

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 501**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/CA2014/000543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14819422 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3016980**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo de EGFR**

30 Prioridad:

05.07.2013 US 201361843113 P
25.02.2014 US 201461944157 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:

FORMATION BIOLOGICS INC. (100.0%)
750 Boul. Saint-Laurent, Suite 101
Montréal, Québec H2Y 2Z4, CA

72 Inventor/es:

TIKHOMIROV, ILIA ALEXANDRE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 809 501 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpo de EGFR

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un inmunoconjugado con diana en poblaciones celulares de cáncer que expresa EGFR y comprende un anticuerpo anti-EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada, conjugada con el agente dañino para los microtúbulos maitansinoide DM-1 mediante el conector 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).

Antecedentes de la invención

La conjugación de proteínas ligantes de células, tales como anticuerpos, con potentes agentes eliminadores de células potencia su actividad anticáncer, proporcionando las denominadas "balas mágicas", ha tenido resultados clínicos desiguales.

El documento nº US 2013/0156796 describe que los inmunoconjugados de anticuerpos de EGFR puede resultar eficaz en la inhibición de células tumorales que han desarrollado mecanismos de resistencia a EGFR y/o ALK.

El documento nº US 2012/0156217 se refiere a agentes anticáncer que incluyen anticuerpos e inmunoconjugados que se unen a EGFR.

Setiady et al., Cancer Res. 73:5463, 2013 se refiere a un conjugado de anticuerpos-maitansinoide, IMG289, para el tratamiento de tumores sólidos expresantes de EGFR.

En comparación con los anticuerpos desnudos, los inmunoconjugados con frecuencia muestran una potencia de eliminación celular incrementada y ello incrementa su actividad contra células de cáncer que expresan el antígeno diana del anticuerpo. Sin embargo, este mismo incremento de potencia también se observa en células normales que expresan ese mismo antígeno. Resulta particularmente preocupante la citotoxicidad incrementada contra los tejidos de proliferación rápida, tales como la piel. Por ejemplo, un inmunoconjugado con diana en CD44v6 que consiste en maitansinoide y anticuerpo de CD44v6 resultó muy activo contra las células de cáncer pero se interrumpió su utilización debido a toxicidades graves para la piel, tales como necrosis epidérmica tóxica, que ocurrió como consecuencia de la actividad potenciada del inmunoconjugado contra las células de la piel, que también expresan CD44v6 (Tijink et al., Clin. Cancer Res. 12:6064, 2006).

Otra proteína de superficie celular, el receptor de factor de crecimiento epidérmico, o EGFR por sus siglas en inglés, es una diana atractiva para el desarrollo de inmunoconjugados anticáncer debido a la expresión del antígeno en muchos tumores y su rápida internalización. Sin embargo, debido a que EGFR también se expresa en tejidos de la piel, los agentes con diana en EGFR, tales como los anticuerpos cetuximab y panitumumab, también muestran niveles de toxicidad para la piel que existen una reducción de la dosis o, en algunos casos, son tan severos que justifican la interrupción del tratamiento.

Con los inmunoconjugados, se amplifica la toxicidad de dichos anticuerpos mediante conjugación con una toxina celular potente. Ello exacerba el problema para anticuerpos que ya son inherentemente tóxicos para las células normales. Por ejemplo, la conjugación con un maitansinoide tóxico causó toxicidad grave para las células de la piel al administrarlo mediante un anticuerpo de CD44v6. En consecuencia, el desarrollo de inmunoconjugados anti-EGFR basado en anticuerpos anti-EGFR autorizados no se ha perseguido debido a problemas relacionados con la toxicidad potenciada para la piel de dichos inmunoconjugados. Se están buscando estrategias alternativas para el desarrollo de inmunoconjugados anti-EGFR.

Actualmente se están diseñando inmunoconjugados anti-EGFR específicamente para resolver estas cuestiones de seguridad. Estos conjugados se basan en anticuerpos con diana en una versión mutada, aunque presente naturalmente, de EGFR, conocida como EGFRvIII, o en formas conformacionales de EGFR, ambas predominantes sobre las células tumorales y no sobre las células de la piel (documentos nº US 7628986 y nº US 7589180, respectivamente). Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR mAb806 es un anticuerpo con diana en un epítipo de EGFR observado únicamente sobre células de cáncer y potencialmente ofrece la ventaja respecto a los anticuerpos de EGFR actuales, la totalidad de los cuales muestra unión significativa a órganos normales, tales como la piel, en seres humanos. Con esta especificidad, se reconoce que "la ventaja más importante de mAb 806 en comparación con los anticuerpos de EGFR actuales, es que mAb 806 puede conjugarse directamente con agentes citotóxicos", un enfoque no viable con otros anticuerpos de EGFR ya que la "conjugación citotóxica prácticamente con seguridad induciría toxicidad grave" (documento nº US 7589180). Un inmunoconjugado que comprende mAb 806 de EGFR unido a una carga antimicrotúbulos actualmente se encuentra en experimentación de fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados.

Continúan los esfuerzos mediante cribado para anticuerpos anti-EGFR desnudos e inmunoconjugados de los mismos,

a fin de identificar aquellos con actividad antagonista parcial contra EGFR y actividad reducida contra los queratinocitos (ver el documento nº US 2012/0156217), inmunoconjugados basados en anticuerpos anti-EGFR "enmascarados" que resultan preferentemente activados en el microambiente tumoral (documento nº WO 2009/025846) e inmunoconjugados basados en anticuerpos con afinidad intermedia que se acumulan preferentemente en el tumor y no en tejidos normales (documento nº WO 2012/100346). La totalidad de dichas estrategias está destinada a reducir las toxicidades para la piel y otros órganos que expresan EGFR, debido a que los anticuerpos anti-EGFR actualmente autorizados se consideran inadecuados para el desarrollo como inmunoconjugados.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un inmunoconjugado útil para tratar las células enfermas EGFR⁺, incluyendo células de cáncer EGFR⁺, y tumores que las comprenden. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para potenciar la citotoxicidad de un anticuerpo de EFR para las células enfermas selectivamente. Mediante dicho método, se evita esencialmente la potenciación de la toxicidad para las células normales.

Descripción resumida de la invención

La invención es tal como se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines informativos únicamente. Cualesquiera referencias en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para la utilización en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

La presente invención proporciona un método útil para potenciar la citotoxicidad de un anticuerpo de EGFR sobre células enfermas EGFR⁺ sin potenciar la citotoxicidad de las mismas sobre células EGFR⁺ normales, comprendiendo el método:

- (i) seleccionar, para la conjugación, un anticuerpo de EGFR que es un antagonista de EGFR completo y compite con cetuximab para la unión a EGFR,
- (ii) seleccionar, para la administración mediante el anticuerpo de EGFR, una toxina antimicrotúbulos,
- (ii) seleccionar, para el acoplamiento del anticuerpo de EGFR seleccionado y la toxina antimicrotúbulos, un conector y

producir un inmunoconjugado que incorpora el conector entre el anticuerpo y la toxina, proporcionando de esta manera un inmunoconjugado con una citotoxicidad que resulta potenciada contra las células enfermas EGFR⁺ y esencialmente no potenciada contra las células queratinocitos EGFR⁺, en el que el anticuerpo de EGFR seleccionado es un anticuerpo de EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada; la toxina antimicrotúbulos seleccionada es el maitansinoide DM-1 y el conector seleccionado es 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).

La presente invención proporciona además un inmunoconjugado que comprende: (i) un anticuerpo de EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada, y (ii) DM-1 conjugado con el mismo, mediante (iii) un conector que es SMCC, presentando el inmunoconjugado un efecto citotóxico respecto a una forma desnuda de dicho anticuerpo que ha sido (1) potenciada con respecto a las células de cáncer EGFR⁺ y (2) sustancialmente no alterada con respecto a los queratinocitos EGFR⁺.

La presente invención proporciona además un método para potenciar el efecto de un anticuerpo de EGFR sobre las células enfermas EGFR⁺ sin potenciar el efecto del mismo sobre las células EGFR⁺ normales, que comprende unir dicho anticuerpo de EGFR a DM-1 mediante un conector SMCC, en el que el anticuerpo de EGFR presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada.

La presente invención proporciona además un anticuerpo de EGFR en una forma conjugada con DM-1 mediante un conector SMCC para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto que se presenta con un tumor que responde al tratamiento con un anticuerpo de EGFR, en el que el tratamiento induce una respuesta adversa mediada por anticuerpos de EGFR por queratinocitos, en el que la respuesta tumoral al tratamiento con el anticuerpo de EGFR conjugado se potencia esencialmente sin potenciar la respuesta adversa en queratinocitos al tratamiento, respecto al tratamiento con anticuerpo desnudo solo, en el que el anticuerpo de EGFR presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 pra la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de la invención en una cantidad citotóxica para las células enfermas EGFR⁺ y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además un método para producir una composición anticáncer, que comprende la etapa de combinar un portador farmacéuticamente aceptable y un inmunoconjugado de la invención.

La presente invención proporciona además el inmunoconjugado de la invención o la composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de la invención para la utilización en un método de tratamiento del cáncer.

La presente invención se llevó a cabo a partir del resultado inicial inesperado de que la conjugación del anticuerpo anti-EGFR cetuximab a un maitansinoide tóxico mediante un conector no escindible rinde un inmunoconjugado que muestra citotoxicidad potenciada contra células de cáncer sin un incremento correspondiente de citotoxicidad contra las células de la piel. El inventor demuestra que la actividad de algunos anticuerpos anti-EGFR contra tanto el cáncer como los queratinocitos resulta fuertemente potenciada por la unión a maitansinoides y otros agentes eliminadores de células, mientras que la actividad de cetuximab conjugado con maitansinoide se potencia sólo contra las células de cáncer y no contra los queratinocitos. En estos estudios, se encontró, tal como se esperaba, que los conjugados de cetuximab con agentes eliminadores de células diferentes de las toxinas antimicrotúbulos, tales como la saporina, presentaba una toxicidad auxiliar y significativamente potenciada para los queratinocitos.

Se demuestra además que otro anticuerpo con actividad antagonista completa de EGFR, es decir, el panitumumab (no reivindicado) también demuestra potenciación selectiva en las células EGFR⁺ al conjugarlo con una carga antimicrotúbulos, tal como un maitansinoide, al mostrar toxicidad para las células de cáncer EGFR⁺ pero sin afectar a las células EGFR⁺ normales, tales como los queratinocitos.

Basándose en estos resultados y en otros resultados dados a conocer en la presente memoria, la presente invención permite la selección de componentes esenciales para rendir un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de EGFR y una carga tóxica que potencia la actividad del anticuerpo de las células de cáncer pero no de células normales, tales como los queratinocitos. Los inmunoconjugados con dicha propiedad requieren la selección de un anticuerpo de EGFR que sea un antagonista total, una toxina que sea un agente antimicrotúbulos, y un conector que más deseablemente no sea escindible. Mediante la aplicación de dichos criterios, se proporciona un inmunoconjugado a base de anticuerpo de EGFR que presenta una actividad terapéutica significativa contra las células de cáncer EGFR⁺ sin un incremento correspondiente de toxicidad contra las células EGFR⁺ normales, incluyendo células de la piel tales como queratinocitos. La falta de potenciación adicional de la toxicidad contra las células de la piel resulta crítica, ya que los anticuerpos con diana en EGFR desnudos ya se caracterizan por toxicidades dermatológicas de alta prevalencia y resulta beneficioso no potenciar dichos efectos secundarios.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto general, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo con actividad antagonista total en EGFR, y una toxina conjugada con el mismo mediante un conector no escindible, en el que el inmunoconjugado presenta un efecto citotóxico respecto a una forma desnuda del anticuerpo que no resulta esencialmente potenciada con respecto a los queratinocitos EGFR⁺. El efecto citotóxico del inmunoconjugado con respecto a las células de cáncer EGFR⁺ resulta deseablemente potenciado. La carga tóxica deseablemente es una toxina antimicrotúbulos.

