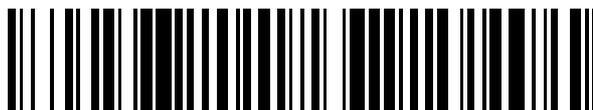


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 718**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2005 E 05706314 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1720569**

54 Título: **Diana para linfocitos B**

30 Prioridad:

27.02.2004 US 548118 P

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

12.02.2015

73 Titular/es:

**IMMUNE SYSTEM THERAPEUTICS LTD (100.0%)
LEVEL 8 235 JONES STREET
ULTIMO NSW 2007, AU**

72 Inventor/es:

**DUNN, ROSANNE DOROTHY;
JONES, DARREN ROSS;
ASVADI, PARISA;
RAISON, ROBERT y
HUTCHINSON, ANDREW TASMAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 528 718 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

Diana para linfocitos B

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al diagnóstico y al tratamiento de trastornos de linfocitos B tales como mieloma múltiple (MM). En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de trastornos linfoproliferativos que usan ligandos que se unen a cadenas ligeras lambda libres expresadas sobre la superficie de células linfoides.

10

Antecedentes de la invención

El mieloma múltiple es un cáncer de la sangre en el que la célula maligna es un linfocito B monoclonal diferenciado terminalmente. El tratamiento convencional de esta enfermedad es un régimen de quimioterapia a dosis elevada con o sin trasplante de células madre autólogas. Sin embargo, en la actualidad existe una abrumadora evidencia clínica de que este régimen de tratamiento fracasa inevitablemente debido a que el tumor se vuelve finalmente resistente (Davies *et al.* (2000) Eur. J. Haematol. 64:359-367; Ryoo *et al.* (2002) Blood Rev. 16:167-174; Kyle RA, (2001a) Oncologist 6:119-124).

15

20 Tratamientos actuales para el mieloma múltiple

Las terapias actuales para el MM se han informado en la literatura e incluyen variaciones de quimioterapia a dosis elevada (Kyle RA (2001a) Oncologist 6:119-124; Kyle RA (2001b) Seminars in Hematology 38; 2; 3; 1.1-14, Anderson *et al.* (1999) Seminars in Hematology 36; 1; 3-8). La mayoría de los pacientes con MM presentan una enfermedad sintomática en el diagnóstico y requieren terapia aunque, sin embargo, algunos pacientes son asintomáticos y no se tratan generalmente hasta que se convierten en sintomáticos.

25

El tratamiento de elección para los pacientes con MM menores de 65 años es el trasplante de células madre autólogas de sangre periférica (APBST) en combinación con quimioterapia (Harousseau y Attal (2002) Blood Reviews 16; 245-253). La quimioterapia sola es el tratamiento inicial preferente para los pacientes mayores de 65 años o los pacientes menores en los que el trasplante no es viable. El APBST es aplicable para más de la mitad de los pacientes con MM. A pesar de los intentos para reducir la contaminación de células tumorales en los injertos, se ha mostrado que las células madre autólogas periféricas están generalmente contaminadas con células de mieloma o sus precursores. Esto da como resultado la repoblación de la médula ósea con células malignas y finalmente una recaída.

30

35

El tratamiento inicial para pacientes con MM sintomáticos es quimioterapia a dosis elevada (Kyle RA, (2001a) The Oncologist 6; 2; 119-124; Kyle RA, (2001b) Seminars in Hematology 38; 2; 3; 11-14, Anderson *et al.* (1999) Seminars in Hematology 36; 1; 3-8). La mayoría de los médicos tratan a los pacientes con vincristina, doxorubicina (Adriamicina) y dexametasona (VAD) durante 3-4 meses. Esto da como resultado la reducción de las células tumorales en la médula ósea y la sangre periférica. A continuación se administran ciclofosfamida y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en dosis elevadas. El G-CSF estimula la producción de células madre periféricas (linfocitos B CD34+) para el trasplante de células madre autólogas de sangre periférica. En este estadio, se extrae sangre periférica y se recogen células madre usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS).

40

45

En la actualidad existe la opción de al menos dos regímenes de tratamiento antes del injerto de médula ósea con células madre. En el primer caso, se puede administrar al paciente quimioterapia a dosis elevada y/o irradiación corporal total seguida de APBST. Alternativamente, se pueden administrar agentes alquilantes al paciente después de la recogida de las células madre hasta que se alcance una meseta. A continuación se puede administrar interferón α_2 para inhibir el crecimiento y la división celular, o no se administra ninguna terapia hasta una recaída. En este estadio, se da al paciente melfalán a dosis elevada y/o irradiación corporal total y se infunden las células madre sanguíneas recogidas previamente. En general, se administra melfalán (200 mg/m²) ya que es menos tóxico y parece no haber ninguna ventaja en el uso de la irradiación corporal total.

50

55

Los estudios comparativos de la quimioterapia convencional y la quimioterapia a dosis elevada en combinación con APBST en pacientes con MM indicaron que la última mejoró considerablemente la supervivencia exenta de sucesos y la supervivencia global (Harousseau y Attal (2002) Blood Reviews 16; 245-253). En la actualidad, el tratamiento con VAD seguido de APBST da como resultado una tasa de supervivencia favorable de cinco años en el grupo de trasplante frente al grupo solo con tratamiento con VAD (52 % frente a un 12 %). Se puede continuar la quimioterapia hasta que el paciente alcance un estado de meseta o durante un año. Si se produce una recaída en el estadio de meseta después de 6 meses, se debería reinstaurar el régimen de quimioterapia. A pesar de las recientes mejoras en los regímenes de tratamiento, el seguimiento a largo plazo de estos estudios clínicos ha mostrado que no se produce la eliminación del mieloma de los pacientes incluso con grandes dosis de quimioterapia y APBST.

60

65

Por lo tanto, el tratamiento actual prolonga la vida del paciente pero no es curativo. En la actualidad es evidente que el desarrollo de la enfermedad está asociado con inestabilidad genética y más específicamente con la desregulación de genes implicados en adhesión, apoptosis, ciclo celular, resistencia a fármacos, detención del crecimiento, oncogénesis, señalización y transcripción (Zhan *et al.* (2002) *Blood* 99; 5; 1745-1757).

5

El desarrollo de la enfermedad es un proceso de transformación en múltiples etapas

Varios estudios han sugerido que el desarrollo de la enfermedad del mieloma múltiple correlaciona con sucesos genéticos progresivos en las células plasmáticas malignas (Hallek *et al.* (1998) *Blood* 91, 1; 3-21; Avet-Loiseau *et al.* (2002) *Blood* 99; 6; 2185-2191; Zhan *et al.* (2002) *Blood* 99; 5; 1745-1757). Los estadios progresivos de la enfermedad parecen iniciarse con un trastorno de células plasmáticas monoclonales preexistente denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) donde las células se immortalizan, pero no se transforman. El siguiente estadio del desarrollo es mieloma intramedular donde las células se encuentran solamente en la médula ósea y son dependientes de las células de estroma de la médula ósea (BMSC) para su supervivencia. En particular, se desarrolla un bucle paracrino para la interleuquina-6 (IL-6) y el receptor de la interleuquina-6 (IL-6R) entre las células de MM y las BMSC. La IL-6 parece ser la citoquina más importante en el establecimiento de las células de mieloma en la médula ósea. El efecto más notorio es la capacidad de la IL-6 para inhibir la apoptosis inducida por dexametasona en las células de mieloma.

10

15

Simultáneamente, las células de mieloma estimulan los osteoclastos que son responsables de la reabsorción ósea dando como resultado las lesiones óseas características que se encuentran en el MM. Después de este estadio se produce una fase extramedular donde las células proliferan más rápidamente y crecen en la sangre (leucemia de células plasmáticas, PCL) u otros lugares extramedulares. El estadio final del desarrollo se produce cuando las células se vuelven completamente desreguladas y se pueden propagar *in vitro*.

20

Anomalías genéticas

El desarrollo de la enfermedad a nivel celular se encuentra estrechamente unido a anomalías genéticas que están asociadas con ejemplos específicos de desregulación génica (Hallek *et al.* (1998) *Blood* 91, 1; 3-21). Varios estudios cariotípicos han mostrado que la aneuploidía es una característica común de las células de mieloma y es independiente del estadio de la enfermedad. Una revisión de estos estudios ha sugerido que existen dos categorías principales de anomalías genéticas en el mieloma múltiple (Fonseca *et al.* (2004) *Cancer Research* 64; 1546-1558). Una categoría consiste en pacientes con translocaciones que implican el lugar de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) que cuenta con aproximadamente la mitad de las anomalías genéticas en los pacientes con mieloma. También parece claro que los cariotipos hipodiploides y la monosomía del cromosoma 13 están asociados habitualmente con translocaciones de la IgH. Se ha determinado recientemente la prevalencia y la importancia clínica de las translocaciones específicas de la IgH y se ha informado en Fonseca *et al.* (2004) *Cancer Research* 64; 1546-1558.

30

35

El 50 % de pacientes restante parece tener un cariotipo hiperdiploide y no presentar translocaciones de la IgH.

40

Las translocaciones que implican los genes de la cadena ligera (IgL) no se han caracterizado bien. Un estudio ha indicado que las translocaciones de la IgL- λ están presentes en aproximadamente un 10 % de las muestras de MGUS y aproximadamente un 20 % de tumores de MM intramedulares (Fonseca *et al.* (2002) *Blood*, 100; 1417-1424). Las translocaciones de la IgL- κ solo se han identificado en un pequeño número de tumores de MM intramedular (Fonseca *et al.*, (2004) *Cancer Research* 64; 1546-1558). En la actualidad, la importancia clínica de las translocaciones de la IgL es desconocida.

45

Proteína monoclonal de células de mieloma

A pesar de la complejidad de las anomalías cariotípicas descubierta en el mieloma múltiple, un distintivo de laboratorio de esta enfermedad es la producción y la secreción de proteína monoclonal (proteína M) en la sangre y/o la orina. En general, la proteína M es una inmunoglobulina, o un componente de una inmunoglobulina, que no retiene la función normal de anticuerpo. Las células de mieloma producen habitualmente un exceso de cadenas ligeras lambda o kappa (proteínas de Bence Jones, BJP). Las BJP están presentes en el citoplasma de las células y también se secretan a la sangre. Estas se secretan frecuentemente en las formas de monómero (22-25 kD) y dímero (50 kD) y son lo suficientemente pequeñas para pasar libremente a la orina (Durie (2003) *International Myeloma Foundation, Multiple Myeloma, Concise Review of the Disease and Treatment Options*).

50

55

La presencia de una cadena ligera lambda unida a membrana que no está asociada con una cadena pesada podría proporcionar una nueva diana terapéutica en las células de mieloma.

60

La literatura de no patente Fu S.M. *et al.* (J. Exp. M. Vol. 139, 1974, páginas 451 - 455) describe la aparición de IgM, IgD, y cadenas ligeras libres superficiales en linfocitos humanos.

65

Sumario de la invención

- Los presentes inventores han identificado una nueva diana en las células de mieloma para su uso en métodos diseñados para el diagnóstico o el tratamiento de mieloma múltiple. Esta diana es una cadena ligera lambda libre expresada sobre la superficie de las células de mieloma. "Cadena ligera lambda libre" significa una cadena ligera lambda que no está asociada con una inmunoglobulina intacta. La cadena ligera lambda libre expresada sobre la superficie de las células de mieloma se denomina en el presente documento antígeno de mieloma lambda ("LMA").
- El uso terapéutico propuesto por los presentes inventores se basa en la administración de un ligando que se une específicamente a LMA para el agotamiento de las células malignas en sujetos que padecen trastornos de linfocitos B. El ligando es un anticuerpo anti-LMA. Los enfoques terapéuticos que se describen en el presente documento representan una desviación radical de los tratamientos disponibles previamente y en la actualidad para trastornos de linfocitos B.
- La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-LMA de acuerdo con la reivindicación 1.
- El trastorno de linfocitos B es un trastorno linfoproliferativo. El trastorno linfoproliferativo es mieloma múltiple, y más preferentemente mieloma múltiple de tipo lambda.
- La presente invención se puede usar en un método para inhibir el crecimiento o para la destrucción de células linfoides en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo anti-LMA en condiciones suficientes para la unión del anticuerpo anti-LMA a las células linfoides para inhibir el crecimiento de, o para destruir, las células. Por ejemplo, la inhibición o la destrucción de las células linfoides se puede efectuar mediante apoptosis o mediante las células inmunes del sujeto (tal como mediante citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC)).
- La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda de acuerdo con la reivindicación 4.
- De acuerdo con la invención, las células linfoides son células de mieloma.
- La expresión "conjugado de ligando de LMA", como se usa en el presente documento, se refiere a un ligando de LMA conjugado a un resto citotóxico o a un modificador biológico.
- La unión entre un ligando y el LMA puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o por una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. Cuando la interacción entre el ligando y el LMA produce un complejo unido no covalentemente, la unión que se produce es por lo general electrostática, enlace de hidrógeno, o el resultado de interacciones hidrofílicas/lipofílicas. Los ligandos de LMA son anticuerpos anti-LMA.
- En una realización, el resto citotóxico es una toxina (que puede ser una toxina fotoactivada), un agente quimioterapéutico, o un agente radioactivo.
- A modo de ejemplos no limitantes, el resto citotóxico puede ser un fármaco citotóxico o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o de plantas (tal como gelonina), o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de tal toxina. Son preferentes las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas y son, a modo de ejemplo, gelonina, cadena A de la difteria, fragmentos activos sin capacidad de unión de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.
- Fármacos citotóxicos que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, adriamicina (y los derivados de la misma), complejo cis-platino (y los derivados del mismo), bleomicina y metotrexato (y los derivados del mismo). Estos fármacos citotóxicos son útiles en ocasiones para la gestión clínica de tumores recurrentes y particularmente cáncer de mama, pero su uso se complica debido a efectos secundarios graves y al daño causado a las células no objetivo. Los anticuerpos anti-LMA pueden servir como un vehículo útil para tales fármacos que proporciona un medio eficaz tanto de suministro a las células cancerígenas como de mejora de la entrada en las propias células cancerígenas.
- El resto citotóxico también puede ser un agente radioactivo. En particular, el resto citotóxico puede ser un radionúclido tal como, por ejemplo, itrio-90 (⁹⁰Y), indio-111 (¹¹¹In), yodo-131 (¹³¹I) o cobre-67 (⁶⁷Cu).
- Modificadores de la respuesta biológica que se pueden acoplar al ligando de LMA y se usan en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, linfoquinas y citoquinas tales como IL -2 e interferones (α, β o γ). Estos modificadores de la respuesta biológica tiene una diversidad de efectos en las células tumorales. Entre estos efectos se encuentran el aumento de la destrucción de las células tumorales por acción directa así como el aumento de la destrucción de

las células tumorales mediante el aumento de procesos mediados de defensa de huésped. La conjugación de un ligando de LMA a estos modificadores la respuesta biológica permitirá la localización selectiva dentro de las células linfoides y, por lo tanto, la mejora de los efectos antiproliferativos mientras se evitan efectos no específicos que conducen a toxicidad en células no diana.

