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgcgc gcgttatggt 300

catggtatgt atggtggtgc tcttgatgtt tggggccaag gcaccctggt gacggttagc 360

tca 363

<210> 30
<211> 357
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

caggtggaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact ggtaattata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatt atcaatccgc atggtggcga tacgaagtac 180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgttggcat 300

catggtactt ggatttttga ttattggggc caaggcaccc tggtgacggt tagctca 357

<210> 31
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

caggtggaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaaaatt 60

agctgcaaag gttccggata ttcctttact tcttattgga ttggttgggt gcgccaggcc 120

cctgggaagg gtctcgagtg gatgggcatt atcgatccgg gtgatagccg tacccgttat 180

tctccgagct ttcagggcca ggtgaccatt agcgcggata aaagcattag caccgcgtat 240

cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgcgc gcgtggtcag 300

ctttatggtg gtacttatat ggatggttgg ggccaaggca ccctggtgac ggttagctca 360

<210> 32
<211> 330
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60

ctgagctgca gagcgagcca gtctgttcgt tcttctcgtc tggcttggta ccagcagaaa 120

ccaggtcaag caccgcgtct attaatttat ggtgcttcta agcgtgcaac tggggtcccg 180

gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240

cctgaagact ttgcgactta ttattgccag cagtattatg attttcctcc tacctttggc 300

cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg 330

<210> 33
<211> 333
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60

ctgagctgca gagcgagcca gtctgttcgt tcttctcgtc tggcttggta ccagcagaaa 120

ccaggtcaag caccgcgtct attaatttat ggtgcttcta agcgtgcaac tggggtcccg 180

gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240

cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtattctc atgatccttc tggtaccttt 300

ggccagggta cgaaagttga aattaaacgt acg 333

<210> 34
<211> 333
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

gatatcgtgc tgacccagcc gccttcagtg agtggcgcac caggtcagcg tgtgaccatc 60

tcgtgtagcg gcagcagcag caacattggt tctaattatg tgtcttggta ccagcagttg 120

cccgggacgg cgccgaaact tctgatttat aatgataatc agcgtccctc aggcgtgccg 180

gatcgtttta gcggatccaa aagcggcacc agcgcgagcc ttgcgattac gggcctgcaa 240

agcgaagacg aagcggatta ttattgctct acttatgatc gtcgtacttt ttctgtgttt 300

ggcggcggca cgaagttaac cgtcctaggt cag 333

<210> 35
<211> 339
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

```
gatatcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60

tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt ggttataatt atgtgtcttg gtaccagcag     120

catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tattctgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg     180

agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg     240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc gctacttggg atcattctca gatgggtaag     300

gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcag                            339
```

<210> 36
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

```
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1               5                  10                  15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
            20                  25                  30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro
        35                  40                  45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
    50                  55                  60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met
            100                 105                 110

Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly
        115                 120                 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly
    130                 135                 140

Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg
                165                 170                 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met
            180                 185                 190

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala
        195                 200                 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp
    210                 215                 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr
225                 230                 235                 240
```

```
Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys
                245                 250                 255

Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg
            260                 265                 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro
        275                 280                 285

Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly
    290                 295                 300

Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu
305                 310                 315                 320

Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
                325
```

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico y un anticuerpo humano o humanizado, en el que dicho anticuerpo comprende:

i) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 23 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 27, o
ii) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 24 o
iii) una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 21 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 25,

y en el que el agente citotóxico es un maitasinoide.

2. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el maitasinoide es DM4.

3. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el anticuerpo y el agente citotóxico están conectados a través de un conector SPDB.

4. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso como un medicamento.

6. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de cáncer.

7. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón o mesotelioma.