También en un aspecto general, se proporciona un método útil para potenciar la actividad anticáncer de un anticuerpo de EGFR sin potenciar el efecto del mismo sobre las células EGFR⁺ normales, comprendiendo el método:

- (i) seleccionar, para la conjugación, un anticuerpo de EGFR que es un antagonista de EGFR completo y compete con cetuximab para la unión a EGFR,
- (ii) seleccionar, para la administración mediante el anticuerpo de EGFR, una toxina antimicrotúbulos,
- (ii) seleccionar, para el acoplamiento del anticuerpo de EGFR seleccionado y la toxina antimicrotúbulos, un conector y

producir un inmunoconjugado que incorpora el conector entre el anticuerpo y la toxina, proporcionando de esta manera un inmunoconjugado que presenta una citotoxicidad que resulta potenciada contra las células EGFR⁺ enfermas y que no resulta esencialmente potenciada contra las células queratinocitos EGFR⁺ normales.

En un aspecto particular de la exposición, se proporciona un inmunoconjugado que comprende cetuximab y una toxina conjugada con el mismo, en el que el inmunoconjugado presenta un efecto citotóxico respecto al cetuximab desnudo que: (1) resulta potenciado respecto a las células de cáncer EGFR⁺ y (2) no resulta sustancialmente potenciado con respecto a los queratinocitos EGFR⁺, en el que el inmunoconjugado comprende cetuximab y una toxina antimicrotúbulos, tal como maitansinoide DM-1 conjugada con un conector no escindible. En realizaciones alternativas de la invención, el cetuximab es un equivalente de cetuximab, tal como un fragmento de unión a EGFR del cetuximab, o una variante ligante de EGFR del cetuximab que incorpora una o dos o más sustituciones benignas en la región constante o región marco del anticuerpo sin afectar a la unión del anticuerpo al receptor o a la eliminación celular mediada por el conjugado de anticuerpo. Por ejemplo, el cetuximab quimérico puede humanizarse adicionalmente mediante métodos estándares para crear una versión de tipo más humano del anticuerpo. Alternativamente, puede desarrollarse un anticuerpo anti-EGFR totalmente humano, tal como necitumumab, también conocido como IMC-11F8, que se considera funcionalmente equivalente al cetuximab, mediante cribado de una biblioteca de Fab humana para un anticuerpo que pueda unirse e inhibir fuertemente EGFR y competir con el cetuximab para la unión a receptores (Li S., Kussie P., Fergusson KM, Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-11F8. Structure. 16(2):216-27, feb. de 2008).

En otro aspecto particular de la exposición, se proporciona un inmunoconjugado que comprende panitumumab y una toxina conjugada con el mismo, en el que el inmunoconjugado presenta un efecto citotóxico respecto al panitumumab

desnudo que (1) resulta potenciado respecto a las células de cáncer EGFR⁺ y (2) resulta sustancialmente inalterado con respecto a los queratinocitos EGFR⁺, en el que el inmunoc conjugado comprende panitumumab y una toxina antimicrotúbulos, tal como el maitansinoide DM-1, conjugado con un conector no escindible. En realizaciones alternativas de la exposición, el panitumumab es un fragmento de unión a EGFR del panitumumab, o es una variante del panitumumab que incorpora una, dos o más sustituciones benignas aunque mantiene las características de unión a EGFR e inhibitoras de la molécula parental de panitumumab.

En realizaciones preferentes, la conjugación del anticuerpo y la toxina se consigue utilizando un conector no escindible. Con los conectores no escindibles, la liberación de la carga citotóxica se produce mediante destrucción intracelular del conjugado de fármaco por lisosomas. Un conector no escindible es sustancialmente resistente a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa o escisión de enlaces disulfuro, mientras que los conectores escindibles, que pueden utilizarse opcionalmente aunque menos deseablemente, son conectores que pueden escindirse con uno o más de dichos agentes de escisión indicados. Entre los ejemplos de dichos conectores no escindibles se incluyen aquellos que son o pueden derivarse de una fracción a base de haloacetilo seleccionada del grupo que consiste en N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP). Alternativamente, el conector no escindible es o se deriva de una fracción a base de maleimido seleccionada del grupo que consiste en 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), N-succinimidil éster de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil-éster de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster de ácido ϵ -maleimidcaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB) y N-(p-maleimidofenil)isocianate (PMPI); otro conector no escindible es maleimidocaproilo. (ver documento nº US 2005/169933; Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395-399, 1979; Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63, 1984; y Liu et al, 18 690-697, 1979, y Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17(1):114-24, enero-feb. de 2006 para más información).

En una realización preferente, la conjugación se lleva a cabo utilizando un reactivo de entrecruzamiento no escindible como conector, tal como 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC). Entre otras formas útiles de conectores no escindibles se incluyen yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), sulfo-SMCC, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS y succinimidil-yodoacetato, tal como se indica en la literatura, que introduce 1 a 10 grupos reactivos. (ver Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399, 1979; Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63, 1984, y Liu et al, 18 690-697, 1979). Resultan particularmente útiles para unir las auristatinas como toxina antimicrotúbulos, los conectores maleimidocaproilo no escindibles indicados en Doronina et al., Bioconjugate Chem. 17(1):114-24, enero-feb. de 2006). 114-24). Según la invención, el conector es SMCC.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el presente inmunoc conjugado a base de anticuerpo de EGFR en una cantidad citotóxica para las células de cáncer EGFR⁺ y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, se proporciona la presente composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de las células de cáncer EGFR⁺. En un aspecto relacionado, se proporcionan el presente inmunoc conjugado en una cantidad citotóxica para las células de cáncer EGFR⁺ para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto que se presenta con una célula de cáncer EGFR⁺.

Estos aspectos y otros aspectos de la presente invención se describen a continuación en mayor detalle en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica contra queratinocitos de anticuerpos anti-EGFR desnudos y conjugados de maitansinoide de los mismos. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo colorimétrico basado en WST-8.

La figura 2 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica contra la línea de células de cáncer de anticuerpos anti-EGFR desnudos y conjugados de maitansinoide de los mismos. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo colorimétrico basado en WST-8.

Las figuras 1 y 2 en la presente memoria son reproducciones de figuras presentadas en el documento nº US 2012/0156217.

La figura 3 es un gráfico que muestra actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer H226 del anticuerpo anti-EGFR desnudo cetuximab y conjuados de maitansinoide del mismo. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas

concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 72 h a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

La figura 4 es un gráfico que muestra actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer A431 de anticuerpo anti-EGFR desnudo cetuximab y conjugados de maitansinoide del mismo. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 72 h a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

La figura 5 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica del anticuerpo anti-EGFR desnudo cetuximab y conjugados de maitansinoide del mismo contra la línea celular de queratinocitos normales HaCaT. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

La figura 6 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de anticuerpo anti-EGFR desnudo cetuximab y conjugados de maitansinoide del mismo contra queratinocitos primarios. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 72 h o 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

La figura 7 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de anticuerpo anti-EGFR desnudo panitumumab y conjugados de maitansinoide del mismo contra queratinocitos primarios. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 72 h o 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

La figura 8 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de anticuerpo anti-EGFR desnudo panitumumab y conjugados de maitansinoide del mismo contra queratinocitos primarios. Se sembraron aproximadamente 2.000 a 3.000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con diversas concentraciones de artículo de ensayo en medio de cultivo durante 72 h o 5 días a 37°C. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar.

Las figuras 9 a 13 muestra resultados con inmunoconjugados que incorporan elementos no seleccionados según los criterios prescritos en la presente memoria, tal como se comenta en el Ejemplo 4.

La figura 9 muestra que el panitumumab y el cetuximab son bloqueantes de la activación de EGFR muy fuertes y, de esta manera, no resultarán potenciados en queratinocitos normales mediante conjugación, mientras que anticuerpos parcialmente antagonistas, tales como J2898A, resultan potenciados (ver las figuras 10 y 11).

La figura 10 muestra que el anticuerpo anti-EGFR parcialmente antagonista por IMGN (J2989A) resulta potenciado mediante conjugación (IMGN289) en queratinocitos normales (ver también Setiady et al., Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 6 a 10 de abril de 2013; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res. 73(8 supl.): resumen nº 5463, 2013).

La figura 11 muestra que la toxicidad del anticuerpo mutante cetuximab, 6-LC (con afinidad reducida para convertirlo en parcialmente antagonista contra EGFR) resulta potenciada mediante conjugación con la carga mediante conector no escindible (6LC-DM1).

La figura 12 muestra los efectos del panitumumab y de panitumumab-DMI sobre los queratinocitos, y revela que la conjugación del panitumumab mediante conector no escindible con DM1 (Avid300-DM1) no incrementa su actividad contra las células normales; 2C9-DM1 es un conjugado de cetuximab-DMI utilizado a modo de control.

La figura 13 muestra que la conjugación del cetuximab con la carga antimicrotúbulos MMAE mediante un conector escindible (valina-citrulina) potencia su toxicidad contra tanto células normales como células de cáncer MDA-MB-468 (Cetux 2C9-MMAE), mientras que la conjugación mediante conector no escindible (SMCC) sólo (Cetux2C9-DM1) potencia la actividad anticáncer, demostrando de esta manera una ventana terapéutica favorable.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Los presentes inmunoconjugados se basan en anticuerpos que se unen al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR_h), una proteína que se presenta sobre la superficie de muchos tipos celulares diferentes, incluyendo particularmente células de piel, tales como queratinocitos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "EGFR_h" se refiere a cualquier proteína que comprende el producto expresado y procesado del gen *her-1* humano, en el que la proteína se designa UniProtKB/Swiss-Prot P00533. El término EGFR se utiliza genéricamente en la presente memoria y se refiere a la proteína de tipo salvaje y todas las variantes naturales de la misma. El término "EGFRwt" se utiliza más específicamente en referencia únicamente a la forma de tipo salvaje de EGFR humano. El término "EGFRVIII" se refiere a la proteína variante de EGFR que comprende el producto expresado y procesado de una variante del gen *her-1* sin los exones 2 a 7 e incluye de esta manera únicamente la secuencia polipeptídica codificada por los exones 1 y 8 de *her-1*. El término "dominio III" no está relacionado con EGFRVIII y por el contrario se refiere a una localización dentro de EGFR y representa un sitio extracelular que es clave para la unión de ligando de EGF y la unión de anticuerpos altamente antagonistas cetuximab y panitumumab (Voigt et al., 14(11): 1023-1031, noviembre de 2012).

Los presentes inmunoconjugados comprenden un anticuerpo de EGFR que es un antagonista total de EGFR. Un anticuerpo de EGFR que es un "antagonista total" es un anticuerpo que bloquea por completo o prácticamente por completo la transmisión de una señal que resulta estimulada, durante el curso normal, por el ligando de EGF mediante

EGFRwt a la tirosina quinasa acoplada con EGFRwt. Los anticuerpos de EGFR que son antagonistas totales son particularmente anticuerpos de EGFR que se unen directamente a EGFR dominio III. Los anticuerpos de EGFR presentan dichas propiedades y una afinidad de unión de EGFR de 5 nanomolar (nM) o menos resultan particularmente preferentes para la inclusión en los presente inmunoconjugados. Mediante dicha medida, y tal como se muestra en la figura 9, por lo menos los anticuerpos conocidos siguientes no resultan adecuados para la utilización en los presentes inmunoconjugados: J2898A, intellimab 6-LC (una variante de cetuximab que se enseña en el documento n°WO 2012/100346), nimotuzumab y matuzumab.