Se pueden preparar conjugados que comprenden ligandos de LMA usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína difuncionales. Ejemplos de tales reactivos son SPDP, IT, derivados difuncionales de imidoésteres tales como adipimidato de dimetilo HCl, ésteres activos tales como suberato de disuccinimidilo, aldehídos tales como glutaraldehído, bis-azido compuestos tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos tales como 2,6-diisocianato de tolieno, y compuestos con bis-flúor activo tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno.

En otra realización, el resto citotóxico es una molécula de ácido nucleico que codifica un agente citotóxico. En esta realización, el ligando de LMA funciona como un vehículo para introducir un gen terapéutico que codifica el agente citotóxico, por ejemplo, genes de toxinas tales como toxina A de la difteria, lectinas, exotoxina A de *Pseudomonas*, *Saponaria officinalis* SO-6 (Soria M, (1989) *Pharmacol. Res.*, 21 Suppl 2:35-46) o ricina; genes de suicidio celular tales como timidina quinasa o nitrorreductasa; proteínas que activan genes quimioterapéuticos tales como gangciclovir o mitomicina C; una ribozima, RNasa, o secuencia antisentido (por ejemplo, la secuencia BCL2); en células LMA+ tales como células de mieloma. Preferentemente, es suficiente la expresión de solo unas pocas moléculas del agente citotóxico codificado por el gen terapéutico para destruir la célula que expresa ese gen. Es preferente que el gen terapéutico se una operativamente a una unidad de transcripción específica de célula o tejido, por ejemplo, un promotor y/o potenciador específico de célula o tejido. Unidades de transcripción preferentes son las que controlan la expresión en linfocitos B (por ejemplo, unidades de transcripción de un gen de Ig pesada, gen de Ig kappa, gen de Ig lambda, gen de BCL-6 (Dalla Favera *et al.*, *CS.H. Smp. Quant. Biol.*, 59, 117 (1994)), gen de CD19, gen de CD20, o gen de CD22 (Kerhl *et al.*, *Immunol. Today*, 15,432 (1994)), linfocitos T (por ejemplo, unidades de transcripción del gen de IL-4, el gen de IL-2, el gen de IL-2R, el gen del receptor de linfocitos T, el gen de IL-5, el gen de IL-13, el gen de GM-CSF y el gen del ligando de Fas (Nagata *et al.*, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 16, 87 (1996)) o células mieloides. Unidades de transcripción específicas de células mieloides incluyen, pero no se limitan a, las que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.502.176, así como unidades de transcripción del gen de PU.1 (Fisher *et al.*, *Stem Cells*, 16, 25 (1998)), el gen de CD11c o CD18 (Corbi *et al.*, *Leuk. & Lymph.*, 25, 415 (1997)), el potenciador de IgH, el receptor G de CSF, el gen de GM y/o G (Zhang *et al.*, *Cur. Top. Micro. & Immunol.*, 211, 137 (1996)), o el gen de C/EBP, Runt/PEBP2/CBF o Ets (Clarke *et al.*, *J. Leuko. Biol.*, 63, 153 (1998)).

En una realización preferente, se ha tratado al sujeto para reducir los niveles de cadenas ligeras lambda libres presentes en el fluido del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-LMA o del conjugado de ligando de LMA. Preferentemente, los niveles de cadenas ligeras libres presentes en el suero del sujeto están reducidos. Se puede conseguir una reducción de los niveles de las cadenas ligeras libres en el suero mediante, por ejemplo, quimioterapia o plasmaféresis, o mediante métodos en los que se une un ligando de LMA (tal como un anticuerpo anti-LMA) a un soporte sólido (por ejemplo, un filtro estéril) y se usa para capturar las cadenas ligeras lambda libres del fluido. Es preferente que el tratamiento para reducir los niveles de las cadenas ligeras libres en el fluido del sujeto se lleve a cabo en el sujeto justo antes de la administración del anticuerpo anti-LMA o del conjugado de ligando de LMA.

La presente invención se puede usar para la retirada de células linfoides de una muestra celular aislada, tal como, pero limitada a, células de médula ósea, por exposición de la muestra celular a un anticuerpo anti-LMA o a un conjugado de ligando LMA en condiciones en las que las células linfoides se unen al anticuerpo o al conjugado, y aislamiento de una fracción celular de dicha muestra celular que no se une al anticuerpo o al conjugado. Esto se puede usar, por ejemplo, en la retirada de células de mieloma de una muestra de médula ósea para un trasplante de médula ósea autóloga.

La presente invención se puede usar en un método para el trasplante de células hematopoyéticas autólogas en un sujeto, comprendiendo el método:

- (i) retirar una población de células progenitoras hematopoyéticas del sujeto,
- (ii) tratar la población de células con un anticuerpo anti-LMA o un conjugado de ligando de LMA, y
- (iii) transplantar la población de células tratada de la etapa (ii) al sujeto.

En la etapa de tratar la población de células progenitoras con un anticuerpo anti-LMA o un conjugado de ligando de LMA implica preferentemente poner en contacto la población de células con un anticuerpo anti-LMA o un conjugado de ligando de LMA en condiciones suficientes para la unión del anticuerpo anti-LMA o el conjugado de LMA a las células linfoides presentes en la población para inhibir el crecimiento de, o para destruir, las células linfoides.

El método puede implicar la infusión intravenosa del anticuerpo anti-LMA o del conjugado de ligando de LMA en el sujeto.

El método de trasplante autólogo se puede llevar a cabo en el sujeto durante o después una terapia citorreductora.

El anticuerpo anti-LMA o el conjugado de ligando de LMA se puede unir a un soporte sólido.

- 5 El conjugado o el anticuerpo anti-LMA mencionado anteriormente se puede usar *in vitro* para inhibir el crecimiento de, o destruir, células linfoides en una muestra celular, tal como una muestra de médula ósea.

10 La invención se puede usar en un método proporcionado para localizar células linfoides en un sujeto administrando un anticuerpo anti-LMA, permitiendo que el anticuerpo se una a las células en el sujeto, y determinando la localización del anticuerpo en el sujeto. El anticuerpo se puede marcar para su detección, por ejemplo, con un radionúclido, un fluoróforo, un cromóforo o una enzima.

15 Los marcajes que se pueden usar en la preparación de las versiones marcadas de los anticuerpos incluyen restos que se pueden detectar directamente, tales como fluorocromos y radiomarcajes así como restos, tales como enzimas, que se pueden hacer reaccionar o derivatizar para su detección. Ejemplos de tales marcajes son ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferina, 2,3-dihidroftalazinonas, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los anticuerpos se pueden marcar con tales marcajes mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden usar agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimida, imidatos, succinimidas, benzadina bis-diazotada y similares para acoplar los marcajes fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente a los anticuerpos.

20

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-LMA conjugado a un resto citotóxico o un modificador biológico. En una realización de este aspecto, el resto citotóxico es una toxina, una toxina fotoactivada, un agente quimioterapéutico, o un agente radioactivo.

30 En otra realización de este aspecto, el resto citotóxico es una molécula de ácido nucleico. De ese modo, la invención proporciona una composición terapéutica que se dirige selectivamente a moléculas de LMA de la superficie celular pero que tiene una inmunogenicidad reducida o ninguna inmunogenicidad como gen terapéutico, preferentemente en forma de ADN circular tal como ADN de plásmido, en lugar de una proteína inmunogénica, y se introduce en el mamífero huésped. En consecuencia, puede ser posible administrar repetidamente la composición terapéutica a un mamífero, por ejemplo, sujetos con mieloma, sin el desarrollo de una respuesta significativa al anticuerpo, particularmente al agente citotóxico codificado por el gen terapéutico. Además, una composición terapéutica de la invención es útil para destruir células en sujetos con otros trastornos proliferativos plasmáticos LMA+ tales como linfoma de linfocitos B y macroglobulinemia. Preferentemente, se emplea para su uso en seres humanos una versión humanizada de la parte del anticuerpo del polipéptido de fusión de la composición.

35

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-LMA marcado con un resto detectable, tal como, a modo de ejemplos no limitantes, un fluoróforo, un cromóforo, un radionúclido, o una enzima.

45 En aún otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-LMA de la invención y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a un anticuerpo anti-LMA o un ligando de LMA/citotoxina unidos a un soporte sólido.

50 En una realización preferente adicional de la presente invención, el anticuerpo anti-LMA es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

En la presente memoria descriptiva, se entiende que la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprender" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

55 Las diversas características y realizaciones de la presente invención, a las que se hace referencia en las secciones individuales anteriores se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, cambiando lo que se deba cambiar. Por lo tanto, las características especificadas en una sección se pueden combinar con características especificadas en otras secciones, según sea apropiado.

Breve descripción de las figuras

60 Figura 1. Análisis de la unión de mAb a cadenas ligeras lambda libres mediante ELISA. Los mAb L7 (A), mab1306 (B) y ME 154 (C) se incubaron frente a antígenos que consistían en cadena ligera lambda humana ($\lambda\text{LC F}$, $\lambda\text{LC H}$, $\lambda\text{LC K}$ y $\lambda\text{LC Q}$ en formas tanto monomérica (mon) como dimérica (dim), IgG λ humana normal mezclada (Hu IgG λ), y cadena ligera kappa humana libre (κLC) inmovilizados en placas ELISA. Los mAb unidos se detectaron con un conjugado anti-IgG de ratón-AP. Los complejos anticuerpo-antígeno se visualizaron mediante reacción enzimática con pNPP y se midió la absorbancia a 405 nm.

65

Figura 2. Análisis de la unión de mAb a cadenas ligeras lambda libres mediante Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR). Los mAb L7 (A) y mab1306 (B) se inmovilizaron en un chip de CM5-dextrano de Biacore. Antígenos que consistían en cadena ligera y blanda humana (Lam F, Lam H, Lam K, Lam L, en formas tanto monomérica (mon) como dimérica (dim), IgGA humana normal mezclada (Hu IgGA), y cadena ligera kappa humana libre (Kappa LC) se hicieron pasar sobre los mAb inmovilizados. La unión anticuerpo-antígeno se midió mediante SPR usando un Biosensor Biacore 2000.

Figura 3. Unión de mAb anti- λ a células de mieloma LP-1. Se incubaron células de mieloma λ LP-1 (5×10^5) con 50 μ l de 100 μ g/ml de mAb L7 (A), mab1306 (B) o ME 154 (C) durante 30 minutos en hielo. A continuación las células se lavaron dos veces y se incubaron con F(ab')₂ de cabra-anti-ratón marcado con PE, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. El histograma de color gris sólido representa las células que se incubaron con un mAb irrelevante seguido del F(ab')₂ de cabra-anti-ratón marcado con PE.

Figura 4. La preincubación con ALC libre inhibe la unión del mAb L7 a las células LP-1. Se incubó el mAb L7 (100 μ g/ml) con cadena ligera libre lambda (λ F LC, A o λ H LC, B) o kappa (κ LC) a concentraciones de 200-800 μ g/ml durante 30 minutos a 37 °C. Las células se incubaron a continuación con el L7 inhibido durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se incubaron con F(ab')₂ de cabra-anti-ratón marcado con PE. Después de dos lavados las células se analizaron mediante citometría de flujo. El histograma de color gris sólido representa las células que se incubaron con un mAb anti- κ LC (control negativo) seguido del F(ab')₂ de cabra-anti-ratón marcado con PE.

Figura 5. Identificación de un antígeno λ LC libre en la superficie de células de mieloma λ LP-1 mediante transferencia de Western. Las células LP-1 se lisaron en Tris 40 mM y se aislaron las fracciones de proteína citoplasmática y unida a membrana en condiciones no reductoras. Las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE al 12 %, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con BSA, las cadenas ligeras λ se detectaron con los mAb anti- λ L7 (A), mab1306 (B) o ME 154 (C). Los números del extremo derecho de las figuras son pesos moleculares aproximados (kD).