Figura 1 / 4

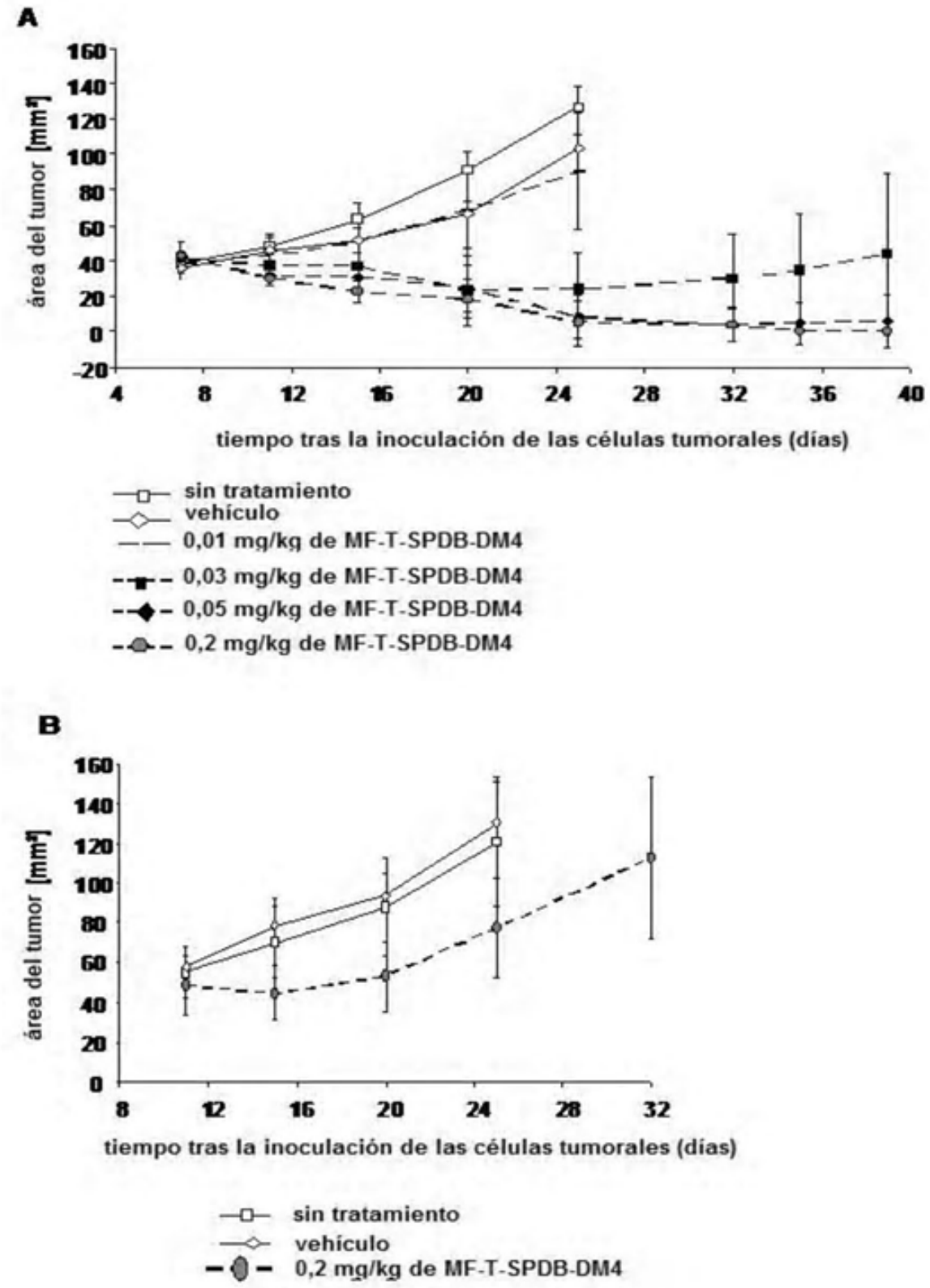

A
área del tumor [mm²]
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
tiempo tras la inoculación de las células tumorales (días)
sin tratamiento
vehículo
0,01 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4
0,03 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4
0,05 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4
0,2 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4
B
área del tumor [mm²]
160
140
120
100
80
60
40
20
0
8
12
16
20
24
28
32
tiempo tras la inoculación de las células tumorales (días)
sin tratamiento
vehículo
0,2 mg/kg de MF-T-SPDB-DM4