Se encontró que, al seleccionar un anticuerpo de EGFR antagonista total para administrar una carga tóxica, el efecto de eliminación resulta potenciado únicamente en células de cáncer EGFR⁺ y no en células EGFR⁺ normales, tales como queratinocitos. Este no es el caso cuando el anticuerpo de EGFR es un antagonista parcial, es decir, un anticuerpo que permite la transmisión de alguna señal mediada por EGF. Al conjugarse con una toxina, dichos anticuerpos antagonistas parciales muestran una potenciación del efecto de eliminación tanto en células normales que son EGFR⁺ y células de cáncer que son EGFR⁺.

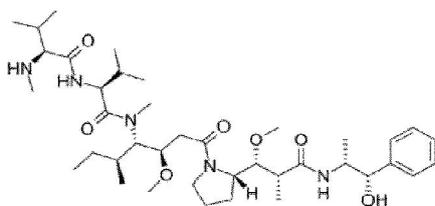
Los presentes inmunoconjugados se basan más particularmente, en una realización, en el anticuerpo de EGFR_h conocido como cetuximab, ahora disponible comercialmente de Eli Lilly y Company bajo el nombre comercial Erbitux®. El cetuximab es un anticuerpo IgG1 quimérico humano/de ratón recombinante que se une específicamente al dominio extracelular de EGFRwt. Las secuencias de aminoácidos de las CDR para tanto la cadena pesada de cetuximab (SEC ID n° 1 a n° 3) como la cadena ligera de cetuximab (SEC ID n° 4 a n° 6) se listan en la presente memoria. También se listan las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC ID n° 7) y de la región variable de cadena ligera (SEC ID n° 8) de cetuximab, junto con las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada completa (SEC ID n° 9) y cadena ligera completa (SEC ID n° 10) de cetuximab. Según la invención, el anticuerpo de EGFR presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 10 para la cadena ligera y SEC ID n° 9 para la cadena pesada. Las variantes de cetuximab útiles en la presente memoria son agentes de unión a EGFR altamente anagonistas que compiten con el cetuximab para la unión a EGFR humano. Anteriormente en la presente memoria se han mencionado variantes de cetuximab útiles y entre ellas se incluyen fragmentos de cetuximab que comprenden los sitios de unión a EGFR del cetuximab, tales como la totalidad de las CDR de cadena ligera y cadena pesada indicadas en la presente memoria. Otras variantes de cetuximab útiles en la presente memoria son variantes de cetuximab que incorporan una, dos o más sustituciones fuera de los dominios de unión a antígeno, tal como en la región marco o en la región constante (Fc). Dichas sustituciones son benignas en el sentido de que no reducen la citotoxicidad respecto al cetuximab de por sí.

En otra realización de la exposición, los presentes inmunoconjugados se basan en el anticuerpo de EGFR conocido como panitumumab, actualmente disponible comercialmente y comercializado bajo el nombre comercial Vectibix®. El panitumumab es un anticuerpo IgG2 totalmente humano recombinante que se une específicamente al dominio extracelular de EGFRwt. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras del panitumumab se listan en los documentos n° US 6.235.883 y n° US 7.807.798. Una alternativa útil al panitumumab es una variante de unión a EGFR del mismo que compite con el panitumumab para la unión de EGFR, tal como un fragmento de panitumumab que incorpora sus sitios de unión a antígenos pero presenta una región constante de otro modo perdida o alterada.

Los presentes inmunoconjugados de la exposición pueden basarse además en todavía otros anticuerpos de EGFR con la condición de que muestren una actividad antagonista completa tal como se ha definido anteriormente, tal como anticuerpos de EGFR que se unen selectivamente al dominio III de EGFR y cualesquiera otros anticuerpos de EGFR que compiten con EGF y bloquean totalmente o prácticamente por completo la transmisión de la señalización corriente abajo estimulada por EGF.

En los presentes inmunoconjugados, el anticuerpo de EGFR antagonista total, tal como cetuximab, se conjuga con una toxina antimicrotúbulos, tal como toxina maitansinoide. La expresión "toxina antimicrotúbulos" se refiere a un agente con toxicidad celular mediada por interferencia con las estructuras de microtúbulos importantes para la mitosis celular, tal como mediante inhibición de la formación de tubulina o mediante la inhibición de la organización de la misma.

Incluidas dentro de dicha familia de toxinas se encuentran los maitansinoides y auristatinas, y muchos otros agentes desarrollados más recientemente y que presentan el mismo mecanismo de acción. Las auristatinas en particular bloquean la replicación celular mediante inhibición de la polimerización de la tubulina y son, de esta manera, antimitóticos. La estructura de una auristatina útil en la presente memoria y conocida como MMAE, o vedotina, se muestra a continuación:



5 Existen diversas formas de maitansinoides que resultan útiles. Todas se basan en la estructura compleja de una molécula natural: maitansina.

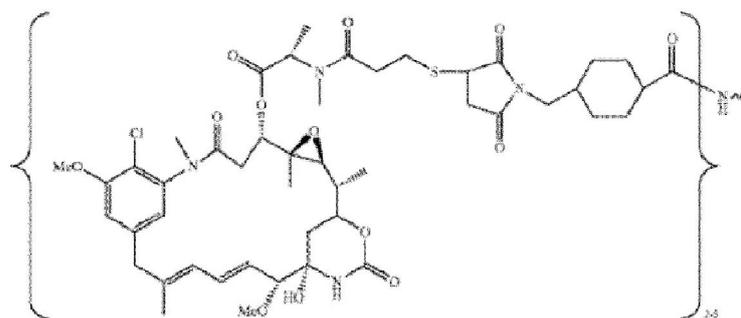
Resultan particularmente útiles los maitansinoides, incluyendo DM-1 y DM-4. Según la invención, la toxina acoplada con mAb de EGFR es DM-1 con la estructura mostrada posteriormente.

10 También resultan útiles como toxinas antimicrotúbulos, las dolostatinas, las auristatinas, las tubulisinas y las criptoficinas. Entre los ejemplos específicos de especies útiles dentro de cada género se incluyen dolostatina-10, mono-metil dolostatina-10, auristatina E, mono-metil auristatina E (MMAE), auristatina F, monometil auristatina F, HTI-286, tubulisina M, así como ligantes de la tubulina, tales como tubulisina IM-1, tubulisina IM-2, tubulisina IM-3, colchicina DA y los maitansinoides AP-3, DM-1 y DM-4.

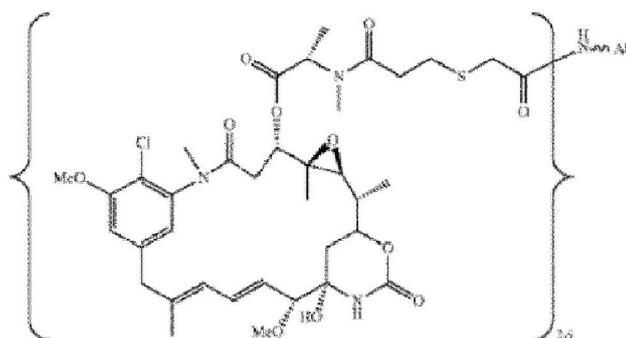
15 Pueden formarse conjugados de un anticuerpo de EGFR antagonista total, tal como el cetuximab, y una toxina antimicrotúbulos, tal como un maitansinoide o auristatina, utilizando cualquier técnica actualmente conocida o desarrollada posteriormente que acople un conector que sea "no escindible". Dichos conectores se mantienen intactos y conservan el anticuerpo y la toxina en asociación covalente, durante condiciones normalmente presentes tras la administración en un sujeto, incluyendo en medios extracelulares. Más específicamente, los conectores no escindibles resultan en constructos de ADC de los que se consigue la liberación de la carga citotóxica mediante destrucción del anticuerpo por lisosomas intracelulares.

25 Los métodos de integración del conector se describen en, por ejemplo, los documentos nº US 5.208.020, nº US 8.088.387 y nº US 6.441.163. Un método preferente es la modificación del anticuerpo de EGFR, p.ej., el cetuximab, con 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimido, seguido de la reacción del anticuerpo modificado con un maitansinoide que contiene tiol, proporcionando un conjugado unido a tioéter. Las estructuras químicas resultantes se muestran posteriormente. Resultan conjugados con 1 a 10 moléculas de fármaco por cada molécula de anticuerpo.

30



Antic.-SMCC-DM1
Antic. - Anticuerpo



Antic.-SIA-DMI
Antic. - Anticuerpo

Entre otras formas útiles de conectores no escindibles se incluyen yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), sulfo-SMCC, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), sulfo-MBS y yodoacetato de succinimidilo, tal como se indica en la literatura, para introducir 1 a 10 grupos reactivos. (ver Yoshitake et al, 101 Eur. J. Biochem. 395-399, 1979; Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63, 1984, y Liu et al, 18 690-697, 1979). Resultan particularmente útiles para unir las auristatinas como toxina antimicrotúbulos, los conectores maleimidocaproilo no escindibles que se indican en Doronina et al, in Bioconjugate Chem. 17(1):114-24, enero-febrero de 2006).

Según la invención, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo de EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada unida a DM-1 mediante un conector SMCC.

En ora realización específica de la exposición, el inmunoc conjugado comprende panitumumab unido a DM-1 mediante un conector SMCC.

De esta manera, en un aspecto general, la exposición proporciona un método útil para potenciar la actividad anticáncer de un anticuerpo de EGFR sin potenciar el efecto del mismo sobre células EGFR⁺ normales, en el que el método comprende:

- (i) seleccionar, para la conjugación, un anticuerpo de EGFR que es un antagonista de EGFR total,
- (ii) seleccionar, para la administración mediante el anticuerpo de EGFR, una toxina antimicrotúbulos,
- (iii) seleccionar, para acoplar el anticuerpo de EGFR seleccionado con la toxina antimicrotúbulos, un conector que es no escindible, e

incorporar el conector entre el anticuerpo y la toxina para proporcionar un inmunoc conjugado con una actividad citotóxica que resulta potenciada contra las células enfermas EGFR⁺ pero no contra células EGFR⁺ normales.

Tal como se apreciará a partir de la exposición anterior, el anticuerpo de EGFR antagonista total según la invención presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 para la cadena ligera y SEC ID nº 9 para la cadena pesada. La toxina antimicrotúbulos es preferentemente una auristatina o un maitansinoide, y según la invención es DM-1. El conector no escindible es, según la invención, SMCC.

En otro aspecto específico de la exposición, existe la condición de que el anticuerpo de EGFR antagonista total no sea cetuximab. En una realización específica adicional, existe la condición de que el anticuerpo de EGFR antagonista total no sea panitumumab.

Se preparan formulaciones terapéuticas del conjugado para la utilización terapéutica directamente o para el almacenamiento mediante mezcla del conjugado que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. Ed. (editor), 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables resultan no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas tales como suero, albúmina, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contraiones formadores de sales, tales como sodio, complejos metálicos (p.ej., complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos que deben utilizarse para la administración in vivo deben ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el conjugado, encontrándose las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Los conjugados resultan útiles para tratar células enfermas EGFR⁺. Dicho tratamiento resulta en una reducción del número, tamaño o distribución de dichas células enfermas en sujetos que se presentan con ellas. En realizaciones,

los conjugados se utilizan para tratar células enfermas EGFR⁺ que son células de cáncer EGFR⁺ y tumores que las comprenden. Dicho tratamiento resulta preferentemente en una reducción del número, tamaño, volumen o distribución de dichas células de cáncer y tumores que las comprenden, o por lo menos en una reducción de la tasa a la que dichas células enfermas se incrementan en número, tamaño, volumen o distribución de dichas células y tumores en sujetos que se presentan con ellos.

Los sujetos que se presentan con células de cáncer EGFR⁺ pueden identificarse con la ayuda de ensayos que detectan el receptor, como proteína o como precursor de ácido nucleico (ADN o ARN) en muestras fisiológicas, tales como tejido biopsiado. Un ensayo adecuado para la proteína EGFR es el kit de ensayo e Dako pharmDx® de EGFR disponible comercialmente y autorizado por la FDA.