Figura 6. La unión de mAb a las cadenas ligeras lambda induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) frente a células de mieloma LP-1. Se incubaron células de mieloma LP-1 marcadas con PKH-26 con mab1306 (barras oscuras) o ME 154 (barras sombreadas) 7 nM (1 μ g/ml) o 0,7 nM en presencia de células NK murinas estimuladas con IL-2. Después de 16 horas, se detectaron las células LP-1 muertas con fluorescencia de TO-PRO-Yoduro 3 mediante citometría de flujo, y se calculó el porcentaje de células LP-1 muertas. Para controlar la citotoxicidad mediada por células independiente de anticuerpo (AICC), también se incubaron células LP-1 en PBS (barras transparentes) sin anticuerpo en presencia de células NK efectoras (las barras de error muestran la SEM triplicada).

Descripción detallada de la invención

Técnicas generales

A menos que se defina específicamente otra cosa, se entenderá que todos los términos científicos y técnicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por los expertos habituales en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas, y bioquímica).

A menos que se indique otra cosa, las técnicas de proteínas recombinantes, cultivo celular, e inmunológicas que se utilizan en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la materia. Tales técnicas se describen y se explican en la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F. M. Ausubel *et al.* (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha actual), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan *et al.* (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha actual).

Anticuerpos anti-LMA

Los presentes inventores han mostrado, por primera vez, que la cadena ligera lambda libre (LMA) se expresa en la superficie de las células de mieloma. Se prevé que los anticuerpos dirigidos frente a LMA serán capaces de destruir las células de mieloma de tipo lambda mediante mecanismos tales como ADCC, lisis dependiente de complemento y apoptosis y, por lo tanto, serán agentes terapéuticos eficaces frente a células de mieloma de tipo lambda. Además, los anticuerpos dirigidos frente a LMA se pueden usar para suministrar citotoxinas directamente a las células malignas.

Los expertos en la materia conocerán que una inmunoglobulina de tipo lambda consiste en cuatro cadenas de polipéptidos, según lo cual dos de estas son cadenas pesadas (cada una de aproximadamente 50-70 kD) y dos son cadenas ligeras lambda (cada una de aproximadamente 26 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena variable ligera (V_L) y cadena variable pesada (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. La construcción del gen que codifica las cadenas ligeras lambda implica la transposición de los segmentos de los genes V, J y C en el sitio de la cadena ligera lambda (véase el Capítulo 5, "Organization and Expression of Immunoglobulin Genes", en Kuby Immunology, 4ª ed, Goldsby *et al.* (Freeman, 2000)).

Por lo tanto, cuando se usa en el presente documento, el término "LMA" incluye cualquier cadena ligera lambda libre equivalente a una cadena ligera derivada de una inmunoglobulina de tipo lambda. El término incluye por lo tanto un conjunto de polipéptidos de cadena ligera lambda que difieren en sus secuencias de la región variable.

En una realización de la invención, el LMA es de aproximadamente 26 kD en la forma monomérica y de aproximadamente 52 kD en la forma dimérica.

Preferentemente, el ligando de LMA es capaz de unirse a LMA cuando el LMA está unido a la membrana o en un estado aislado (por ejemplo, exento de una membrana). Los ligandos de LMA son anticuerpos anti-LMA.

El ligando de LMA se une específicamente a LMA. La expresión "unir específicamente" significa que, en condiciones particulares, el ligando de LMA se une a LMA y no se une a una cantidad significativa de otras proteínas o carbohidratos. La unión específica a LMA en tales condiciones puede requerir que se seleccione un anticuerpo por su especificidad. Se pueden usar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos específicamente con LMA. Por ejemplo, se usan rutinariamente inmunoensayos de ELISA de fase sólida para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos con una proteína o carbohidrato. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de los formatos y las condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Los expertos en la materia conocen los anticuerpos anti-LMA. Por ejemplo, se han usado anticuerpos dirigidos frente a LMA para detectar cadenas ligeras lambda libres en suero u orina en ensayos para el diagnóstico de mieloma múltiple (Bradwell *et al.*, (2001) Clin. Chern. 47:673-680). Sin embargo, hasta la fecha no se ha usado el LMA como diana para el tratamiento de mieloma múltiple o para la localización de células de mieloma en un paciente.

Ejemplos de anticuerpos anti-LMA adecuados incluyen RDI-TRK1L7-3D1 (RDI; Flanders, NJ, USA), CBL317 (Cymbus Biotechnology Ltd, UK), 2G7 (Nakano y Nagata (2003) J Immunol Methods 275; 9-17), L7 o ME-154 (AbCam Ltd (Cambridge, UK) o mAb1306 (Chemicon International, Australia).

Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas, o como modificaciones en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos de dominio que incluyen el dominio V_H o V_L , un dímero de la región variable de cadena pesada (V_{HH} , como se describe para un camélido), un dímero de la región variable de cadena ligera (V_{LL}), fragmentos F_v que contienen solamente las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, o fragmentos F_d que contienen la región variable de cadena pesada y el dominio CH_1 . También se incluyen en el término "anticuerpo" un scF_v que consiste en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera unidas conjuntamente para formar un anticuerpo de cadena sencilla (Bird *et al.*, Science, 242: 424-426 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)) y oligómeros de scF_v tales como dianticuerpos y trianticuerpos. También se incluyen fragmentos de anticuerpos tales como Fab , $(Fab')_2$ y fragmentos $FabFc_2$ que contienen las regiones variables y partes de las regiones constantes. También se incluyen fragmentos de anticuerpo injertados con CDR y oligómeros de fragmentos de anticuerpo. Los componentes de cadena pesada y ligera de un F_v pueden derivar del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos produciendo de ese modo una región F_v quimérica. El anticuerpo puede ser de origen animal (especialmente ratón o rata) o humano o puede ser quimérico (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)) o humanizado (Jones *et al.*, Nature, 321, 522-525 (1986), y documento de solicitud de patente publicada de Reino Unido N° 8707252). Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye estas formas diversas. Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar fácilmente usando las directrices que se proporcionan en el presente documento y los métodos bien conocidos por los expertos en la materia que se describen en las referencias que se han citado anteriormente y en publicaciones tales como Harlow & Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988).

Los anticuerpos que se unen a LMA pueden ser regiones F_v que comprenden una cadena ligera variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H). Las cadenas ligera y pesada se pueden unir directamente o a través de un conector. Como se usa el presente documento, un conector se refiere a una molécula que esta unida covalentemente a la cadena ligera y a la cadena pesada y proporciona un espaciado y una flexibilidad suficientes entre las dos cadenas para que se pueda conseguir una conformación en la que sean capaces de unirse específicamente al epítipo al que están dirigidas. Son particularmente preferentes los conectores de proteína ya que se puede expresar como un componente intrínseco de la parte de la Ig del polipéptido de fusión.

Otra realización preferente de la invención es un anticuerpo scFv de cadena sencilla producido de forma recombinante, preferentemente un scFv humanizado.

Preparación de los genes que codifican los anticuerpos o los fragmentos de los mismos

Los genes que codifican los anticuerpos, los genes tanto de la cadena ligera como de cadena pesada o de partes de los mismos, por ejemplo, la región Fv de cadena sencilla, se pueden clonar a partir de una línea celular de hibridoma. Todos ellos se pueden clonar usando la misma estrategia general. Por lo general, por ejemplo, se realiza la transcripción inversa de poli(A)⁺mARN extraído de las células de hibridoma usando hexámeros aleatorios como cebadores. Para las regiones Fv, los dominios V_H y V_L se amplifican por separado mediante dos reacciones de cadena de polimerasa (PCR). Las secuencias de la cadena pesada se pueden amplificar usando cebadores del extremo 5' que se diseñan de acuerdo con las secuencias de proteínas amino terminales de las cadenas pesadas del anti-LMA respectivamente y cebadores del extremo 3' de acuerdo con secuencias de consenso de la región constante de la inmunoglobulina (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª edición. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Las regiones Fv de cadena ligera se amplifican usando cebadores del extremo 5' diseñados de acuerdo con las secuencias de proteínas amino terminales de las cadenas ligeras del anti-LMA y en combinación con el cebador C-kappa. Un experto en la materia podría reconocer que se pueden emplear numerosos cebadores adecuados para obtener las regiones Fv.

Los productos de PCR se subclonan en un vector de clonación adecuado. Se identifican los clones que contienen el inserto de tamaño correcto mediante restricción de ADN. A continuación se puede determinar secuencia de nucleótidos de las regiones que codifican la cadena pesada o ligera a partir de ADN de cadena doble de plásmido usando cebadores de secuenciación adyacentes al sitio de clonación. Se pueden usar kits disponibles en el mercado (por ejemplo, el kit SeqaenaseTM, United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA) para facilitar la secuenciación del ADN.

De ese modo, se puede preparar el ADN que codifica las regiones Fv mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, técnicas de amplificación tales como reacción de cadena de ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace, Genomics, 4: 560 (1989), Landegren, *et al.*, Science, 241: 1077 (1988) y Barringer, *et al.*, Gene, 89: 117 (1990)), amplificación de transcripción (véase Kwok, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989)), y replicación de secuencia autosostenida (véase Guatelli, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990)), clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68: 90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth Enzymol. 68: 109-151 (1979); el método de dietilfosforamidito de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981); y el método del soporte sólido del documento de Patente de Estados Unidos N° 4.458.066).

La síntesis química produce un oligonucleótido de cadena sencilla. Este se puede convertir en ADN de cadena doble mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como plantilla. Aunque es posible sintetizar químicamente una región Fv de cadena sencilla, es preferente sintetizar un número de secuencias más cortas (de aproximadamente 100 a 150 bases) que más tarde se ligan conjuntamente.

Alternativamente, se pueden clonar subsecuencias y escindir las subsecuencias apropiadas usando enzimas de restricción apropiadas. A continuación, los fragmentos se pueden ligar para producir la secuencia de ADN deseada.

Una vez se obtiene el ADN del Fv de la cadena variable ligera y pesada, se pueden ligar conjuntamente las secuencias, directamente o a través de una secuencia de ADN que codifica un conector peptídico, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. En una realización, las regiones de cadena pesada y ligera se conectan mediante un conector peptídico flexible (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃) que comienza en el extremo carboxílico del dominio Fv de cadena pesada y termina en el extremo amino terminal del dominio Fv de la cadena ligera. La secuencia completa codifica el dominio Fv en forma de una proteína de unión a antígeno de cadena sencilla.

Restos citotóxicos

Restos citotóxicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes tales como toxinas bacterianas o de plantas, fármacos, por ejemplo, ciclofosfamida (CTX; Cytosan), clorambucilo (CHL; leukeran), cisplatino (CisP; CDDP; platinol), busulfán (myleran), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C, y otros agentes alquilantes; metotrexato (MTX), etopósido (VP-16; vepesid), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5FU), dacarbazina (DTIC), 2-clorodesoxiadenosina (2-CdA), y otros antimetabolitos; antibióticos que incluyen actinomicina D, doxorubicina (DXR; adriamicina), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina así como otros antibióticos; alcaloides tales como vincristina (VCR), vinblastina, y similares; así como otros agentes anticancerígenos que incluyen los agentes citostáticos glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; decadron) y corticosteroides tales como prednisona, inhibidores de enzimas de nucleótidos tales como hidroxiaurea, y similares.

Los expertos en la materia entenderán que existen numerosos radioisótopos y agentes quimioterapéuticos que se pueden acoplar a los ligandos de LMA mediante técnicas bien conocidas, y suministrar para destruir específicamente el tejido tumoral. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.542.225 de Blattler *et al.* Ejemplos de toxinas fotoactivadas incluyen dihidropiridina- y omega-conotoxina (Schmidt *et al.*, J Biol. Chem., 1991, 266(27):18025-33). Ejemplos de reactivos de formación de imágenes y citotóxicos que se pueden usar incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ¹²³I, ^{99m}Tc, ³²P, ³H, y ¹⁴C; marcajes fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, y quimioluminiscentes tales como luciferina. El anticuerpo se puede marcar con tales reactivos usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase Wenzel y Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983) para las técnicas relacionadas con el radiomarcado de anticuerpos (véase también, Colcer *et al.*, "Use of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Nude Mice", Methods Enzymol., 121:802-16, 1986: "Order, Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin *et al.* (eds), pp. 303-16 (Academic Press 1985)).

En un ejemplo, el conector-quelante tiuxetano se conjuga a un ligando de LMA, mediante un enlace covalente estable de tiourea para proporcionar un sitio de quelación de alta afinidad para indio-111 o itrio-90.

Cuando una molécula de ADN que codifica un agente citotóxico está presente en una composición terapéutica de la invención, el ADN codifica preferentemente un polipéptido que es una toxina bacteriana o de planta. Estos polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos tales como exotoxina nativa o modificada de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), ricina, abrina, gelonina, momordina II, RIP bacterianos tales como cadenas a de toxina de shiga y similar a shiga, luffina [véase Islam *et al.*, Agricultural Biological Chem., 54(5): 1343-1345 (1990)], atricosantina [véase Chow *et al.*, J. Biol. Chem., 265:8670-8674 (1990)], momordina I [véase Ho *et al.*, BBA, 1088:311-314 (1991)], proteína antiviral Mirabilis [véase Habuka *et al.*, J. Biol. Chem., 264(12):6629-6637 (1989)], proteína antiviral de hierba carmín [véase Kung *et al.*, Agric. Biol. Chem., 54(12):3301-3318 (1990)], biodina 2 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.597.569), gaporina [véase Benatti *et al.*, Eur. J. Biochem., 183:465-470 (1989)], así como variantes modificadas por ingeniería genética de los mismos. La PE nativa y la DT son compuestos altamente tóxicos que por lo general causan la muerte por toxicidad hepática. Preferentemente, PE y DT se modifican en una forma que suprime el componente de dirección nativo de la toxina, por ejemplo, el dominio la de PE y la cadena B de DT. El experto en la materia entenderá que la invención no se limita a un agente citotóxico en particular.