Figura 2 / 4

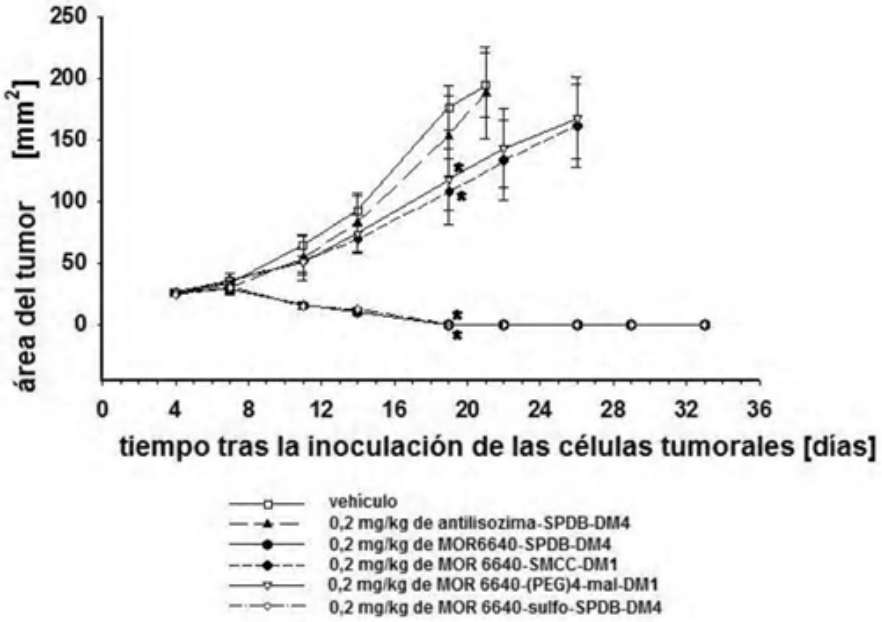
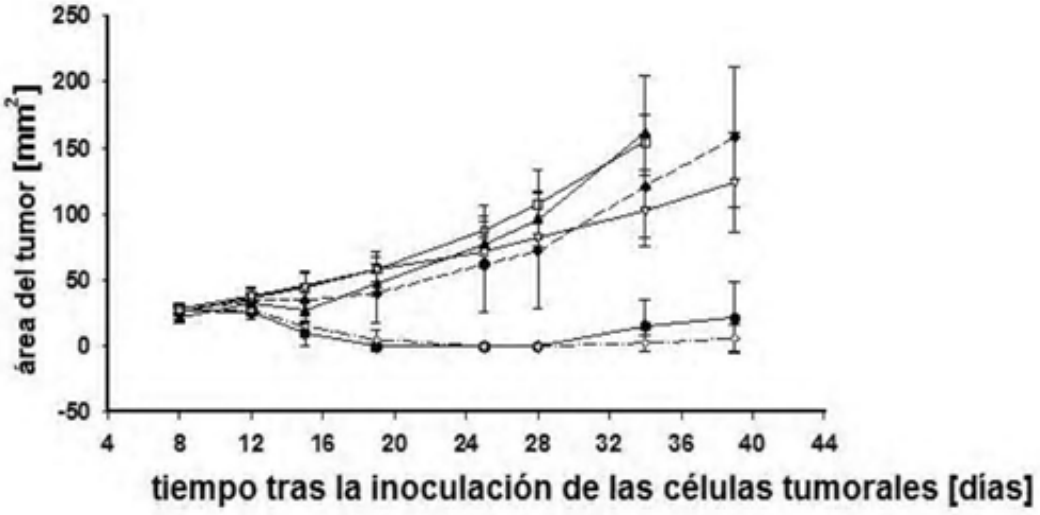

área del tumor [mm²]
250
200
150
100
50
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
tiempo tras la inoculación de las células tumorales [días]
vehículo
0,2 mg/kg de antilisozima-SPDB-DM4
0,2 mg/kg de MOR6640-SPDB-DM4
0,2 mg/kg de MOR 6640-SMCC-DM1
0,2 mg/kg de MOR 6640-(PEG)4-mal-DM1
0,2 mg/kg de MOR 6640-sulfo-SPDB-DM4