Para el tratamiento de sujetos que se presentan con células de cáncer EGFR⁺, la dosis apropiada del conjugado dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, tal como se ha definido anteriormente, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El agente se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (p.ej., 0,1 a 20 mg/kg) de conjugado es una dosis candidata para la administración en el paciente, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede estar comprenda entre 1 µg/kg y 500 mg/kg o más, dependiendo de los factores indicados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden resultar útiles. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales. De esta manera, se apreciará que una cantidad eficaz del inmunconjugado es una cantidad eficaz por sí solo o como parte de un régimen de tratamiento que retrasa o inhibe la tasa de crecimiento o la proliferación de las células enfermas EGFR⁺.

Una célula enferma EGFR⁺ es una célula enferma que presenta EGFR sobre su superficie como detectable, por ejemplo mediante la unión de anticuerpo de EGFR, o mediante la detección del ARNm intracelular codificante de *her-1*. Entre las células enfermas EGFR⁺ particulares se incluyen las que presentan sobre su superficie una densidad y/o actividad anormalmente elevada de moléculas de EGFR, o la presencia de la variante EGFRvIII de EGFR.

Puede resultar útil administrar los presentes conjugados mediante infusión intravenosa en primer lugar como dosis de carga, seguido de una dosis de mantenimiento, tal como una dosis inicial de 4 mg/kg durante 90 minutos, seguido de 2 mg/kg durante 30 minutos, una vez a la semana durante hasta 52 semanas, resultando necesario un seguimiento. En el caso específico del conjugado de panitumumab, las dosis podrían estar basadas en las utilizadas para el panitumumab por sí solo, que comprenden 6 mg/kg administrados una vez cada dos semanas en forma de una infusión de una hora.

Los conjugados resultan útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres, para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células de cáncer EGFR⁺ y los tumores que las comprenden, incluyendo cánceres de células hematopoyéticas y tumores sólidos. Entre las condiciones o trastornos que deben tratarse se incluyen tumores benignos o malignos (p.ej., renal, hepático, de tiñón, vejiga, mama, gástrico, ovárico, colorrectal, prostático, pancreático, pulmonar, vulvar y de tiroides), carcinomas hepáticas, sarcomas, glioblastomas y diversos tumores de cabeza y cuello, leucemias y neoplasias malignas linfoides. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento bivalente se utiliza en el tratamiento de células de cáncer que expresan EGFRvIII, según se determine mediante ensayos de cribado indicados en la presente memoria. En realizaciones particulares, las células de cáncer son células de cáncer que se presentan como EGFR⁺, entre las que se incluyen cánceres de cabeza y cuello y especialmente carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cánceres colorrectales, cánceres gastrointestinales, tumores cerebrales, incluyendo glioblastomas, y tumores de pulmón, incluyendo carcinoma pulmonar de células no pequeñas, y de mama, páncreas, esófago, riñón, ovario, cuello uterino y próstata. En realizaciones específicas, el cáncer EGFR⁺ es uno para el que el cetuximab ha recibido la autorización de comercialización de la FDA, tal como el carcinoma de células escamosas de los cánceres de cabeza y cuello y colorrectal.

Se apreciará que entre los sujetos que podrían resultar beneficiados del presente método se incluyen mamíferos que incluyen seres humanos, así como vacas y animales de compañía.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de los conjugados de la presente invención. Por ejemplo, el paciente que debe tratarse también puede recibir terapia de radiación, tal como radiación con un haz externo. Alternativamente, o adicionalmente, puede administrarse en el paciente un agente quimioterapéutico. Los regímenes de preparación y administración para dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse según las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el experto en la materia. Los regimens de preparación y administración para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del conjugado o puede administrarse simultáneamente con el mismo. El conjugado puede agruparse con cualesquiera

toxinas anticáncer, o cualquier otro fármaco adecuado, particularmente incluyendo irinotecán (CPT-11), cisplatino, ciclofosfamida, melfalán, dacarbazina, doxorubicina, daunorrubicina y topotecán, así como inhibidores de tirosina quinasa, incluyendo particularmente los inhibidores de EGFR quinasa, tales como AG1478 ((4-(3-cloroanilino-6,7-dimetoxiquinazolina), gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tykerb®), canertinib (PD183805, Pfizer), PKI-166 (Novartis), PD158780 y pelitinib.

También puede resultar deseable administrar anticuerpos o conjugados contra otros antígenos asociados a tumor o sus ligandos, tales como anticuerpos que se unen a ErbB2 (incluyendo trastuzumab, comercializado como Herceptin®, y pertuzumab, comercializado como Omnitarg®), ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF) y/o anticuerpos que se unen a EGF o TGF α .

En otro aspecto de la exposición, se proporciona un artículo fabricado que contiene conjugado en una cantidad útil para el tratamiento de los trastornos indicados en la presente memoria. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y probetas. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta eficaz para tratar la condición y puede presentar un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en el recipiente o asociado al mismo indica que la composición se utiliza para el tratamiento de una condición de cáncer. El artículo fabricado puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e impresos en el envase con instrucciones de utilización.

Un inmunoconjugado anticáncer según la invención puede estar destinado a la administración con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable en una forma de dosis unitaria. Las dosis unitarias del conjugado son convenientemente 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg y 400 mg. El fármaco puede formularse en viales de un solo uso a una concentración tal como 20 mg/ml, por ejemplo de 100 mg en 5 ml de vehículo, tal como solución salina al 0,9, 200 mg en 10 ml o 400 mg en 20 ml.

Puede utilizarse cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo la administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, pulmonar u oral.

Ejemplo 1 - Preparación de conjugado de Cetuximab-SMCC-DMI (A-H)

A. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DEL ANTICUERPO CETUXIMAB

Se obtuvo cetuximab del mercado abierto o se produjo tal como se indica en el documento n° WO 2012/100346, para la conjugación con DM1 utilizando el reactivo entrecruzante heterobifuncional no escindible SMCC.

A continuación, se intercambié el tampón del anticuerpo cetuximab por el tampón de fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5 (tampón A) Todos los tampones en el presente experimento se analizaron para confirmar que estaban libres de endotoxinas utilizando un método de lisado de amebocitos de Limulus cromogénico (Cambrex). Se midió la concentración del anticuerpo utilizando un coeficiente de extinción de 1,45 ml/mg/cm a 280 nm y un peso molecular de 145.781 g.

B. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE SMCC

Se preparó una solución 20 mM de SMCC (6,69 mg/ml) (Concortis Biosystems Corp.) en DMSO. La solución se diluyó 1/40 en tampón de ensayo y se midió la absorbancia de las muestras a 302 nm. Se calculó la concentración de la solución madre utilizando un coeficiente de extinción molar de 602/M/cm.

C. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE DM1

Se preparó una solución 10 mM de DM1 (forma tiol libre, Concortis Biosystems Corp.) en DMA (7,37 mg/ml). La absorbancia de diluciones de la solución madre en etanol se midió a 280 nm. Se calculó la concentración de la solución madre de DM1 mediante la utilización de un coeficiente de extinción molar de 5700/M/cm a 280 nm. Se midió la concentración de SH libre en la preparación de solución madre de DM1 utilizando reactivo de Elman (DTNB). Se prepararon diluciones de la solución madre en tampón de ensayo preparado en DMA al 3% (v/v) y después se añadió DTNB 100 mM en DMSO (1/100 del volumen). Se midió el incremento de la absorbancia a 412 nm frente a un blanco de reactivo y se calculó la concentración utilizando un coeficiente de extinción de 14150/M/cm. La concentración de -SH resultante del ensayo de Elman se utilizó para representar la concentración de solución madre de DM1 en los cálculos para las condiciones de conjugación.

D. MODIFICACIÓN DE CETUXIMAB CON ENTRECruzANTE SMCC

Se modificó el anticuerpo utilizando un exceso de 7,5 veces molares de SMCC a una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml. La reacción se llevó a cabo en tampón A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 5 horas a temperatura ambiente bajo agitación.

5

E. CROMATOGRAFÍA G25 PARA ELIMINAR EL EXCESO DE SMCC

La mezcla de reacción de cetuximab-SMCC se filtró a través de gel por una columna preempaquetada de 1,5x4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en tampón A. Los volúmenes de carga y elución fueron los indicados en las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). La concentración de la solución de anticuerpo modificado se sometió a ensayo espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción indicado anteriormente.

10

F. CONJUGACIÓN DE CETUXIMAB-SMCC CON DM1

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso de 1,7 veces de DM1 respecto a conector (suponiendo 5 conectores por cada anticuerpo). La reacción se llevó a cabo a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml en tampón A (94% v/v) con DMA (6% v/v). Tras la adición de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16,5 horas bajo agitación.

15

G. PURIFICACIÓN DE CONJUGADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN G25

La mezcla de reacción de conjugación se filtró a través de gel por una columna preempaquetada de 1,5x4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS), pH 6,5 tampón B). Los volúmenes de carga y elución fueron los indicados en las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). Se determinó el número de moléculas de DM1 unidas a cada mol de cetuximab mediante la medición de la absorbancia tanto a 252 nm como a 280 nm del material eluido. Se encontró que las proporciones de DM1/anticuerpo eran de 2 y 4. El conjugado resultante se analizó para la unión y la citotoxicidad.

25

H. ENSAYOS DE CETUXIMAB-SMCC-DM1

30

Las líneas celulares utilizadas en los presentes estudios presentaban las características siguientes:

A431: carcinoma epitelial humano de la línea celular vulvar; disponible de la ATCC; sembrada a razón de 4000 células/pocillo en DMEM-FBS al 10%, 100 µl/pocillo en placa de 96 pocillos.

35

H226: línea celular de carcinoma de células escamosas pulmonar, disponible de la ATCC; sembrada a razón de 4000 células/pocillo en RPMI-FBS al 10%, 100 µl/pocillo en placa de cultivo de 96 pocillos.

MDA-MB-468: glándula mamaria/mama, derivada de sitio metastásico: efusión pleural; disponible de la ATCC; sembrada a razón de 4000 células/pocillo en medio L-15 de Leibovitz formulado por la ATCC (nº de catálogo 30-2008) con suero fetal bovino añadido hasta una concentración final de 10%: 100 µl/pocillo en placa de 96 pocillos.

40

HaCaT: queratinocitos transformados espontáneamente in vitro procedentes de piel histológicamente normal; disponible del Chinese Center for Type Culture Collection de la Wuhan University; sembrados a razón de 2000 células/pocillo en DMEM-FBS al 10%, 100 µl/pocillo en placa de cultivo de 96 pocillos.

45

HEKa: queratinocitos epidérmicos primarios humanos normales, adulto; disponibles de PromoCell GmbH; sembrados a razón de 4000 células/pocillo en medio EpiLife, 100 µl/pocillo, medio EpiLife nº MEP1500CA, Invitrogen + complemento de crecimiento de queratinocitos humanos HKGS (nº S-001-5).

Los estudios de unión mostraron que la conjugación del anticuerpo a DM1 no afectó a la K_D ; tanto el anticuerpo cetuximab desnudo como el conjugado de cetuximab-SMCC-DM1 presentaban la misma afinidad de unión a EGFR según la resonancia del plasmón superficial (~0,3 nM, Tabla 1). La evaluación de la citotoxicidad in vitro de la muestra mostró que el conjugado de cetuximab-SMCC-DM1 era significativamente más citotóxico que el cetuximab contra las líneas celulares de cáncer (figs. 3 y 4), aunque inesperadamente cetuximab-SMCC-DM1 y el cetuximab desnudo presentaban la misma actividad citotóxica contra los queratinocitos (figs. 5 y 6).