La expresión "exotoxina de *Pseudomonas*" (PE), como se usa en el presente documento, se refiere a una PE nativa de longitud completa (de origen natural) o a una PE que ha sido modificada. Tales modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a, eliminación del dominio la, supresión de diversos aminoácidos en los dominios II y III, sustituciones de aminoácidos individuales (por ejemplo, reemplazo de Lys con Gln en las posiciones 590 y 606), y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo terminal. Véase Siegall *et al.*, J. Biol. Chem., 264: 14256-14261 (1989). De ese modo, por ejemplo, PE38 se refiere a una exotoxina de *Pseudomonas* truncada compuesta por los aminoácidos 253-364 y 381-613. El extremo C-terminal nativo de PE, REDLK (restos 609-613), se puede reemplazar con la secuencia KDEL, REDL, y se pueden mutar cada uno de Lys-590 y Lys-606 a Gln.

La expresión "toxina de la difteria" (DT), como se usa en el presente documento, se refiere a una DT nativa de longitud completa o a una DT que ha sido modificada. Las modificaciones incluyen por lo general la retirada del dominio de dirección en la cadena B y, más específicamente, implica truncar la región carboxílica de la cadena B.

Preparación de polipéptidos de fusión de anticuerpo

Una vez se ha identificado la secuencia de ADN que codifica el resto de unión a LMA (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo anti-LMA) se pueden preparar polipéptidos de fusión que comprenden esa región mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se fusiona un gen que codifica una región Fv con un gen que codifica un resto citotóxico, preferentemente un resto que es un polipéptido. Opcionalmente, el gen de Fv se une a un segmento que codifica un conector peptídico. El conector peptídico puede estar presente simplemente para proporcionar espacio entre el resto de unión a LMA y el resto citotóxico o para facilitar la movilidad entre estas regiones para permitir que cada una alcance su conformación óptima. La secuencia de ADN que comprende el conector también puede proporcionar secuencias (tales como sitios de cebador o sitios de restricción) para facilitar la clonación o puede preservar el marco de lectura entre la secuencia que codifica el resto de unión y la secuencia que codifica el resto citotóxico. Los expertos en la materia conocen bien el diseño de tales péptidos conectores.

Generalmente, la producción de polipéptidos de fusión implica preparar por separado las cadenas ligera y pesada de Fv y el ADN que codifica cualquier otra proteína a la que se fusionan y recombinar las secuencias de ADN en un plásmido u otro vector para formar un constructo que codifica el polipéptido de fusión deseado en particular. Sin embargo, un enfoque más sencillo implica insertar el ADN que codifica la región Fv particular en un constructo que ya codifica el segundo polipéptido deseado. La secuencia de ADN que codifica la región Fv se inserta en el constructo usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Una realización de la invención es un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo producido de forma recombinante que comprende una V_H y una C_H , o una parte del mismo, unido a un polipéptido de unión a ADN. El polipéptido de fusión y el anticuerpo que comprende V_L y C_L , o una parte del mismo, forman en conjunto un anticuerpo recombinante útil para dirigirse a moléculas de ADN preseleccionadas, lineales o circulares, en una célula o tejido que porta la molécula diana preseleccionada.

Otra realización preferente de la invención es un anticuerpo scFv de cadena sencilla producido de forma recombinante, preferentemente un scFv humanizado. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos de cadena sencilla recombinantes que se unen a un polipéptido de unión a ADN y, debido a su capacidad para unirse específicamente al ADN, estos anticuerpos son útiles como restos dirigidos que sirven para dirigirse al ADN que está unido a polipéptido de unión a ADN en una célula o tejido que porta LMA.

Los anticuerpos de cadena sencilla recombinantes de la presente invención se pueden fusionar con, o unirse de otro modo a la citotoxina o a otra molécula que tiene una actividad específica mediante cualquier método conocido y disponible en la técnica. Los dos componentes se pueden unir químicamente entre sí mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos químicos bien conocidos. Por ejemplo, la unión puede ser mediante reticuladores heterodifuncionales, por ejemplo, SPDP, carbodiimida, glutaraldehído, o similares. La producción de diversas inmunotoxinas, así como los métodos de conjugación química, se conocen bien en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe *et al.*, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982); Waldmann, Science, 252: 1657 (1991); Vitetta *et al.*, 1987, Science, 238:1098; Pastan *et al.*, 1986; Cell, 47:641; y Thorpe *et al.*, 1987, Cancer Res., 47:5924. Estos métodos conjugan generalmente la citotoxina y el anticuerpo por medio de agentes de reticulación que introducen un enlace disulfuro entre los dos polipéptidos. Se ha mostrado que las inmunotoxinas que se han preparado con uniones no reducibles son sistemáticamente menos citotóxicas que toxinas similares reticuladas mediante enlaces disulfuro.

Otros reactivos preferentes son clorhidrato de 2-iminotiolano (2IT), S-4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil bencil tiosulfato de sodio (SMBT) y 2IT o succinimidiloxycarbonil- α -metil- α (2-piridilditio)-tolueno y 2IT. Cada grupo de reactivos introduce un enlace disulfuro entre la citotoxina y el anticuerpo que es reducible, pero el enlace también es resistente a la ruptura proporcionando la estabilidad del conjugado *in vitro* e *in vivo*. Tras la introducción en lisosomas o endosomas mediante la célula diana, el enlace se reduce. Por ejemplo, el uso de moléculas de PE recombinante con un anticuerpo, una forma de la molécula de PE con una cisteína en la posición de aminoácido 287, es preferente para acoplar la toxina al anticuerpo o a otro ligando a través del resto tiol de la cisteína.

En una realización, el resto de unión a LMA también se puede fusionar con una citotoxina mediante medios recombinantes tales como mediante el uso de técnicas de ADN recombinante para producir un ácido nucleico que codifica tanto el anticuerpo como la citotoxina y que expresa la secuencia de ADN recombinante en una célula huésped, tal como una célula eucariota, por ejemplo, de mamífero tal como células CHO o COS, o procariota, por ejemplo, un huésped *E. coli*. El ADN que codifica el polipéptido de fusión se puede clonar en ADNc o en forma genómica mediante cualquier procedimiento de clonación conocido por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

Un experto en la materia podría reconocer que después de la síntesis química, la expresión biológica, o la purificación, un polipéptido de fusión puede poseer una conformación básicamente diferente que el anticuerpo nativo. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y a continuación hacer que el polipéptido se repliegue en la conformación preferente. Los expertos en la materia conocen bien los métodos de reducción y desnaturalización del polipéptido y de inducción al repliegado. (Véase, Debinski *et al.*, J. Biol. Chem, 268: 14065-14070 (1993); Kreitman y Pastan, Bioconjug. Chem., 4: 581-585 (1993); y Buchner, *et al.*, Anal. Biochem., 205: 263-270 (1992). Por ejemplo, Debinski *et al.*, describen la desnaturalización y la reducción de proteínas de cuerpo de inclusión en guanidina-DTE. El polipéptido se repliega a continuación en un tampón redox que contiene glutatión y L-arginina oxidados.

Un experto en la materia podría reconocer que se pueden realizar modificaciones en los polipéptidos de fusión sin reducir su actividad biológica. Se pueden realizar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la parte del anticuerpo del polipéptido de fusión en el polipéptido de fusión. Los expertos en la materia conocen bien tales modificaciones e incluyen, por ejemplo, la adición de una metionina en el extremo amino terminal para proporcionar un sitio de iniciación, la adición de His-Tag en cualquier extremo del polipéptido para facilitar la purificación o la colocación de aminoácidos adicionales en cualquier extremo para crear sitios de restricción o codones de determinación convenientemente localizados.

Un experto en la materia reconocerá que se pueden realizar otras modificaciones. De ese modo, por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos que aumenten la especificidad o la afinidad de unión del polipéptido de fusión. Alternativamente, se pueden acortar regiones no esenciales de la molécula o eliminar por completo. De ese modo, cuando existen regiones de la molécula que no están implicadas por sí mismas en la actividad de la molécula, se pueden eliminar o reemplazar por segmentos más cortos que sirven para mantener las relaciones espaciales correctas entre los componentes activos de la molécula. Alternativamente, se pueden colocar segmentos más

flexibles en las regiones de interdominio que pueden facilitar a continuación el replegado o la producción de la molécula (Brinkmann, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3075-3079 (1992).

Anticuerpos monoclonales

Un experto en la materia puede producir fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos frente a los epítomos LMA. Se conoce bien la metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas. Se pueden crear líneas celulares inmortales de producción de anticuerpos mediante fusión celular, y también mediante otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transformación con el virus de Epstein-Barr. Se puede realizar una identificación sistemática de paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epítomos de LMA para diversas propiedades; es decir, para el isotipo y la afinidad por el epítomo.

Se pueden usar anticuerpos monoclonales derivados de ratón para inmunoterapia tanto *in vivo* directa como extracorpórea. Sin embargo, se ha observado que cuando se usan anticuerpos monoclonales derivados de ratón en seres humanos como agentes terapéuticos, el paciente produce anticuerpos humanos anti-ratón. De ese modo, los anticuerpos monoclonales derivados de ratón no son preferentes para terapia, especialmente para uso a largo plazo. Sin embargo, con las técnicas establecidas de ingeniería genética es posible crear anticuerpos quiméricos o humanizados que tienen partes derivadas de animal y derivadas de ser humano. El animal puede ser un ratón o cualquier roedor tal como una rata.

Si la región variable del anticuerpo quimérico deriva de ratón, mientras que la región constante derive de ser humano, el anticuerpo quimérico será generalmente menos inmunogénico que un anticuerpo monoclonal derivado de ratón "puro". Estos anticuerpos quiméricos serían probablemente más adecuados para uso terapéutico, de lo que resultaría que los anticuerpos derivados de ratón "puros" son inadecuados.

Anticuerpos quiméricos

Las metodologías para generar anticuerpos quiméricos están disponibles a las que hay en la técnica. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada se pueden expresar por separado usando, por ejemplo, cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada de inmunoglobulina en plásmidos separados. Estas se pueden purificar a continuación y ensamblar *in vitro* en anticuerpos completos; se han descrito las metodologías para conseguir tal ensamblaje. Véase, por ejemplo, Scharff, M., Harvey Lectures 69:125 (1974). Véase también Oi *et al.*, Bio Techniques 4(4):214-221 (1986); y Sun *et al.* Hybridoma 5 (1986) Suppl 1:517-20. Tal constructo de ADN puede comprender ADN que codifica genes dispuestos funcionalmente para la región variable de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo anti-LMA unido a ADN que codifica una región constante humana. Las células linfoides tales como mielomas o hibridomas transfectadas con los constructos de ADN para las cadenas ligera y pesada pueden expresar y ensamblar las cadenas de anticuerpo.

También se han descrito los parámetros de reacción *in vitro* para la formación de anticuerpos IgG a partir de las cadenas ligera y pesada aisladas reducidas. Véase, por ejemplo, Beychok, S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, Nueva York, p. 69, 1979. También es posible la expresión conjunta de las cadenas ligera y pesada en las mismas células para conseguir la asociación intracelular y la unión de las cadenas pesada y ligera en anticuerpos IgG H2L2 completos. Tal expresión conjunta se puede conseguir usando plásmidos iguales o diferentes en la misma célula huésped.

Anticuerpos humanizados

En otra realización preferente de la presente invención, el anticuerpo anti-LMA es humanizado, es decir, un anticuerpo producido mediante técnicas de modelado molecular en las que se maximiza el contenido humano del anticuerpo mientras que causa poca o ninguna pérdida de afinidad de unión atribuible a la región variable del anticuerpo murino.

Los métodos descritos posteriormente son aplicables a la humanización de anticuerpos anti-LMA.

Existen varios factores a considerar en la decisión de qué secuencia de anticuerpo humano usar durante la humanización. La humanización de las cadenas ligera y pesada se considera independientemente entre sí, pero el razonamiento es básicamente similar para cada una.

Este proceso de selección se basa en el siguiente razonamiento: se determinan principalmente una especificidad y una afinidad al antígeno del anticuerpo determinado mediante la secuencia de aminoácidos de las CDR de la región variable. Los restos del marco del dominio variable tienen poca o ninguna contribución directa. La función principal de las regiones marco es mantener los CDR en su orientación espacial apropiada para reconocer el antígeno. De ese modo, la sustitución de los CDR de roedor en un marco de dominio variable humano es más probable que resulte en la retención de su orientación espacial correcta si el marco de dominio variable humano es altamente homólogo con el dominio variable de roedor de que se origina. Por lo tanto, se elegiría preferentemente un dominio

variable humano que sea altamente homólogo con el dominio o dominios variables de roedor. La secuencia del dominio variable del anticuerpo humano se puede seleccionar como sigue a continuación:

5 Etapa 1. Usando un programa de ordenador, buscar en todas las bases de datos de proteínas (y ADN) disponibles las secuencias del dominio variable del anticuerpo humano que son las más homólogas con los dominios variables del anticuerpo de roedor. La salida de un programa adecuado es una lista de las secuencias más homólogas con el anticuerpo de roedor, el porcentaje de homología de cada secuencia, y una alineación de cada secuencia con la secuencia de roedor. Esto se hace independientemente para las secuencias del dominio variable de la cadena tanto pesada como ligera. El análisis anterior se consigue más fácilmente si solo se incluyen secuencias de
10 inmunoglobulina humana.