Figura 3 / 4

A


área del tumor [mm²]
250
200
150
100
50
0
-50
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
tiempo tras la inoculación de las células tumorales [días]

B

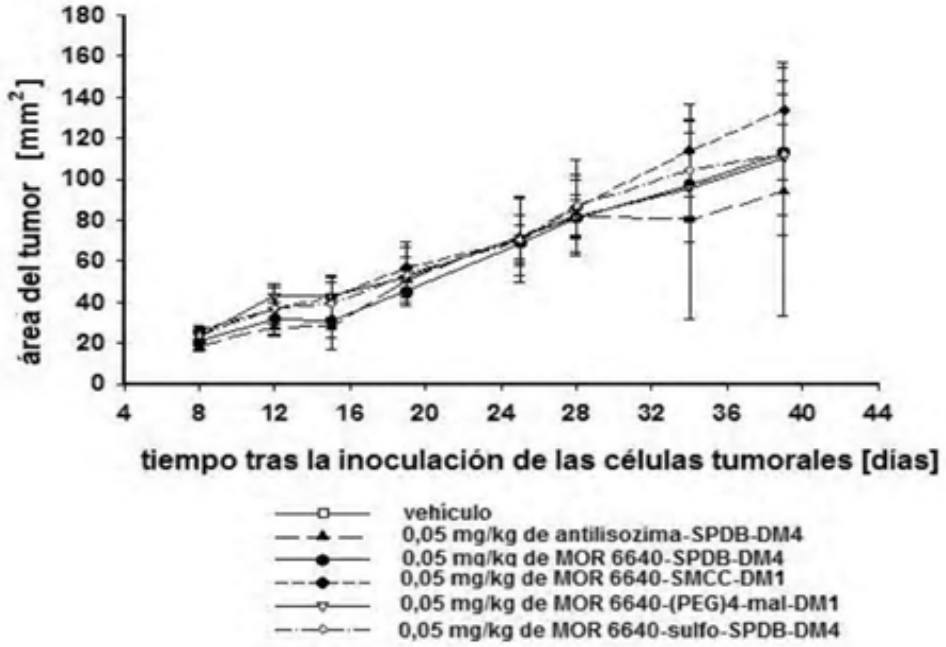
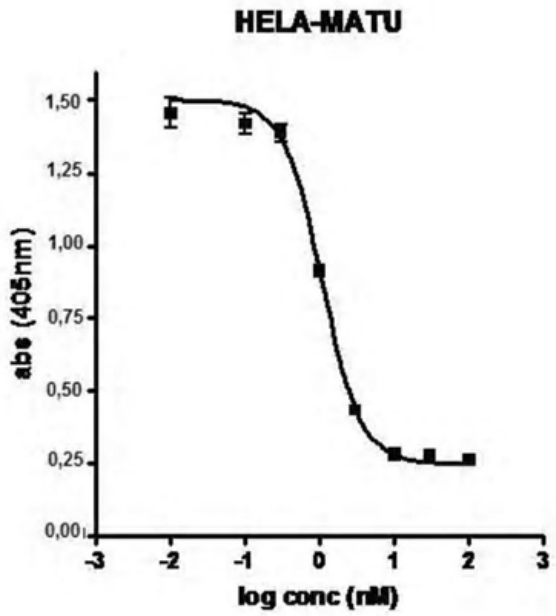

área del tumor [mm²]
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
tiempo tras la inoculación de las células tumorales [días]
vehículo
0,05 mg/kg de antilisozima-SPDB-DM4
0,05 mg/kg de MOR 6640-SPDB-DM4
0,05 mg/kg de MOR 6640-SMCC-DM1
0,05 mg/kg de MOR 6640-(PEG)4-mal-DM1
0,05 mg/kg de MOR 6640-sulfo-SPDB-DM4

Figura 4 / 4


HELA-MATU
abs (405nm)
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-3
-2
-1
0
1
2
3
log conc (nM)