50

Tabla 1: efectos de la conjugación con DM1 sobre la K_D del cetuximab

55

Muestra	nº de experimentos	EGFR ecd K_D (nM)
Cetuximab comercial	3	0,27 +/-0,02
Cetuximab-SMCC-DM1	3	0,28 +/-0,02

Se demostró el efecto de la conjugación de DM1 sobre los diferentes mAb de EGFR (ML66_hu y EGFR-7R_hu) en la solicitud publicada de patente US nº 2012/0156217 de ImmunoGen, y las figuras 1 y 2 en la presente memoria son reproducciones de figuras que aparecen en dicha solicitud. Más particularmente, tal como se muestra en la figura 1, la conjugación de anticuerpos anti-EGFR ML66_hu-SMCC-DM1 y EGFR-7R_hu a maitansinoides para crear los inmunoconjugados ML66_hu-SMCC-DM1 y EGFR-7R_hu-SMCC-DM1 incrementa la actividad citotóxica contra los queratinocitos normales. De manera similar, y tal como se esperaba, la conjugación de los anticuerpos anti-EGFR ML66hu y EGFR-7R_hu a los maitansinoides para crear los inmunoconjugados ML66_hu-SMCC-DM1 y EGFR-7R_hu-

60

SMCC-DM1 potencia significativamente la actividad citotóxica de los anticuerpos contra la línea celular de cáncer H226 (figura 2).

Tal como se muestra en las figuras 3 y 4, la conjugación de DM1 del anticuerpo anti-EGFR cetuximab (HC-LC) para crear el inmunoconjugado cetuximab-SMCC-DMI (HC-LC/DM1) potencia significativamente la actividad citotóxica del anticuerpo contra las células de cáncer, tal como se esperaba y se muestra en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 4, y también como se esperaba, la conjugación del anticuerpo anti-EGFR cetuximab (HC-LC) a mantansinoides para crear el inmunoconjugado cetuximab-SMCC-CM1 (HC-LC/DM1) potencia significativamente la actividad citotóxica del anticuerpo contra las células de cáncer.

Sin embargo, y bastante inesperadamente, tal como se muestra en las figuras 5 y 6, la conjugación del anticuerpo anti-EGFR cetuximab (HC-LC) a mantansinoides para crear el inmunoconjugado cetuximab-SMCC-DM1 (HC-LC/DM1) no incrementó la citotoxicidad contra los queratinocitos, tal como se refleja en los valores de IC₅₀ sustancialmente iguales para estos agentes (IC₅₀ de 0,8269 para el conjugado vs. IC₅₀ de 0,4324 para el anticuerpo desnudo; Fig 5, HaCaT - queratinocitos humanos normales y IC₅₀ de 2,210 para el conjugado vs. IC₅₀ de 0,9348 para el anticuerpo desnudo, Fig 6; células queratinocitos humanos primarios HEKa-). Tal como se utiliza en la presente memoria, IC₅₀ se refiere a la concentración de fármaco requerida para eliminar 50% de las células.

La medida de si la citotoxicidad se ha incrementado o no se determinó anteriormente mediante comparación de los valores de IC₅₀ producidos utilizando el ensayo de viabilidad celular de azul Alamar (cada experimento se llevó a cabo por triplicado en una placa de 96 pocillos). Una diferencia de un log o menos se considera no significativa y se considera que revela la ausencia de cambio en la citotoxicidad, mientras que una diferencia superior a un log revela un cambio significativo de citotoxicidad.

Ejemplo 2 - Evaluación en primates

La especie de mono Cynomolgus se ha demostrado anteriormente que es un modelo valioso y altamente predictivo para evaluar las toxicidades de los anticuerpos anti-EGFR, incluyendo los efectos secundarios dermatológicos. El nivel elevado de correlación entre los datos de toxicidad en mono Cynomolgus y ser humano para anticuerpos con diana en EGFR se debe en parte a la elevada homología entre los receptores de EGFR de mono y humano, que resulta en valores de K_D muy similares para los anticuerpos.

Tabla 1: la afinidad de unión del cetuximab y el panitumumab a EGFR humano y de Cynomolgus es consistente en diferentes especies. Afinidad de anticuerpos aparente definida como la concentración de anticuerpo (picomolar, pM) requerida para conseguir una unión semimáxima en el ELISA con dominios extracelulares recombinantes de EGFR humano (EGFR_hu) y EGFR de mono Cynomolgus (EGFR_cy). Adaptado de Koefoed et al., MABS 3(6):584-595, nov.-dic. de 2011.

Afinidad aparente, ensayo ELISA		
Unión de dominio IIIB		
Antígenos	cetuximab	panitumumab
EGFRs humano (pM)	12	32
EGFRs de Cynomolgus (pM)	14	32

El inmunoconjugado de cetuximab-SMCC-DM1 se sometió a ensayo en primates, particularmente para identificar cualquier potenciación significativa de efectos secundarios del anticuerpo por la toxina conjugada sobre células normales. En particular, se prestó especial atención a los efectos secundarios dermatológicos que eran cualitativamente diferentes y/o que resultaban significativamente exacerbados respecto a lo esperado con el anticuerpo anti-EGFR totalmente antagonista desnudo.

El estudio inicialmente utilizó dos macacos Cynomolgus, todos macho que habían sido sedados con quetamina y anestesiados con isoflurano para facilitar la administración IV del conjugado de anticuerpo-fármaco administrado a razón de 10 mg/kg. A continuación, se observaron los animales durante 5 días antes del sacrificio para signos generales de toxicidad aguda y se examinaron adicionalmente.

El análisis histopatológico detallado no reveló toxicidades dermatológicas graves u otros efectos secundarios dermatológicos graves y cualitativamente nuevos aparte de los esperados como resultado del tratamiento con cetuximab desnudo. Además, no se observaron otras toxicidades graves en la diana en dichos animales, demostrando

la seguridad de los ADC de la presente invención y la ausencia de una exacerbación significativa de las toxicidades del anticuerpo desnudo.

5 Después de completar con éxito el estudio agudo en primates, se inició un estudio de seguridad de dosis repetidas en animales adicionales. El ADC se administró una vez cada tres semanas a una dosis de 10 mg/kg en 4 ciclos. Se seleccionó dicha dosis y régimen basándose en los programas de administración utilizados comúnmente con otros ADC en primates y seres humanos (Poon KA et al, Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1;273(2):298-313, dic. de 2013; impreso FDA en el envase para Kadcyra™, acceso el 24 de febrero, 2014: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/1254271bl.pdf).

10 Con la excepción de las elevaciones reversibles de enzimas hepáticos, que es un efecto secundario de clase esperado de los ADC, no se ha observado hasta el momento otros efectos secundarios dermatológicos o de otro tipo graves y/o cualitativamente nuevos en la diana aparte de los ya esperados como resultado del tratamiento con cetuximab desnudo (datos de cetuximab en mono *Cynomolgus* disponibles en http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/bla/2004/125084_ERBITUX_PHARMR_P3.PDF). En el presente estudio no se ha observado toxicidad severa en la piel y necrosis epidérmica tóxica informada con ADC anti-CD44v (que también utiliza tecnología de carga SMCC-DM1 y con diana e antígenos expresados por los queratinocitos normales) (Tijink et al., Clin. Cancer Res. 12:6064, 2006). Dichos datos de seguridad validan adicionalmente los resultados in vitro de que las toxicidades en la diana de anticuerpos anti-EGFR desnudos totalmente antagonistas no resulta significativamente potenciada como resultado de la conjugación con las cargas citotóxicas.

Ejemplo de referencia 3 - Preparación de conjugado de panitumumab-SMCC-DM1 (A-H)

25 Se preparó panitumumab conjugado con DM-1 esencialmente tal como se ha indicado anteriormente. para la contrapartida cetuximab. Más particularmente,

A. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DEL ANTICUERPO PANITUMUMAB

30 Se obtuvo panitumumab del mercado abierto o se produjo tal como se indica en la patente US nº 6.235.883 o nº 7.807.798 para la conjugación con DM1 utilizando el reactivo de entrecruzamiento heterobiuncional no escindible SMCC.

35 A continuación, se intercambió el tampón del anticuerpo panitumumab por tampón de fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 5 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5 (tampón A). Todos los tampones en el presente experimento se analizaron para confirmar que estaban libres de endotoxinas utilizando un método de lisado de amebocitos de *Limulus* cromogénico (Cambrex). Se midió la concentración del anticuerpo utilizando un coeficiente de extinción de 1,45 ml/mg/cm a 280 nm y un peso molecular de 145.781 g.

40 B. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE SMCC

Se preparó una solución 20 mM en DMSO de SMCC (6,69 mg/ml) (Concortis Biosystems Corp.). La solución se diluyó 1/40 en tampón de ensayo y se midió la absorbancia de las muestras a 302 nm. Se calculó la concentración de la solución madre utilizando un coeficiente de extinción molar de 602/M/cm.

45 C. PREPARACIÓN Y MEDICIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE DM1

Se preparó una solución 10 mM de DM1 (forma de tiol libre; Concortis Biosystems Corp.) en DMA (7,37 mg/ml). La absorbancia de diluciones de la solución madre en etanol se midió a 280 nm. Se calculó la concentración de la solución madre de DM1 mediante la utilización de un coeficiente de extinción molar de 5700/M/cm a 280 nm. Se midió la concentración de SH libre en la preparación de solución madre de DM1 utilizando reactivo de Elman (DTNB). Se prepararon diluciones de la solución madre en tampón de ensayo preparado en DMA al 3% (v/v) y después se añadió DTNB 100 mM en DMSO (1/100 del volumen). Se midió el incremento de la absorbancia a 412 nm frente a un blanco de reactivo y se calculó la concentración utilizando un coeficiente de extinción de 14150/M/cm. La concentración de -SH resultante del ensayo de Elman se utilizó para representar la concentración de solución madre de DM1 en los cálculos para las condiciones de conjugación.

D. MODIFICACIÓN DE PANITUMUMAB CON ENTRECRUZANTE SMCC

60 El anticuerpo se modificó utilizando un exceso molar de 7,5 veces de SMCC con 20 mg/ml de anticuerpo. La reacción se llevó a cabo en tampón A (95% v/v) con DMSO (5% v/v) durante 5 horas a temperatura ambiente bajo agitación.

E. CROMATOGRAFÍA G25 PARA ELIMINAR EL EXCESO DE SMCC

65 La mezcla de reacción de panitumumab-SMCC se filtró a través de gel por una columna preempaquetada de 1,5x4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en tampón A. Los volúmenes de carga y elución fueron los indicados en las

instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). La concentración de la solución de anticuerpo modificado se sometió a ensayo espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción indicado anteriormente.

F. CONJUGACIÓN DE PANITUMUMAB-SMCC CON DM1

El anticuerpo modificado se hizo reaccionar con un exceso de 1,7 veces de DM1 respecto a conector (suponiendo 5 conectores por cada anticuerpo). La reacción se llevó a cabo a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml en tampón A (94% v/v) con DMA (6% v/v). Tras la adición de DM1, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16,5 horas bajo agitación.

G. PURIFICACIÓN DE CONJUGADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN G25

La mezcla de reacción de conjugación se filtró a través de gel por una columna preempaquetada de 1,5x4,9 cm de resina Sephadex G25 equilibrada en solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS), pH 6,5 (tampon B). Los volúmenes de carga y elución fueron los indicados en las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). El número de moléculas de DM1 unidas por cada mol de panitumumab se determinó mediante medición de la absorbancia tanto a 252 nm como a 280 nm del material eluido. Se encontró que las proporciones de DM1/anticuerpo eran de 2 y 4. El conjugado resultante se analizó para la unión y la citotoxicidad.

H. ENSAYOS DE PANITUMUMAB-SMCC-DM1

Las líneas clulares utilizadas en dichos estudios presentaban las características siguientes: MDA-MB-468: glándula mamaria/mama, derivada de sitio metastásico: efusión pleural; disponible de la ATCC; sembrada a razón de 4000 células/pocillo en medio L-15 de Leibovitz formulado por la ATCC (nº de catálogo 30-2008) con suero fetal bovino añadido hasta una concentración final de 10%: 100 µl/pocillo en placa de 96 pocillos.