Etapa 2. Listar las secuencias del dominio variable del anticuerpo humano y comparar su homología. Principalmente, la comparación se lleva a cabo para la longitud de las CDR, excepto la CDR3 de la cadena pesada que es bastante variable. Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa y lambda humanas se dividen en subgrupos; 3
15 subgrupos de cadena pesada, 4 subgrupos de cadena kappa, y 6 subgrupos de cadena lambda. Habitualmente, es posible emparejar una CDR de anticuerpo de roedor con uno de los subgrupos humanos como primera aproximación de la homología. A continuación se comparan los anticuerpos que portan CDR de longitud similar para la homología de secuencia de aminoácidos, especialmente en las CDR, pero también en las regiones marco circundantes. Se escoge el dominio variable humano que sea el más homólogo como el marco para la humanización.

20 *Metodologías/técnicas de humanización reales*

Se puede humanizar un anticuerpo mediante injerto de las CDR deseadas en un marco humano de acuerdo con el documento de Patente EP-A-0239400. Por lo tanto, se puede preparar la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo remodelado deseado comenzando con el ADN humano cuyas CDR se desean remodelar. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de roedor que contiene las CDR deseadas se compara con la secuencia del dominio variable del anticuerpo humano seleccionada. Se marcan los restos del dominio variable humano que se necesitan cambiar en el correspondiente resto en el roedor para preparar la región variable humana que incorpora las CDR de roedor. También puede haber restos que se necesiten sustituir, añadir o suprimir en la secuencia humana.
25
30

Se sintetizan oligonucleótidos que se puedan usar para mutagenizar el marco de dominio variable humano para que contenga los residuos deseados. Estos oligonucleótidos pueden ser de cualquier tamaño conveniente. Normalmente, solo se está limitado en longitud por las capacidades del sintetizador en particular disponible. Se conoce bien el método de mutagénesis *in vitro* dirigida por oligonucleótidos.
35

Alternativamente, se puede conseguir la humanización usando la metodología de reacción de cadena de polimerasa recombinante (PCR) del documento de Patente WO 92/07075. Usando esta metodología, se puede cortar y empalmar una CDR entre las regiones marco de un anticuerpo humano.
40

En general, la técnica del documento de Patente WO 92/07075 se puede llevar a cabo usando una plantilla que comprende dos regiones marco humanas, AB y CD, y entre ellas, la CDR que se va a reemplazar mediante una CDR donadora. Se usan los cebadores A y B para amplificar la región marco AB, y se usan los cebadores C y D para amplificar la región marco CD. Sin embargo, los cebadores B y C también contienen cada uno, en sus extremos 5', una secuencia adicional que corresponde a la totalidad o al menos a una parte de la secuencia de la CDR donadora. Los cebadores B y C se superponen en una longitud suficiente para permitir la alineación de sus extremos 5' entre sí en condiciones que permitan que se lleve a cabo una PCR. De ese modo, las regiones AB y CD amplificadas pueden experimentar corte y empalme de genes mediante superposición en extensión para producir el producto humanizado en una reacción única.
45
50

Transfección y expresión del anticuerpo remodelado

Después de las reacciones de mutagénesis para remodelar el anticuerpo, los ADN mutagenizados se pueden unir a un ADN apropiado que codifica una región constante de cadena ligera o pesada, clonar en un vector de expresión, y transfectar en células huésped, preferentemente células de mamífero. Estas etapas se pueden llevar a cabo de forma rutinaria. Por lo tanto, se puede preparar un anticuerpo remodelado mediante un proceso que comprende:
55

(a) preparar un primer vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig, comprendiendo el dominio variable las regiones marco de un anticuerpo humano y las CDR requeridas para el anticuerpo humanizado de la invención;
60

(b) preparar un segundo vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig complementaria, respectivamente;
65

(c) transformar una línea celular con el primero o ambos vectores preparados; y

(d) cultivar dicha línea celular transformada para producir dicho anticuerpo alterado.

5 Preferentemente, la secuencia de ADN en la etapa (a) codifica tanto el dominio variable como cada dominio constante de la cadena de anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado se puede preparar usando cualquier sistema de expresión recombinante adecuado. La línea celular que se transforma para producir el anticuerpo alterado puede ser una línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) o una línea celular inmortalizada de mamífero, que es ventajosamente de origen linfoide, tal como una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma o cuadroma. La línea celular también puede comprender una célula linfoide normal, tal como un linfocito B, que se ha inmortalizado por transformación con un virus, tal como el virus de Epstein-Barr. Lo más preferentemente, la línea celular inmortalizada es una línea celular de mieloma o una derivada de la misma.

15 Las células CHO usadas para la expresión de los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr) y de ese modo dependientes de timidina e hipoxantina para el crecimiento (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acac. Sci. U.S.A., 77 4216-4220 (1980)). La línea celular CHO dhfr progenitora se transfecta con el ADN que codifica el anticuerpo y el gen de dhfr que permite la selección de transformantes de células CHO de fenotipo dhfr positivo. La selección se lleva a cabo cultivando las colonias en medios desprovistos de timidina e hipoxantina, la ausencia de las cuales evita que crezcan las células sin transformar y se transformen en células a partir de las que se recupere la ruta del folato y de ese modo se sortee el sistema de selección. Estos transformantes expresan habitualmente bajos niveles del ADN de interés en virtud de la integración conjunta de ADN transfectado de interés y ADN que codifica dhfr. Los niveles de expresión del ADN que codifica el anticuerpo se pueden aumentar mediante amplificación usando metotrexato (MTX). Este fármaco es un inhibidor directo de la enzima dhfr y permite el aislamiento de las colonias resistentes que amplifican su número de copias del gen dhfr lo suficiente para sobrevivir en estas condiciones. Dado que las secuencias de ADN que codifican dhfr y el anticuerpo están unidas próximamente en los transformantes originales, habitualmente existe una amplificación concomitante, y por lo tanto se aumenta la expresión del anticuerpo deseado.

30 Otro sistema de expresión preferente para su uso con células CHO o de mieloma es el sistema de amplificación de glutamina sintetasa (GS) que se describe en el documento de Patente WO 87/04462. Este sistema implica la transfección de una célula con ADN que codifica la enzima GS y con ADN que codifica el anticuerpo deseado. A continuación se seleccionan las células que crecen en medio libre de glutamina y que por lo tanto se puede suponer han integrado el ADN que codifica GS. Estos clones seleccionados se someten a continuación a inhibición de la enzima GS usando metionina sulfoximina (Mtx). Las células, con el fin de sobrevivir, amplifican el ADN que codifica GS con amplificación concomitante del ADN que codifica el anticuerpo.

40 Aunque la línea celular usada para producir el anticuerpo humanizado es preferentemente una línea celular de mamífero, se puede usar alternativamente cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana o una línea celular de levadura. En particular, se prevé que se puedan usar cepas bacterianas derivadas de *E. coli*. Se comprueba la funcionalidad del anticuerpo obtenido. Si se pierde la funcionalidad, es necesario volver a la etapa (2) y alterar el marco del anticuerpo.

45 Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas individuales ligera y pesada, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden recuperar y purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Para usos farmacéuticos son preferentes inmunoglobulinas básicamente puras de al menos aproximadamente un 90 a un 95 % de homogeneidad, lo más preferentemente de un 98 a un 99 % o más de homogeneidad. Una vez purificado, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, el anticuerpo humanizado se puede usar a continuación de forma terapéutica o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones de inmunofluorescencia, y similares (véase, en general, Immunological Methods, Vols. I y II, Lefkovits y Pernis, eds., Academic Press, Nueva York, N.Y. (1979 y 1981)).

55 Estudios llevados a cabo por Greenwood y Clark ((1993) Eur. J. Immunol. 23:1098-1104) han demostrado que el reconocimiento de la región Fc de un anticuerpo mediante células efectoras humanas se puede optimizar mediante ingeniería genética de la región constante de la molécula de inmunoglobulina. Esto se podría conseguir mediante la fusión de los genes de la región variable del anticuerpo, con la especificidad deseada, con los genes de la región constante humana que codifican los isotipos de inmunoglobulina que han mostrado ADCC eficaz en sujetos humanos, por ejemplo los isotipos IgG1 e IgG3 (Greenwood y Clark (1993) Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Editado por Mike Clark, publicado por Academic Titles. Sección II 85-113). Los anticuerpos quiméricos o humanizados resultantes frente a LMA serían particularmente eficaces en la inducción de ADCC.

65 También se pueden preparar anticuerpos con regiones variables completamente humanas frente a LMA mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos lugares endógenos se han deshabitado. Se pueden llevar a cabo

diversas manipulaciones posteriores para obtener cualquier anticuerpo por sí mismo o análogos del mismo (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.075.181).

5 En un aspecto, el uso de la presente invención utiliza los anticuerpos o los fragmentos de unión sin modificación, contando con la unión de los anticuerpos o los fragmentos a los LMA de la superficie de las células de mieloma *in situ* para estimular un ataque inmune sobre las mismas. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo quimérico, en el que el sitio de unión al antígeno está unido a la región Fc humana, por ejemplo, IgG1, para estimular la citotoxicidad mediada dependiente de anticuerpo o la citotoxicidad mediada por complemento.

10 En otro aspecto de la invención, el uso se puede llevar a cabo usando restos de unión a LMA a los que se une un agente citotóxico o modificador biológico. La unión del conjugado resultante a las células tumorales inhibe el crecimiento o destruye las células.

15 También se pueden usar terapéuticamente anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos en los anticuerpos de la invención para la inmunización del tumor activo y la terapia tumoral (véase, por ejemplo, Hellstrom *et al.*, "Anti Idiotypes" in Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy, citado anteriormente en pp. 35-41).

20 En el área de mieloma múltiple, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la presente invención tienen utilidad adicional en la preparación de muestras celulares de las que se han retirado células de mieloma. Este uso es particularmente importante en trasplantes de médula ósea autóloga, en los que se recoge una muestra de médula ósea de un paciente con cáncer antes de que el paciente experimente quimioterapia a dosis elevada. El objetivo de la quimioterapia a dosis elevada es destruir las células cancerígenas, lo que también resulta en la reducción de las células de la médula ósea. Después de tal tratamiento, se introducen las células de médula ósea recogidas en el
25 paciente.

En el mieloma y las enfermedades relacionadas, la médula ósea recogida está contaminada con células de mieloma; de ese modo, la reintroducción de médula ósea sin tratar simplemente reintroducirá la enfermedad. Los métodos previos para evitar la reintroducción de las células cancerígenas han incluido el tratamiento de la muestra de médula
30 ósea con agentes quimioterapéuticos y otros agentes antineoplásicos *in vitro*. Otros métodos incluyen purgar la muestra de las células cancerígenas.

En una práctica adicional de la presente invención, los anticuerpos monoclonales y los fragmentos que se describen en el presente documento se pueden usar para retirar células de mieloma de una muestra de médula ósea de un
35 paciente antes de la reintroducción en el paciente. En un ejemplo no limitante, los anticuerpos monoclonales, o los fragmentos de unión, se unen a una matriz, tal como perlas. Esto se puede conseguir mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos para la preparación de una matriz de afinidad que comprende anticuerpos o sus fragmentos de unión. A continuación, la muestra de médula ósea se expone a la matriz, tal como mediante el paso de las células sobre una columna que contiene la matriz, en condiciones que estimulan la unión de las células de mieloma de la
40 muestra mediante interacciones antígeno/anticuerpo a los anticuerpos o a los fragmentos de unión unidos a la matriz. Las células de mieloma de la muestra se adhieren a la matriz; mientras que el efluente de la columna, es decir, la población celular no adherente, se reduce en células de mieloma. La eficacia del procedimiento se puede monitorizar examinando las células para células de mieloma residuales, tal como usando un anticuerpo marcado de forma detectable como se describe posteriormente. El procedimiento se puede repetir o modificar para aumentar la
45 eficacia.

Este procedimiento de purga (véase, por ejemplo, Ramsay *et al.*, J. Clin. Immunol., 8(2):81-88, 1988) se puede llevar a cabo junto con otros métodos para retirar o destruir células cancerígenas, que incluyen, pero no se limitan a, exponer las células de médula ósea purificadas a agentes quimioterapéuticos. Tales agentes quimioterapéuticos incluyen el uso de los anticuerpos o los fragmentos de unión del anticuerpo de la presente invención conjugados a un agente citotóxico, como los que se han descrito anteriormente para el tratamiento terapéutico *in vivo*. Por lo tanto, los conjugados de los anticuerpos o de los fragmentos de anticuerpo de la presente invención con agentes citotóxicos se pueden usar para la destrucción *ex vivo* de células tumorales en una muestra celular. Los métodos pueden incluir además exponer las células a citoquinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-6), receptores de citoquina (por
50 ejemplo, receptor de IL-6), mitógenos (por ejemplo, mitógeno de hierba carmín (PWM)), o moléculas de adhesión (por ejemplo, ligando de CD40) con el fin de estimular que las células de mieloma se diferencian rápidamente y sobrerregulen de ese modo la expresión de antígenos específicos de cáncer en su superficie celular. Se pretende que estas modalidades de tratamiento hagan vulnerables las células de mieloma a la citotoxicidad mediada *in vitro* conseguida mediante la incubación con el anticuerpo monoclonal, o los fragmentos del mismo, de acuerdo con la
60 presente invención.

En otro aspecto de los métodos terapéuticos de la presente invención, los anticuerpos, o los fragmentos de unión de los mismos, conjugados con agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos, una toxina fotoactivable, o un radionúclido se pueden usar *in vitro* o *ex vivo* para inhibir o destruir células de mieloma de una muestra de
65 médula ósea, en ausencia de la técnica de purga que se ha descrito anteriormente. El tratamiento de la muestra con los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo, citotóxicos se puede combinar con otros métodos para destruir

células cancerígenas y para aumentar la eficacia de un trasplante de médula ósea, particularmente un trasplante de médula ósea autóloga, retirando las células del tejido que se va a trasplantar. Estos métodos pueden incluir además exponer las células a citoquinas, etc. De ese modo, en el presente documento se describe un método para retirar células de mieloma de una muestra celular aislada que comprende las etapas de exponer la muestra celular a una matriz sólida sobre la que se une un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión de anticuerpo como se describe en el presente documento, en condiciones en las que las células de mieloma se adhieren al anticuerpo monoclonal, o al fragmentos de unión del mismo, y aislar una fracción celular de la muestra celular que no se une a la matriz. A modo de ejemplo no limitante, se usan células de médula ósea, particularmente para un trasplante, y preferentemente un trasplante de médula ósea autóloga.

Como entenderán los expertos en la materia, algunos pacientes de mieloma tienen niveles considerables de cadena ligera lambda libre en su circulación. Dado que los anticuerpos anti-LMA reaccionan con estas cadenas ligeras libres, su presencia en el fluido de sujeto puede reducir la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, el método de tratamiento comprende además la etapa de tratar al sujeto para reducir los niveles de cadenas ligeras lambda libres que circulan en el fluido (por ejemplo, sangre) del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-LMA. Esta etapa de tratamiento adicional puede implicar, por ejemplo, plasmaféresis. Como conocen bien los expertos en la materia, la plasmaféresis es un proceso en el que se retira el plasma de las células sanguíneas mediante un dispositivo conocido como separador celular. El separador trabaja mediante centrifugación de la sangre a alta velocidad para separar las células del fluido o mediante el paso de la sangre a través de una membrana con poros tan pequeños que solo el plasma puede pasar a su través. Las células se devuelven al sujeto, mientras que el plasma, que contiene las cadenas ligeras kappa libres, se descarta y se reemplaza por otros fluidos. Se puede administrar medicación para evitar que la sangre coagule (por ejemplo, un anticoagulante) a través de una vena durante el procedimiento.

Se entenderá que los métodos de tratamiento de trastornos de linfocitos B tales como mieloma múltiple que implican el uso de anticuerpos anti-LMA se pueden llevar a cabo de forma separada o en combinación con regímenes de quimioterapia o radioterapia conocidos. Por ejemplo, el tratamiento de anticuerpo anti-LMA se puede llevar a cabo junto con o después del tratamiento con fármacos tales como melfalán o ciclofosfamida.

Composiciones farmacéuticas, dosificaciones, y vías de administración

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-LMA junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para la administración parenteral, tópica, oral, o local, tal como mediante aerosol o transdérmicamente, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración preferente de los anticuerpos anti-LMA es parenteral; como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. De estas, la administración intravenosa es la más preferente.

Las composiciones para administración comprenderán habitualmente una solución del anticuerpo disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente exentas de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de calcio, lactato sódico y similares. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

El crecimiento de las células tumorales se puede inhibir o reducir por administración a un sujeto con necesidad del tratamiento de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LMA. Por lo general, el anticuerpo se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 2000 mg/kg de peso corporal por dosis, y más preferente de aproximadamente 0,01 a 500 mg/kg de peso corporal por dosis. Se pueden administrar dosis repetidas según prescripción del médico a cargo del tratamiento. Sin embargo, también son adecuadas otras cantidades. Generalmente, la administración del anticuerpo se lleva a cabo por infusión de modo que la cantidad de anticuerpo presente que puede producir un efecto perjudicial se pueda mantener bajo control variando la cantidad de administración. Por lo general, la infusión de una dosis puede durar unas pocas horas. Sin embargo, también se contempla en el presente documento la infusión constante de una dosis con fines terapéuticos que pueda permitir el mantenimiento de un nivel constante del anticuerpo en suero. La infusión del anticuerpo anti-LMA se puede llevar a cabo como sigue a continuación. El tubo intravenoso (I.V.) se puede pretratar, por ejemplo, con NaCl al 0,9 % y albúmina de suero humano al 5 % y colocarse para administración intravenosa. La infusión I.V. puede comprender un volumen total de 250 ml de NaCl al 0,9 % y albúmina de suero humano al 5 % y se infunde durante un período de aproximadamente 2 horas dependiendo de cualquier efecto secundario observado dependiente de la cantidad. Se

deberían comprobar los signos vitales, por ejemplo, cada quince minutos durante la infusión y cada hora después de la infusión hasta estabilidad. Se puede realizar un examen físico cardiopulmonar exhaustivo antes, y a la conclusión, de la infusión. Se pueden mantener a mano medicaciones que incluyen acetaminofeno, difenhidramina, epinefrina, y corticosteroides para el tratamiento de reacciones alérgicas que pudieran ocurrir. La administración de anticuerpo se puede repetir según se vea deseable por el médico.

En un ejemplo de la presente invención, se suministra una forma radiomarcada del anticuerpo anti-lambda mediante inyección intravenosa como agente terapéutico para dirigirse a células que expresan el LMA. Los expertos en la materia conocen los ejemplos previos de anticuerpos radiomarcados y los métodos para su administración a pacientes como sustancias terapéuticas. Los ejemplos incluyen Lym-1 marcado con yodo¹³¹, frente a la subunidad β de HLA-DR (DeNardo SJ *et al.* Antibody Immunoconj Radiophar (1988) 1:17-33; DeNardo SJ *et al.* Lit J Biol Markers (1987) 2:49-53) y Ibritumomab Tiuxetan marcado con indio¹¹¹ e itrio⁹⁰ anti-CD20 (IDEC-Y2B8, ZEVALIN[®]) y Tositumomab yodo I¹³¹ (BEXXAR[®]).

En cualquier régimen de tratamiento, la composición terapéutica se puede administrar a un paciente individualmente o en un cóctel que contiene otros agentes terapéuticos, o composiciones, o similares, que incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunosupresores, agentes que inducen tolerancia, potenciadores y agentes que alivian los efectos secundarios. Son particularmente preferentes agentes inmunosupresores útiles en suprimir reacciones alérgicas de un huésped. Agentes inmunosupresores preferentes incluyen prednisona, melfalán, prednisolona, DECADRON (Merck, Sharp & Dohme, West Point, Pa.), ciclofosfamida, ciclosporina, 6-mercaptopurina, metotrexato, azatioprina y gamma globulina i.v. o su combinación. Potenciadores preferentes incluyen monensina, cloruro de amonio, perhexilina, verapamilo, amantadina y cloroquina. Todos estos agentes se administran en los intervalos de dosis eficaces generalmente aceptadas tales como las que se desvelan en Physician's Desk Reference, 41^a Ed., Publisher Edward R. Barnhart, N.J. (1987), documento de solicitud de patente del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT) WO 89/069767 publicado el 10 de agosto de 1989.

Ensayos y kits diagnósticos

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser útiles para aplicaciones diagnósticas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para detección de células de mieloma múltiple humanas. Los métodos diagnósticos *in vitro* incluyen detección inmunohistológica de células tumorales. Las técnicas inmunohistoquímicas implican la tinción de una muestra biológica tal como una muestra de tejido con el anticuerpo de la invención y a continuación la detección de la presencia del anticuerpo complejado con su antígeno en forma de un complejo antígeno-anticuerpo. La formación de tales complejos anticuerpo-antígeno con la muestra indica la presencia de células de mieloma múltiple en el tejido. La detección del anticuerpo en la muestra se puede conseguir usando técnicas conocidas en la técnica tales como técnicas inmunoenzimáticas, por ejemplo, la técnica de tinción con inmunoperoxidasa, o la técnica de avidina-biotina, o técnicas de inmunofluorescencia (véase, por ejemplo, Ciocea *et al.*, "Immunohistochemical Techniques Using Monoclonal Antibodies", Methods Enzymol, 121:562-79, 1986 y Kimball, (ed), Introduction to Immunology (2^a Ed), pp. 113-117 (Macmillan Pub. Co., 1986).

Por ejemplo, la detección es mediante la detección de un enlace marcado en el polipéptido de fusión. Los expertos en la materia conocen bien los medios de marcado de polipéptidos. Los marcajes pueden ser unido directamente a través de un enlace covalente o covalentemente a través de una molécula de unión que porta por lo general sitios reactivos capaces de formar enlaces covalentes con el marcaje y el anticuerpo respectivamente. Un enfoque habitual es marcar el polipéptido y el marcaje con avidina o estreptavidina o biotina que, a su vez, se unen irreversiblemente entre sí.

Los expertos en la materia conocen bien los marcajes adecuados. El término "marcaje", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, marcajes útiles incluyen moléculas radioactivas tales como ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ³⁵S, colorantes fluorescentes tales como fluoresceína o rodamina, reactivos densos en electrones, isotiocianato; cromóforos, enzimas (como se usa habitualmente en un ELISA), enzimas luminiscentes tales como luciferasa y similares.

Tales anticuerpos o fragmentos de unión marcados se pueden usar para la localización histológica de los antígenos, para ELISA, para clasificación celular, o para otras técnicas inmunológicas para detectar y/o cuantificar los antígenos, y las células que portan los antígenos, por ejemplo. Como se ha indicado anteriormente, un uso particular de tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos, marcados es en la determinación de la eficacia de la reducción de células de mieloma de un tejido de médula ósea antes de un trasplante, particularmente un trasplante de médula ósea autóloga.

La presente invención se puede usar para métodos de generación de imágenes para mieloma múltiple usando anticuerpos anti-LMA como se ha descrito anteriormente en el presente documento. También son susceptibles a estos procedimientos diagnósticos otros cánceres que portan el LMA. El uso puede implicar la administración o la infusión de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión como se describe en el presente documento, con o sin

conjugación a un resto detectable, tal como un radionúclido. Después de la administración o la infusión, el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, se une a las células tumorales, después de lo cual se detecta la localización de los anticuerpos, o los fragmentos. Para anticuerpos o sus fragmentos de unión marcados de forma detectable, tales como los marcados con un radionúclido, se puede usar instrumentación de formación de imágenes para identificar la localización del agente en el cuerpo. Para el uso de anticuerpos o fragmentos sin marcar, se puede administrar un segundo reactivo detectable que localiza con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y de ese modo se pueden detectar adecuadamente. Estos métodos se han usado para otros anticuerpos, y los expertos en la materia estarán suficientemente informados de estos métodos diversos para la formación de imágenes de la localización de anticuerpos o fragmentos en el cuerpo.

La detección de la localización anatómica de células cancerígenas que portan LMA puede ser útil para la planificación posterior de la terapia antitumoral en cada paciente particular. En particular, se puede llevar a cabo el diagnóstico patológico inmunohistoquímico en secciones de tejido (por ejemplo, biopsias), muestras de fluido (por ejemplo, sangre) o preparaciones citológicas usando los polipéptidos de fusión de la presente invención.

La presente invención se puede usar para kits para con fines de investigación o diagnóstico. Un kit incluye por lo general uno o más recipientes que contienen un anticuerpo anti-LMA. El anticuerpo anti-LMA se puede derivatizar con un marcaje o, alternativamente, se puede unir a un marcaje secundario para proporcionar la detección posterior. Como se ha descrito anteriormente, tales marcajes pueden incluir radiomarcajes, marcajes fluorescentes, marcajes enzimáticos, es decir, peroxidasa de rábano (HRP), o similares. El kit también puede contener marcajes secundarios apropiados (por ejemplo, un anticuerpo de oveja antirratón-HRP, o similares). El kit también puede contener diversos reactivos para facilitar la unión de los polipéptidos de fusión, la retirada de anticuerpos de unión no específica, y la detección de los marcajes unidos. Los expertos en la materia conocen bien tales reactivos.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden el anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión del anticuerpo como se ha descrito anteriormente, unido a un soporte sólido. Un soporte sólido para su uso en la presente invención será inerte a la unión en las condiciones de reacción. Un soporte de fase sólida para su uso en la presente invención debe tener grupos reactivos o grupos activados con el fin de unir el anticuerpo monoclonal o su compañero de unión al mismo. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser un soporte cromatográfico útil, tal como los polímeros de carbohidrato SEPHAROSE.RTM., SEPHADEX.RTM., o agarosa. Como se usa el presente documento, un soporte de fase sólida no está limitado a un tipo de soporte específico. En su lugar, están disponibles una gran cantidad de soportes y se conocen por los expertos habituales en la materia. Los soportes de fase sólida incluyen, por ejemplo, geles de sílice, resinas, películas plásticas derivatizadas, perlas de vidrio, algodón, perlas de plástico, geles de alúmina, perlas magnéticas, membranas (que incluyen, pero no se limitan a, nitrocelulosa, celulosa, nailon, y lana de vidrio), placas o pocillos de plástico y vidrio, etc.

Generalmente, los métodos para el uso de los kits de investigación y diagnóstico que se han descrito anteriormente se conocen bien, y se proporcionan en términos generales en un manual de instrucciones para el uso del kit.