HaCaT: queratinocitos transformados espontáneamente in vitro a partir de piel histológicamente normal; disponible del Chinese Center for Type Culture Collection of Wuhan University; sembrado a razón de 2000 células/pocillo en DMEM-FBS al 10%, 100 µl/pocillo en placa de cultivo de 96 pocillos.

Los estudios in vitro con queratinocitos demostraron que la conjugación del panitumumab con una toxina antimicrotúbulos mediante un conector no escindible no potenciaba la toxicidad del anticuerpo. El ADC resultante presentaba un perfil de seguridad similar sobre queratinocitos que panitumumab desnudo, así como otro ADC basado en el anticuerpo totalmente antagonista, el cetuximab. En células de cáncer MDA-MB-468, se observó una potenciación significativa de la actividad anticáncer del panitumumab como resultado de la conjugación del anticuerpo con toxina antimicrotúbulos mediante conector no escindible. De manera similar a las observaciones de toxicidad, el ADC a base de panitumumab presentaba una actividad similar al ADC a base de cetuximab.

Ejemplo 4 - Resultados con conjugados de mAb EGFR antagonistas parciales

El efecto de la selección de componentes del inmunconjugado diferentes de los recomendados en la presente memoria se muestra en los dibujos adjuntos. La figura 9 muestra que un anticuerpo de EGFR antagonista parcial, denominado J2989a, presenta una actividad que resulta potenciada en queratinocitos normales al conjugarse con DM-1. La figura 10 muestra, de manera similar, que otro anticuerpo anagonista parcial, denominado 6-LC (una variante por sustitución del cetuximab con afinidad relativa más baja para EGFR) presenta una actividad que también resulta potenciada en queratinocitos normales al conjugarse con DM-1. La figura 11 muestra que el efecto del panitumumab de queratinocitos no resulta potenciado en queratinocitos al conjugarse con DM1, mientras que el efecto anticáncer del conjugado resulta drásticamente potenciado (figura 12). Y la figura 13 muestra que la conjugación del cetuximab con MMAE mediante un conector escindible (valina-citrulina) potencia su toxicidad contra células normales y células de cáncer MDA-MB-468, mientras ue la conjugación mediante conector no escindible (SMCC) potencia la actividad anticáncer.

De esta manera, en dichos estudios, sólo los anticuerpos anti-EGFR totalmente antagonistas no resultaron potenciados en células normales por la conjugación con carga mediante conectores no escindibles, mientras que la toxicidad contra las células normales de los anticuerpos de EGFR antagonistas parciales resultó potenciada por la conjugación. Además, los presentes inventores sometieron a ensayo posteriormente el efecto de dicho perfil de actividad de los conectores escindibles vs. no escindibles, manteniendo simultáneamente el mecanismo de acción de carga (es decir, el agente antimicrotúbulos). Los anticuerpos se conjugaron mediante conector escindible con la carga antimicrotúbulos, MMAE tal como se indica en Doronina et al, Nature Biotechnology, vol 21: páginas 778 a 784, 7 de nov. de 2003. Los datos de conector escindible demuestran que al conjugar los anticuerpos totalmente antagonistas con sus cargas mediante conectores escindibles, se potencia su toxicidad contra células normales. De esta manera, un ADC anti-EGFR seguro debería incorporar un anticuerpo anti-EGFR fuertemente antagonista unido a una carga antimicrotúbulos mediante un conector no escindible.

ES 2 809 501 T3

Secuencias referenciadas

SEC ID nº	Descripción
1	Cetuximab CDR1 de cadena pesada
NYGVH	
2	Cetuximab CDR2 de cadena pesada
VIWSSGNTDYNTPFST	
3	Cetuximab CDR3 de cadena pesada
ALTYDYEFAY	
4	Cetuximab CDR1 de cadena ligera
RASQSIGTNIH	
5	Cetuximab CDR2 de cadena ligera
ASESIS	
6	Cetuximab CDR3 de cadena ligera
QQNNNWPTT	
7	Cetuximab región variable de cadena pesada (V _H)
QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVIWSSGNTDYNTPFST RLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSA	
8	Cetuximab región variable de cadena ligera (V _L)
DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK	
9	Cetuximab cadena pesada completa
QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVIWSSGNTDYNTPFST RLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
10	Cetuximab cadena ligera completa
DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE	

REIVINDICACIONES

1. Método útil para potenciar la citotoxicidad de un anticuerpo de GFR sobre células enfermas EGFR⁺ sin potenciar la citotoxicidad del mismo sobre células normales EGFR⁺, en el que el método comprende:
- 5
- (i) seleccionar, para la conjugación, un anticuerpo de EGFR que es un antagonista de EGFR completo y compete con cetuximab para la unión a EGFR,
- (ii) seleccionar, para la administración mediante el anticuerpo de EGFR, una toxina antimicrotúbulos,
- 10 (ii) seleccionar, para el acoplamiento del anticuerpo de EGFR seleccionado y la toxina antimicrotúbulos, un conector y producir un inmunoconjugado que incorpora el conector entre el anticuerpo y la toxina, proporcionando de esta manera un inmunoconjugado con una citotoxicidad que resulta potenciada contra las células enfermas EGFR⁺ y esencialmente no potenciada contra las células queratinocitos EGFR⁺, en el que el anticuerpo de EGFR seleccionado es un anticuerpo de EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 10 para la cadena ligera y SEC ID n° 9 para la cadena pesada; la toxina antimicrotúbulos seleccionada es el maitansinoide DM-1 y el conector seleccionado es 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).
- 15
2. Inmunoconjugado que comprende: (i) un anticuerpo de EGFR con la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 10 para la cadena ligera y SEC ID n° 9 para la cadena pesada, y (ii) DM-1 conjugado con el mismo, mediante (iii) un conector que es SMCC, presentando el inmunoconjugado un efecto citotóxico respecto a una forma desnuda de dicho anticuerpo que (1) resulta potenciada con respecto a las células de cáncer EGFR⁺ y (2) resulta sustancialmente inalterada con respecto a los queratinocitos EGFR⁺.
- 20
3. Composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado según la reivindicación 2 en una cantidad citotóxica para las células enfermas EGFR⁺ y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25
4. Método para producir una composición anticáncer, que comprende la etapa de combinar un portador farmacéuticamente aceptable y un inmunoconjugado según la reivindicación 2.
- 30
5. Inmunoconjugado según la reivindicación 2, o la composición farmacéutica según la reivindicación 3, para la utilización en el tratamiento del cáncer.
- 35
6. Inmunoconjugado o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 5, en el que el cáncer comprende células de cáncer EGFR⁺.
7. Inmunoconjugado o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 6, en el que las células de cáncer EGFR⁺ son células de cáncer de cabeza y cuello o células de cáncer colorrectal.
- 40
8. Método para potenciar el efecto de un anticuerpo de EGFR sobre células enfermas EGFR⁺ sin potenciar el efecto del mismo sobre células normales EGFR⁺, que comprende unir dicho anticuerpo de EGFR a DM-1 mediante un conector SMCC, en el que el anticuerpo de EGFR presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 10 para la cadena ligera y SEC ID n° 9 para la cadena pesada.
- 45
9. Anticuerpo de EGFR en una forma conjugada con DM-1 mediante un conector SMCC para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto que se presenta con un tumor que responde al tratamiento con un anticuerpo de EGFR, en el que el tratamiento induce una respuesta adversa mediada por un anticuerpo de EGFR por los queratinocitos, n el que la respuesta tumoral al tratamiento con el anticuerpo de EGFR conjugado resulta potenciada esencialmente sin potenciarse la respuesta adversa de los queratinocitos al tratamiento, respecto al tratamiento con anticuerpo desnudo solo, en el que el anticuerpo de EGFR presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 10 para la cadena ligera y SEC ID n° 9 para la cadena pesada.
- 50

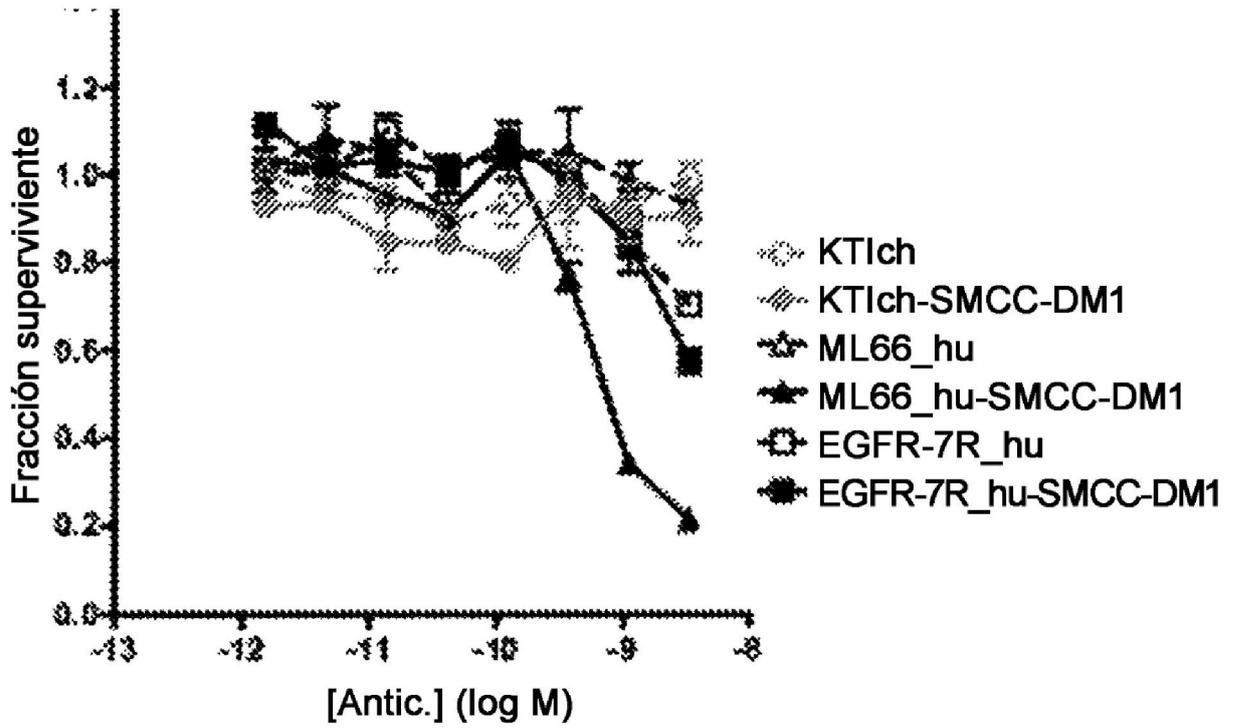


Figura 1

Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares independiente de rutas de EGFR