Con el fin de que la presente invención se pueda entender con mayor claridad, se describirán formas preferentes por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Materiales y métodos

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales murinos (mAb) que se usan en estos estudios son frente a cadenas ligeras lambda libres (λLC) y eran del isotipo IgG2a. Los mAb designados en el presente documento como L7 (clon 3D12) y ME 154 (clon ME-154) se obtuvieron en AbCam Ltd. (Cambridge, UK). El mAb designado en el presente documento como mab1306 (clon HP6054) se obtuvo en Chemicon International Inc. (Melbourne, Victoria, Australia).

Línea celular

Se obtuvo una línea celular de mieloma múltiple humano de tipo lambda (LP-1) en la Colección de Microorganismos y Cultivos Celulares Alemana (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las células se mantuvieron en Iscoves MDM y FBS al 20 % a 37 °C con un 5 % de CO₂ de acuerdo con las recomendaciones de DSMZ.

ELISA

Se estableció la especificidad de los mAb L7, mab1306 y ME 154 para una diversidad de cadenas ligeras lambda libres humanas (λLC) mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los antígenos específicos consistieron en cadenas ligeras lambda libres humanas (Proteínas de Bence Jones, BJP) que se aislaron de la orina de pacientes con mieloma múltiple de tipo lambda. Se purificaron cuatro muestras de λLC, Lam F, Lam H, Lam K y Lam Q y se separaron en las fracciones monomérica y dimerica usando HPLC en Australian Proteomic Analysis Facility (APAF). Las cadenas ligeras lambda asociadas con cadenas pesadas se representaron mediante gammaglobulinas humanas de tipo lambda policlonales intactas (IgGλ) Purificadas a partir del suero humano normal,

obtenido en Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, Tx, USA). Un antígeno de control irrelevante consistió en cadenas ligeras kappa libres humanas (κ LC) tanto en forma monomérica como dimérica.

Los pocillos de una placa ELISA se revistieron con cada antígeno en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 con un 0,02 % de azida sódica (PBS-az). Después de incubación a 37 °C durante 1 hora, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-az y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS-az durante una noche a 4 °C. Los mAb se incubaron con el antígeno a 37 °C durante 3 horas y a continuación los pocillos se lavaron tres veces con PBS-az. Se añadió un conjugado de cabra anti-ratón IgG-AP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Finalmente los pocillos se lavaron como se ha descrito anteriormente y se añadió el sustrato (pNpp; Sigma) a cada pocillo. El desarrollo de color fue proporcional a la cantidad de mAb unido al antígeno, y se midió como la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

Resonancia de plasmones de superficie (SPR)

La especificidad de los mAb L7 y mab1306 para las cadenas ligeras lambda libres humanas se confirmó usando SPR en un instrumento biosensor Biacore 2000. Los mAb L7 y mab1306 se inmovilizaron en un chip Biacore CM5 revestido con dextrano a través de acoplamiento de amina, y se inyectaron los mismos antígenos de Bence-Jones que se usaron en el ELISA sobre los mAb inmovilizados a 10 μ g/ml durante 12 minutos. Se midió la unión mAb-antígeno mediante SPR en Unidades de Resonancia, que fue proporcional al aumento de masa en la superficie del chip causada por la captura de mAb por el antígeno.

Citometría de flujo

Se evaluó la unión de los mAb L7, mab1306 y ME 154 a la superficie de células de mieloma LP-1 mediante citometría de flujo. Se recogieron células LP-1, se lavaron mediante centrifugación y se resuspendieron a una densidad de 1×10^6 células/ml en PBS-az con BSA al 1 %. Se peletizaron alícuotas de 5×10^5 y a continuación se incubaron con mAb (100 μ g/ml) durante 30 minutos en hielo. Las muestras de control consistieron en un mAb de control que coincidía con el isotipo (IgG2a) a la misma concentración, o PBS-az solo con BSA al 1 %. Después de la incubación con los anticuerpos, las células se lavaron dos veces en 750 μ l de PBS-az con BSA al 1 % y se incubaron en 50 μ l de una dilución 1:20 de F(ab')₂ de cabra anti-ratón conjugado con PE (Dako) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces antes del análisis en el canal FL-2 de un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

Inhibición de λ LC libre de la unión de L7 a células LP-1

Se preincubó L7 (100 μ g/ml) con diversas concentraciones de dímeros de cadena ligera lambda libre (Lam F y Lam H) o con κ LC (800 μ g/ml) durante 1 hora a 37 °C. Después de la preincubación se añadieron las mezclas de anticuerpos a 5×10^5 células y se determinó la unión mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Identificación de un antígeno de λ LC libre sobre la superficie de células LP-1 mediante microscopía de fluorescencia

Se investigó la localización de las cadenas pesada (γ) y ligera (λ) de las inmunoglobulinas mediante microscopía de fluorescencia de 2 colores. La cadena γ se detectó usando anticuerpos de cabra anti-humano específicos frente a γ y conjugados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y obtenidos en Open Biosystems (Huntsville, AL, USA). La cadena λ se detectó usando anticuerpos de cabra anti- λ humana, conjugados con Rojo Texas y se obtuvieron en EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA, USA). Los anticuerpos anti- λ se unen tanto a la cadena libre como a la cadena pesada asociada a la cadena ligera. La unión del anticuerpo a las células LP-1 se demostró por incubación de 10^6 células con 200 μ g/ml de anti- γ -FITC y anti- λ -Rojo Texas durante 30 minutos en hielo en PBS-az con BSA al 1 %. Las células se lavaron dos veces antes del análisis con un Microscopio de Fluorescencia BX51 (Olympus, Tokyo, Japón). La localización de la inmunoglobulina de superficie se detectó bajo luz UV usando un filtro de excitación de paso de banda de 470-490 nm para mostrar la tinción de FITC (verde). La localización de la cadena ligera λ de superficie se detectó bajo luz UV usando un filtro de excitación de paso de banda de 520-550 nm para mostrar la tinción de Rojo Texas (rojo). A continuación se superpusieron las imágenes de FITC y Rojo Texas para producir una imagen en dos colores. Cuando se localizaron conjuntamente FITC y Rojo Texas, los colores rojo y verde se combinaron para producir color amarillo. De este modo, es posible determinar si se producen cadenas ligeras λ en regiones distintas de las también ocupadas por la cadena γ .

Identificación de un antígeno de λ LC libre en la fracción de membrana celular de células LP-1 mediante transferencia de Western

La presencia de un antígeno λ LC libre en la fracción de membrana celular de células LP-1 se demostró mediante transferencia de Western. Las células LP-1 ($4,5 \times 10^7$) se lavaron dos veces mediante centrifugación con PBS y a continuación se resuspendieron a una concentración de 10^7 células/ml en Tris 40 mM a pH 7,2 e inhibidores de proteasa completa (Roche). Las células se agitaron vorticialmente durante 30 segundos, se sonicaron durante 15 min y a continuación se agitaron vorticialmente de nuevo durante 30 segundos. Después de incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos las células se agitaron vorticialmente y a continuación se centrifugaron a 4000g durante 10 minutos. La fracción citoplasmática se obtuvo partir del sobrenadante y la fracción de membrana celular consistió en el sedimento. El sedimento se lavó dos veces mediante centrifugación con PBS y a continuación se resuspendieron en solución tamponada Tris (TBS) que contenía un 1 % de NP 40. La membrana celular solubilizada se incubó durante 30 minutos en hielo y a continuación se centrifugó a 4000g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante como la fracción de membrana celular solubilizada. Las alícuotas de las fracciones

citoplasmática y de membrana celular se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida usando condiciones no desnaturalizantes y a continuación se realizó la transferencia sobre membranas de nitrocelulosa. La detección de antígeno λ LC libre se detectó mediante la incubación con los mAb L7, mab1306 y ME 154 durante 90 minutos a temperatura ambiente seguida de 3 lavados en TBS que contenía un 0,05 % de Tween y un 0,3 % de BSA. Las membranas se incubaron a continuación con anti-GAM de ratón-conjugado con AP (Sigma) durante 90 minutos y a continuación se lavaron 3 veces como anteriormente. El desarrollo del color de las bandas de proteína se llevó a cabo por incubación de las membranas con BCIP y NBT (Sigma FAST™).

Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC)

Se evaluó *in vitro* la capacidad de los mAb mab1306 y ME 154 para inducir ADCC usando el método de citometría de flujo de Wilkinson *et al.* (Journal of Immunological Methods 2001 258: pp 183-91). Se usaron células destructoras naturales (NK) como células efectoras y se usaron células de mieloma LP-1 como las dianas.

Se aislaron células NK de ratón de una suspensión de linfocitos esplénicos recogidos de ratones Balb/c sanos usando Clasificación Celular Magnética MACS (Miltenyi Biotech, Alemania). Usando el Kit de Aislamiento de Células NK de Miltenyi Biotech, se retiraron todos los linfocitos distintos de las células NK, dejando células NK purificadas sin marcar. Las células NK se cultivaron durante 6 días en RPMI en FCS al 10 % complementado con 125 ng/ml de IL-2 recombinante murina (Sigma-Aldrich, USA).

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (Nunc, Dinamarca). Inmediatamente antes del ensayo, se marcaron las células diana (células de mieloma LP-1) con el colorante de membrana fluorescente PKH-26 (Sigma-Aldrich, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células LP-1 (3×10^4 células/ml) se preincubaron con ME 154 o mab1306 en PBS estéril (7 nM y 0,7nM de concentración final) durante 15 minutos a 37 °C y un 5 % de CO₂. Las células efectoras, las células NK murinas se lavaron y se resuspendieron en RPMI, y a continuación se añadieron para proporcionar relaciones de NK con respecto a LP-1 de 25:1, 12.5:1 y 6.25:1. Las células se mezclaron y a continuación se centrifugaron las placas durante 10 minutos a 400g para asegurar un contacto estrecho célula-célula. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Después de 16 horas, se añadieron a cara muestra de ensayo 50 μ l del colorante de unión a ADN TO-PRO-Yoduro 3 (1 μ M en PBS; Molecular Probes Inc., USA). El TO-PRO-Yoduro 3 solo puede entrar en las células con membranas comprometidas, en las que se une al ADN de doble cadena. Solo después de tal unión al ADN el TO-PRO-Yoduro 3 produce fluorescencia. Después de 2-5 minutos las células se procesaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Inc., USA). Las células muertas se identificaron por su fluorescencia positiva en el canal FL4 causada mediante los complejos TO-PRO-Yoduro 3/ADN. Las células diana (LP-1) se identificaron por fluorescencia positiva en el canal FL2 causada por el marcaje con PKH-26. Las células diana muertas se identificaron por lo tanto como las que tenían fluorescencia positiva en ambos canales FL2 y FL4. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como:

(número de células positivas para FL4-FL2 doble)/(número de células positivas para FL2)* 100.

Ejemplo 1: especificidad de los anticuerpos L7, mab 1306 y ME 154 para la cadena ligera λ

La especificidad de la unión de L7 a las cadenas ligeras lambda libres humanas se muestra en las Figuras 1A y 2A. Estos resultados indican que L7 se une tanto a la forma monomérica como a la forma dimérica de tres cadenas ligeras lambda diferentes (Lam F, Lam H y Lam K), y a la forma monomérica de una cuarta cadena ligera lambda (Lam Q). El anticuerpo no se une a cadenas ligeras lambda asociadas a cadena pasada en inmunoglobulina humana normal, ni se une a cadenas ligeras kappa libres.

Las propiedades de unión a antígeno de mab 1306 para una diversidad de cadenas ligeras lambda humanas se muestran en las Figuras 1B y 2B. Estos resultados demuestran que mab1306 se une a una diversidad de λ LC asociadas con inmunoglobulina y libres, pero no se une a κ LC libres. De forma similar, el mAb ME 154 se une a λ LC asociadas tanto a cadena pesada como ligera (Figura 1C). Los tres mAb muestran unión a la forma monomérica de Lam Q pero no a la forma dimérica de este antígeno.

Ejemplo 2: identificación de cadenas ligeras λ en células de mieloma LP-1

Los resultados de citometría de flujo indican que L7, mab1306 y ME 154 se unen todos específicamente a un antígeno de superficie celular en células de mieloma LP-1 (Figura 3). Para el mAb L7, la unión del anticuerpo a las células LP-1 se inhibe mediante preincubación con dos cadenas ligeras lambda libres monoméricas diferentes, Lam F y Lam H (Figura 4). Esta inhibición se produce de forma dependiente de la concentración (Figure 4B) aunque, sin embargo, la unión de L7 no se inhibe por una concentración equivalente de cadenas ligeras kappa libres.

La presencia de un antígeno de cadena ligera λ libre que no está asociado con cadena pesada de Ig se demostró en la superficie de células LP-1 usando un microscopio de fluorescencia (no se muestran los datos). La incubación de las células con anticuerpo policlonal marcado con fluorescencia específico para la cadena gamma de IgG (anti- γ -FITC) mostraron una intensidad no uniforme de tinción de color verde de las células LP-1, mientras que el anticuerpo policlonal frente a cadenas ligeras λ , anti- λ -Rojo Texas, mostró varios parches de color rojo intenso sobre

la superficie de las células (no se muestran los datos). Los parches más intensos de color rojo (cadenas ligeras λ) parecían estar en localizaciones diferentes al color verde (cadenas γ asociadas a Ig). Esta observación se confirmó mediante la superposición de las imágenes de dos colores de la misma célula (no se muestran los datos). Una combinación del color rojo y verde produjo color amarillo, mientras que un área que estaba teñida solo con uno de los anticuerpos retuvo el color original. El color amarillo sobre la superficie celular representó cadena ligera λ que estaba asociada con inmunoglobulina. Sin embargo, hubo distintos parches de color rojo que indicaron parches de cadena ligera λ que no estaba asociada con Ig y son por lo tanto áreas de cadena ligera λ libre sobre la superficie celular.