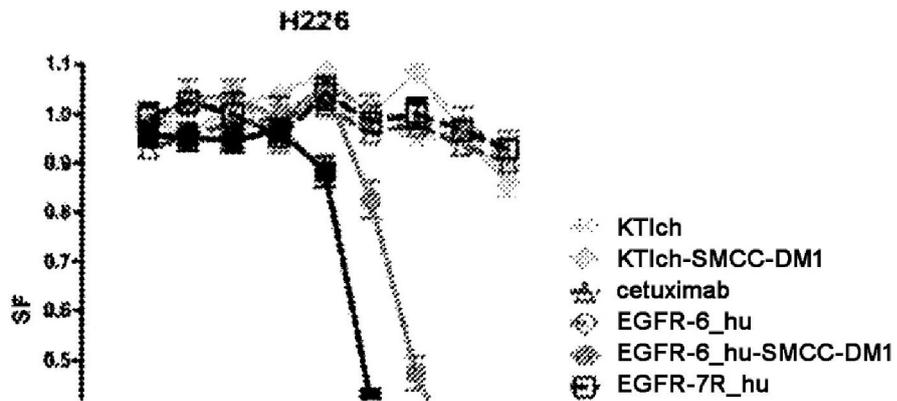


Figura 2

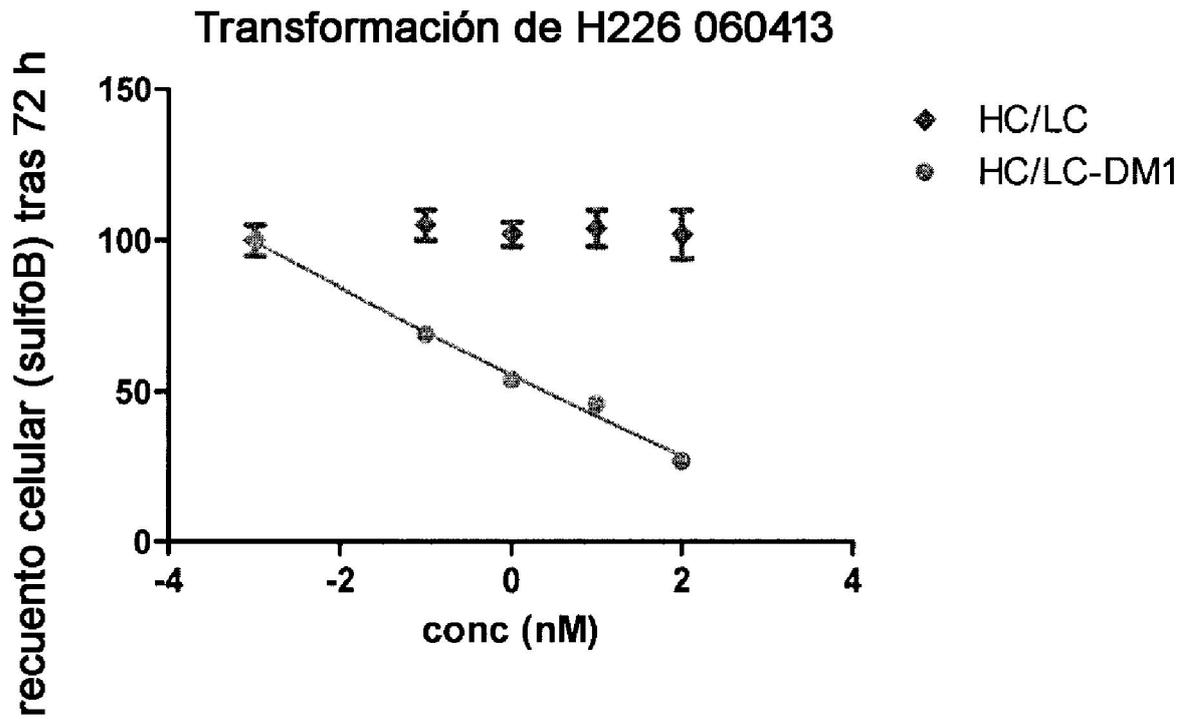


Figura 3

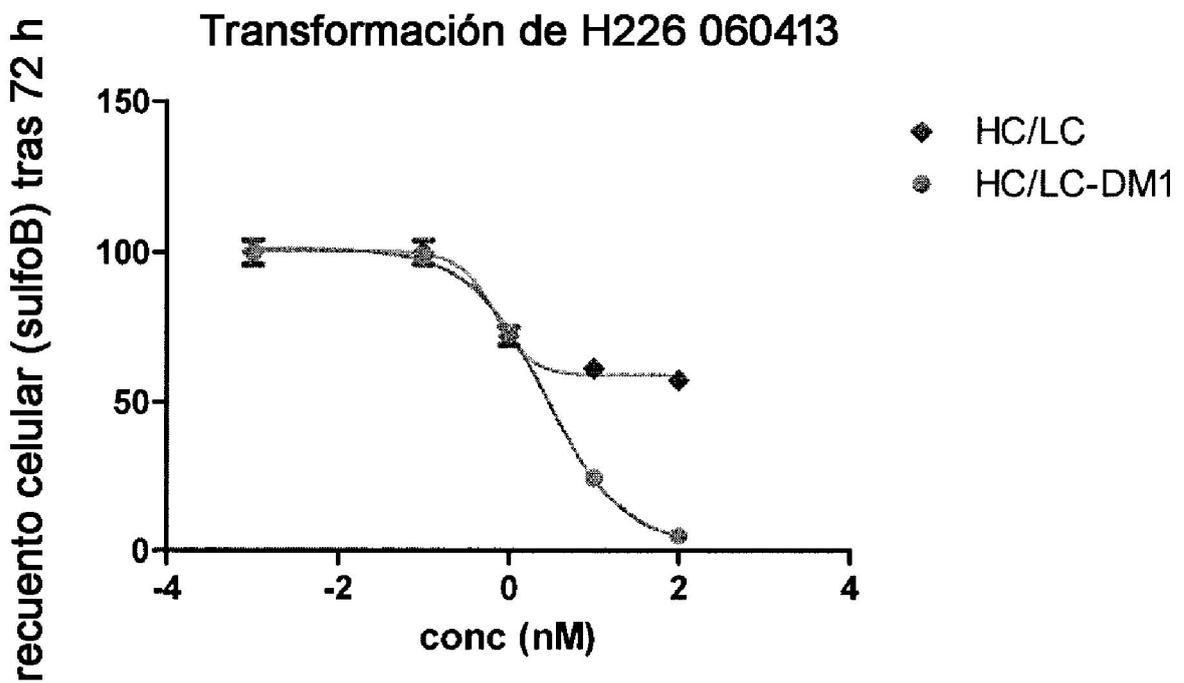


Figura 4

Transformación de HaCaT

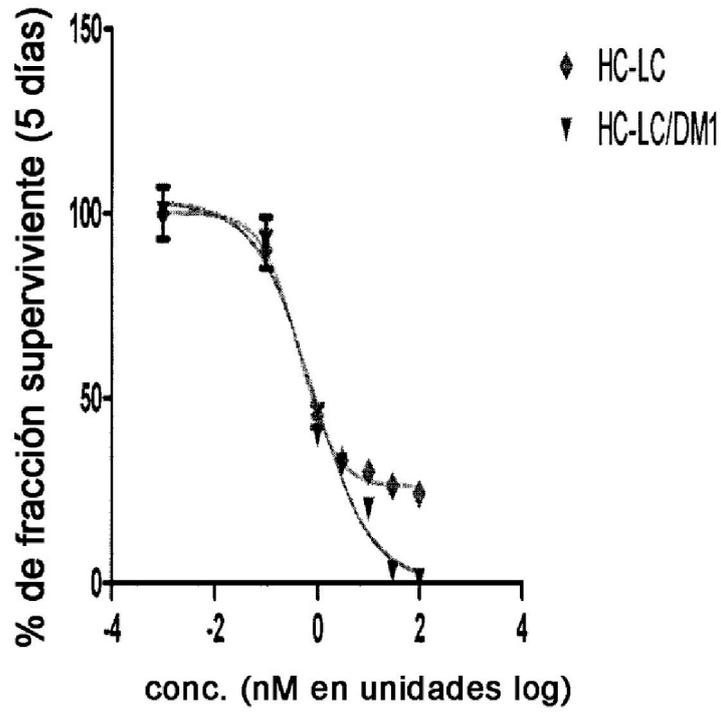


Figura 5

Transformación de HEKa 060413

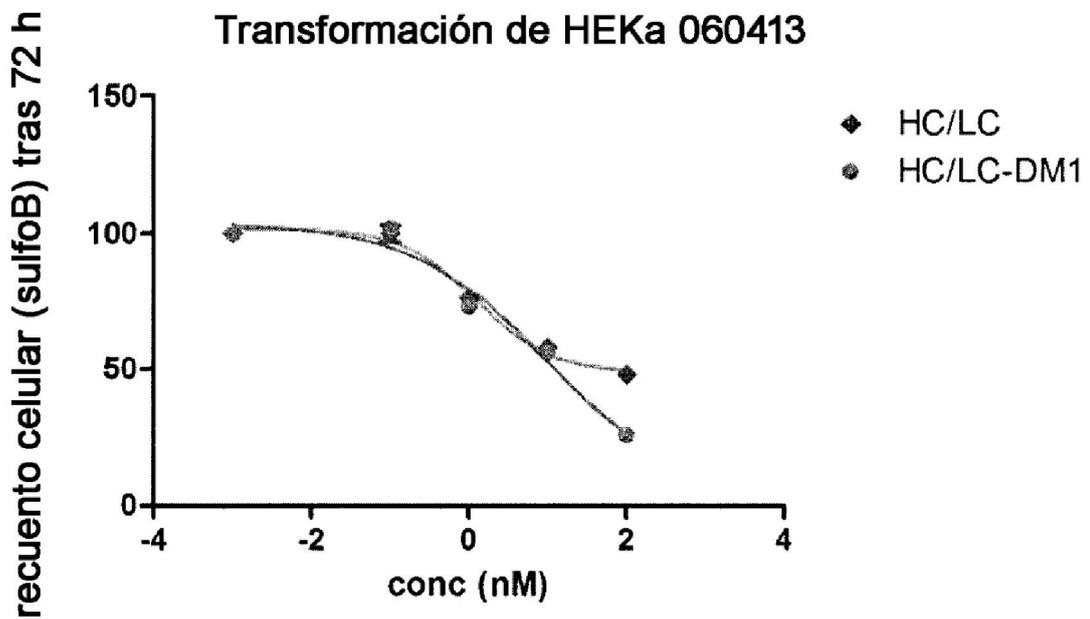


Figura 6

Normalización de la transformación de HaCaT 021414

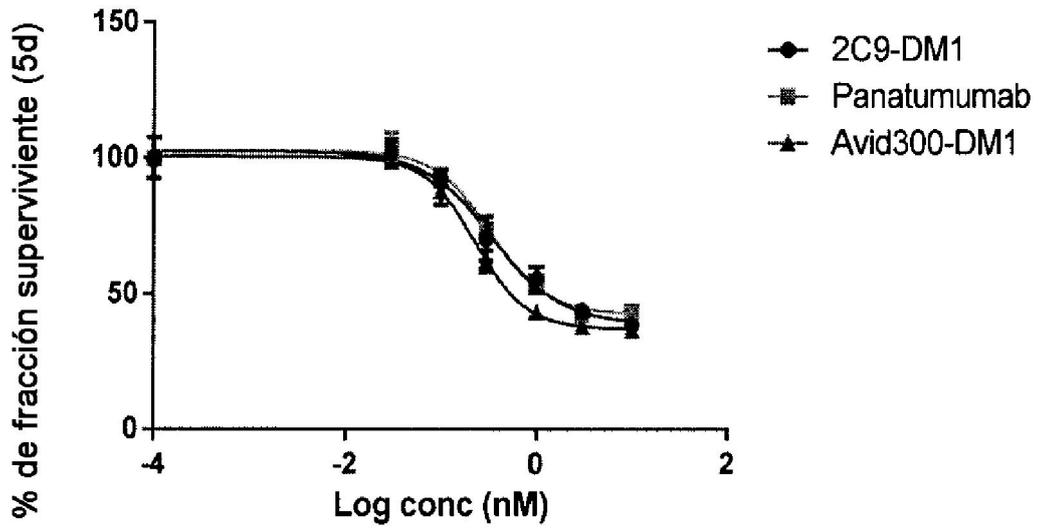


Figura 7

Normalización de la transformación de MDA-MB-468 021414

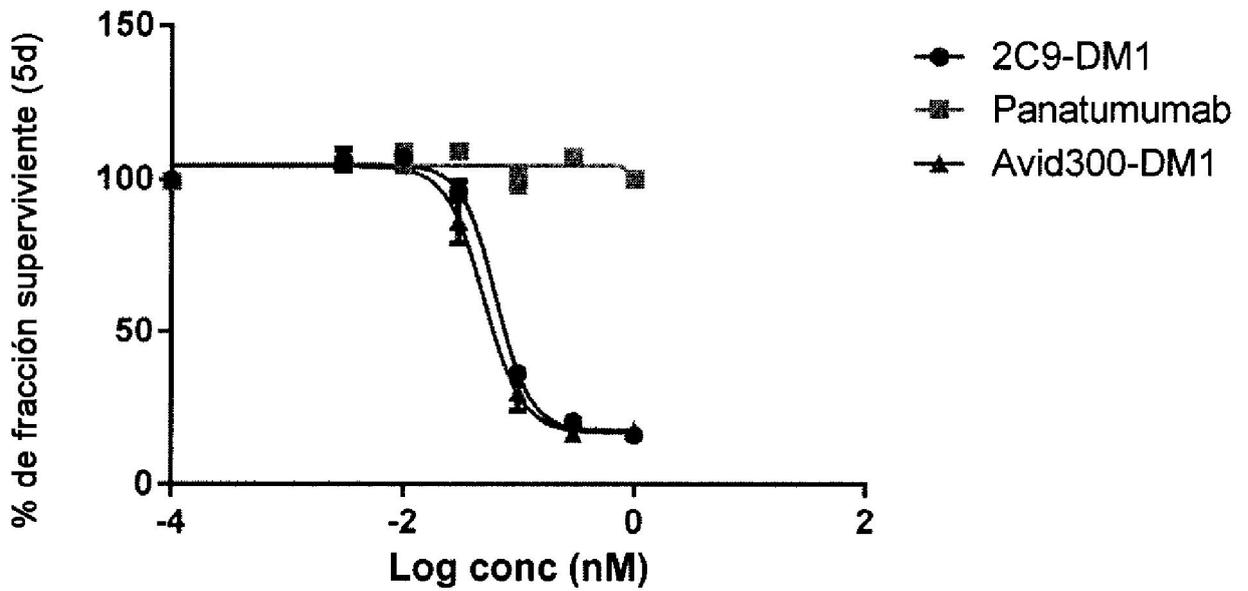


Figura 8

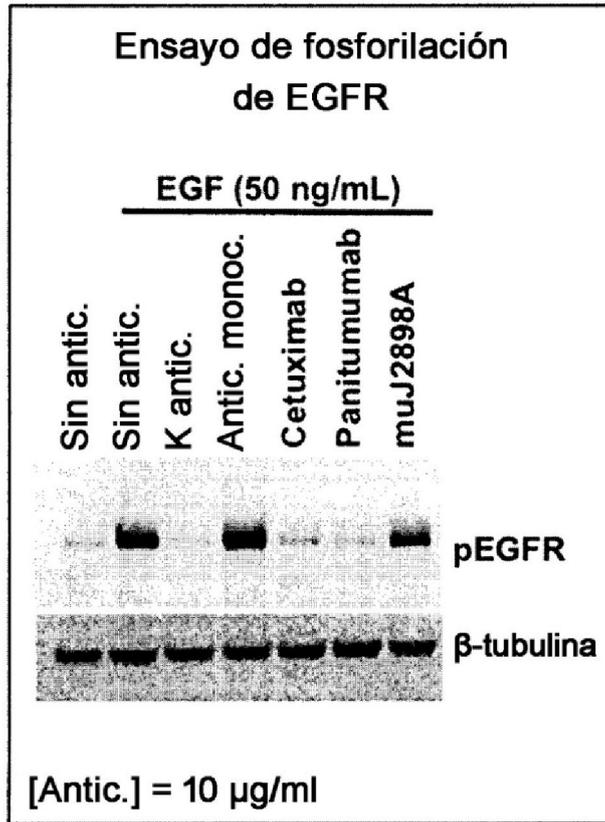


Figura 9

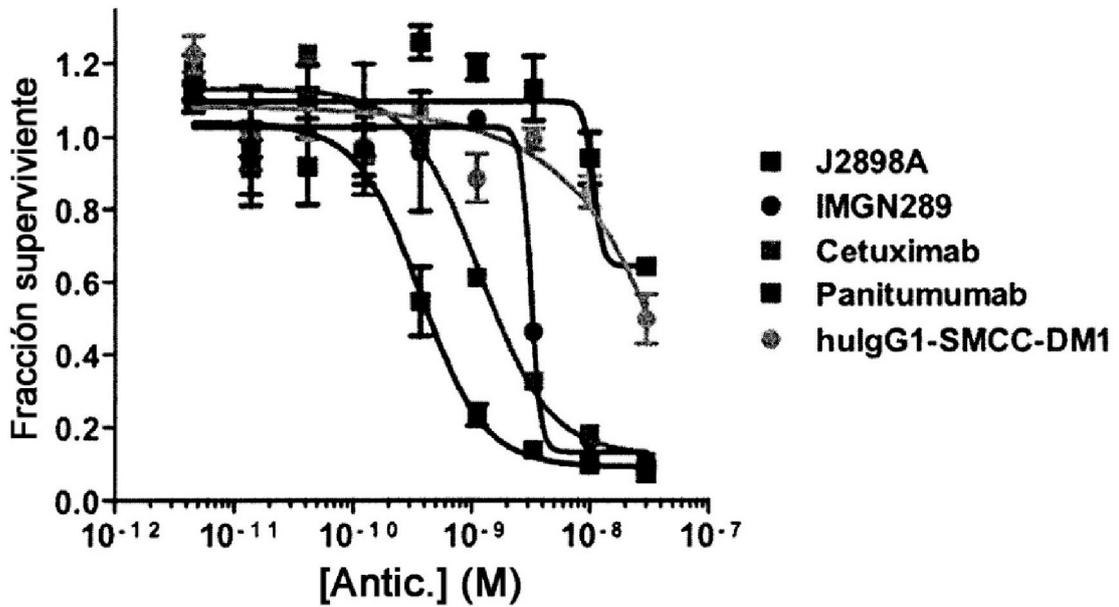


Figura 10

Queratinocitos normales

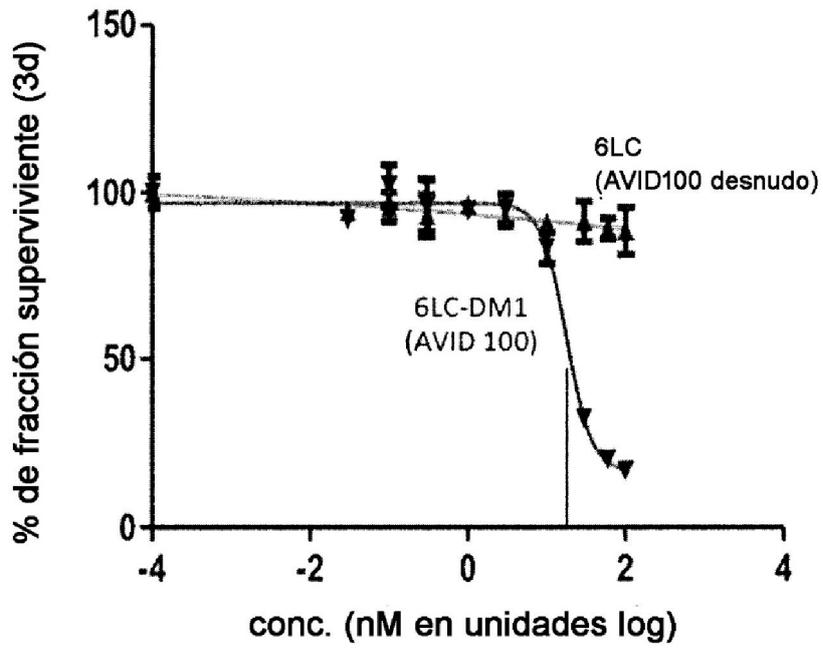


Figura 11

Normalización de la transformación de HaCaT 021414

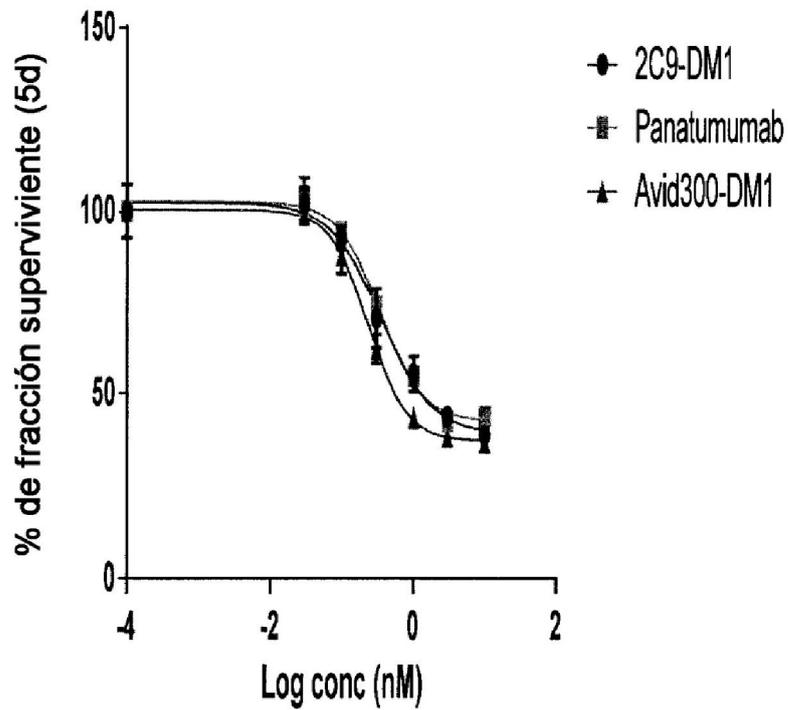


Figura 12

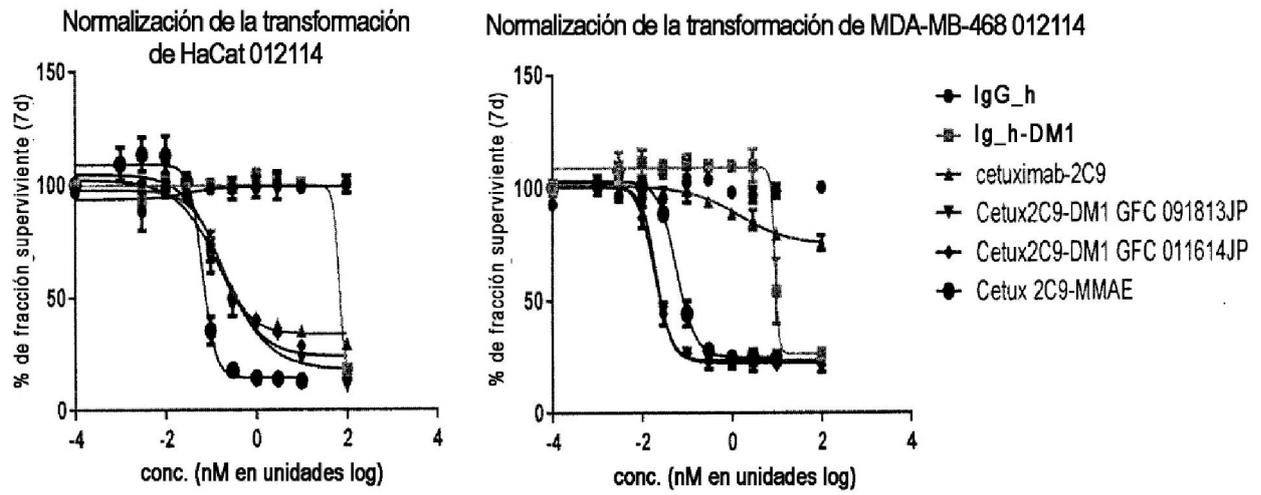


Figura 13