La detección de cadena λ libre asociada a membrana a partir de células de mieloma LP-1 se llevó a cabo mediante transferencia de western de SDS-PAGE no reductor usando los mAb L7, mab1306 y ME 154 (Figura 5). Un control positivo consistió en cadena ligera λ libre humana purificada que se detectó mediante los tres anticuerpos. Tanto mab 1306 (Figura 5B) como ME 154 (Figura 5C) detectaron las formas monomérica (25 kD) y dimérica (50 kD) de la cadena ligera λ libre en las fracciones de membrana y citoplasmática de las células. MAb L7 mostró unión a las formas monomérica y dimérica asociadas a la membrana de la cadena ligera λ libre pero pareció no detectar solo la forma monomérica del antígeno en el citoplasma.

Discusión

El anticuerpo monoclonal murino, L7, se une específicamente a cuatro cadenas ligeras lambda libres humanas diferentes y no se une a las cadenas ligeras lambda asociadas con cadena pesada. El análisis de la unión del anticuerpo a la línea celular de mieloma de tipo lambda, LP-1, indica que el anticuerpo se une a un antígeno de la superficie celular. La unión al antígeno de la superficie celular se puede bloquear mediante preincubación del anticuerpo con dos cadenas ligeras lambda diferentes. Además, la forma soluble de la cadena ligera lambda libre puede revocar completamente la unión de L7 al antígeno de la superficie celular en las células LP-1. Estos datos sugieren que el anticuerpo reconoce un antígeno de la superficie celular que contiene epítomos similares encontrados en las cadenas ligeras lambda libres.

La microscopía de fluorescencia indicó que la cadena ligera λ libre de la superficie celular se puede distinguir de la cadena ligera λ asociada a Ig en la superficie de las células de mieloma de tipo lambda. Además, se podría demostrar la detección de la cadena ligera λ libre de membrana celular en la forma de un monómero de 25 kD y un dímero de 50 kD en la fracción de membrana celular de células de mieloma en lambda para los tres mAb.

Se podría demostrar la citotoxicidad celular dependiente de antígeno específico de células de mieloma en lambda usando los anticuerpos mab 1306 y ME 154. Estos resultados sugieren que los anticuerpos que se unen a la cadena ligera λ libre en la forma de monómero y dímero en la superficie de la célula pueden inducir la muerte celular en presencia de células efectoras.

Los experimentos que se detallan en el presente documento demuestran que varios anticuerpos monoclonales murinos frente a cadenas ligeras lambda libres pueden detectar tanto la forma monomérica (25 kD) como la forma dimérica (50 kD) del antígeno lambda en la membrana celular. Los presentes inventores proponen que este LMA consiste en cadenas ligeras lambda libres asociadas a la membrana celular y se puede usar como diana específica de células de mieloma de pacientes con mieloma múltiple de tipo lambda usando anticuerpos monoclonales.

Además se prevé que el LMA está presente en linfocitos B de diversos trastornos de linfocitos B. Ejemplos de tales células son DOHH-2 (linfoma de linfocitos B humano), WSU-NHL (linfoma de linfocitos B humano), DB (linfoma de linfocitos B humano), KARPAS-1106P (linfoma de linfocitos B humano), WSU-DLCL2 (linfoma de linfocitos B humano), SU-DHL-5 (linfoma de linfocitos B humano), MHH-PREB-1 (linfoma de linfocitos B humano) GRANTA-519 (linfoma de linfocitos B humano) y MC-116 (linfoma de linfocitos B humano).

Dado que el LMA es único en la membrana celular de los linfocitos B malignos se propone que cualquier mAb que sea capaz de unirse selectivamente a estos antígenos será útil en el tratamiento de enfermedades tales como mieloma múltiple. Como efecto secundario, cualquier mAb del isotipo apropiado que sea capaz de unirse al LMA será capaz de inducir la muerte celular mediante el uso de células efectoras del huésped para provocar ADCC. Este efecto secundario ayudará a la reducción de linfocitos B en pacientes con trastornos de linfocitos B.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y del sistema de la intervención descritos serán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas preferentes, se deberían tender que la invención según se reivindica no debería quedar indebidamente limitada a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que entren dentro del alcance de la invención las diversas modificaciones de los modos para llevar a cabo la invención descritos que son evidentes para los expertos en la biología molecular o los campos relacionados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda que se une específicamente a antígeno de mieloma lambda en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno linfoproliferativo de linfocitos B en un sujeto, en el que el trastorno de linfocitos B es mieloma múltiple, y en el que el antígeno de mieloma lambda es una cadena ligera lambda no asociada con una inmunoglobulina intacta y se expresa en la superficie de las células de mieloma.
- 10 2. Un uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda está conjugado a un resto citotóxico o modificador biológico.
- 15 3. Un uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el sujeto se ha tratado para reducir el nivel de cadenas ligeras lambda libres presentes en el fluido del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda.
- 20 4. Un anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda que se une específicamente a antígeno de mieloma lambda para su uso en el tratamiento de un trastorno linfoproliferativo de linfocitos B en el que el trastorno de linfocitos B es mieloma múltiple, y en el que el antígeno de mieloma lambda es una cadena ligera lambda no asociada con una inmunoglobulina intacta y se expresa en la superficie de las células de mieloma.
- 25 5. El anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda como se reivindica en la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda está conjugado a un resto citotóxico o modificador biológico.
6. El anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que el sujeto se ha tratado para reducir el nivel de cadenas ligeras lambda libres presentes en el fluido del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-antígeno de mieloma lambda.

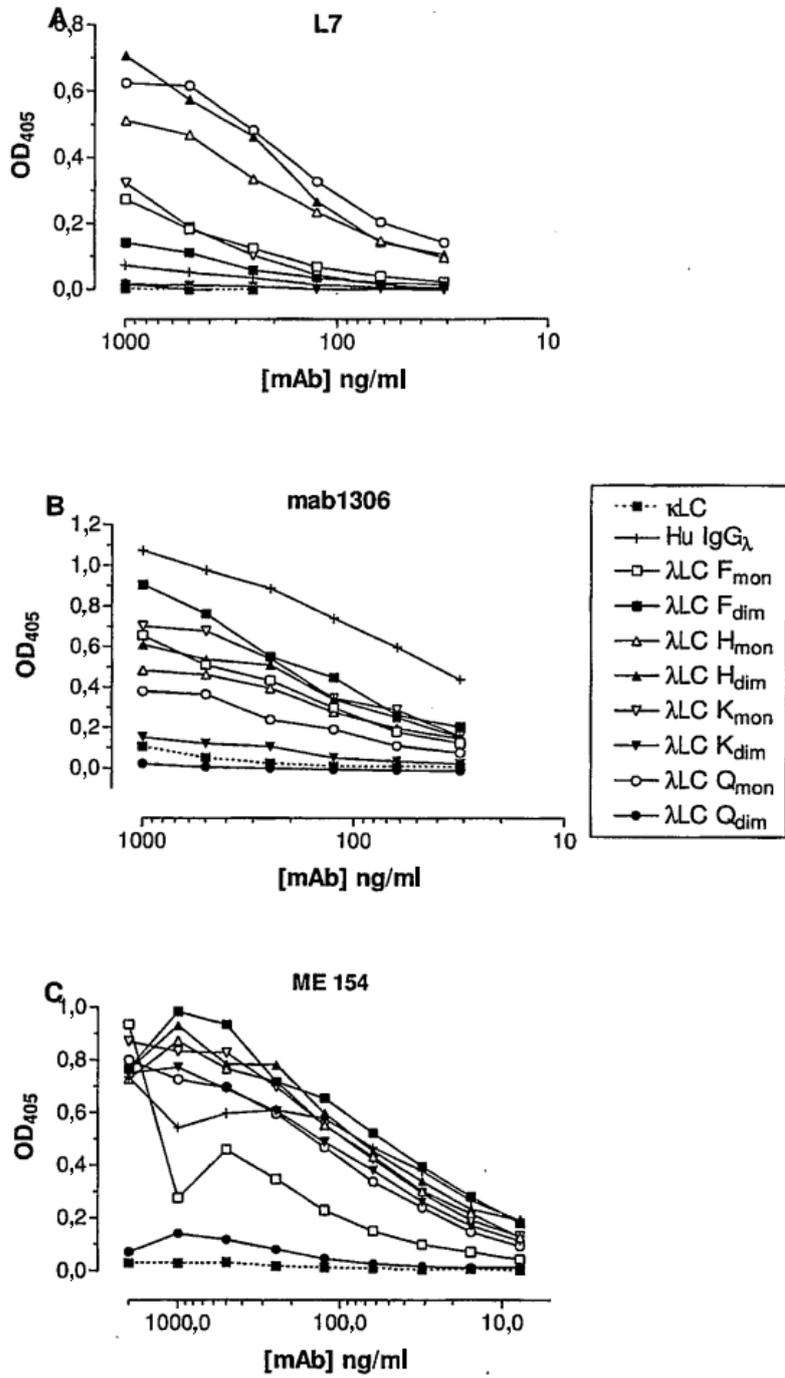


Figura 1

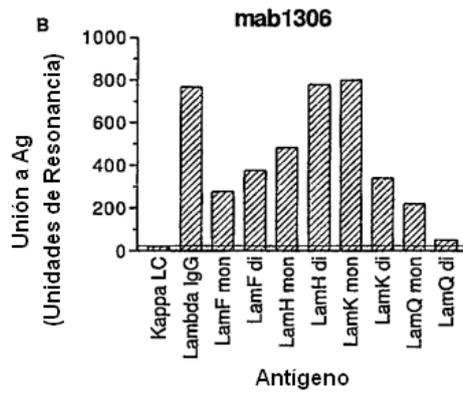
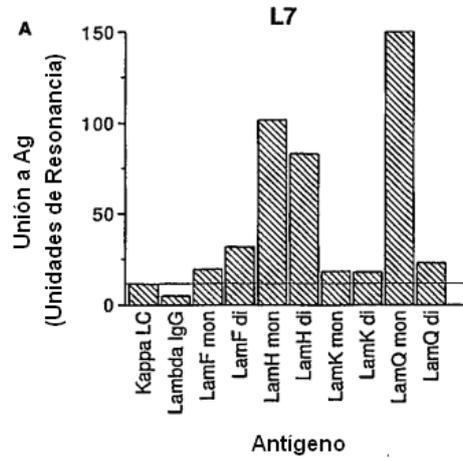


Figura 2

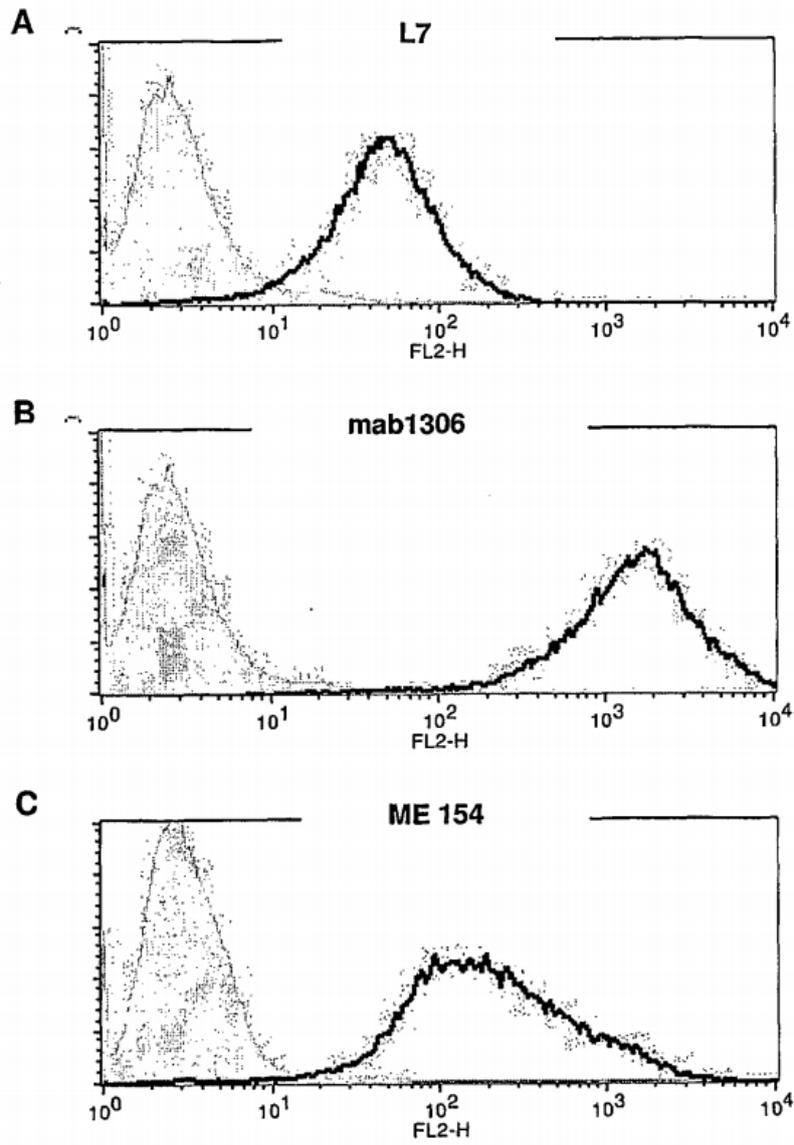


Figura 3

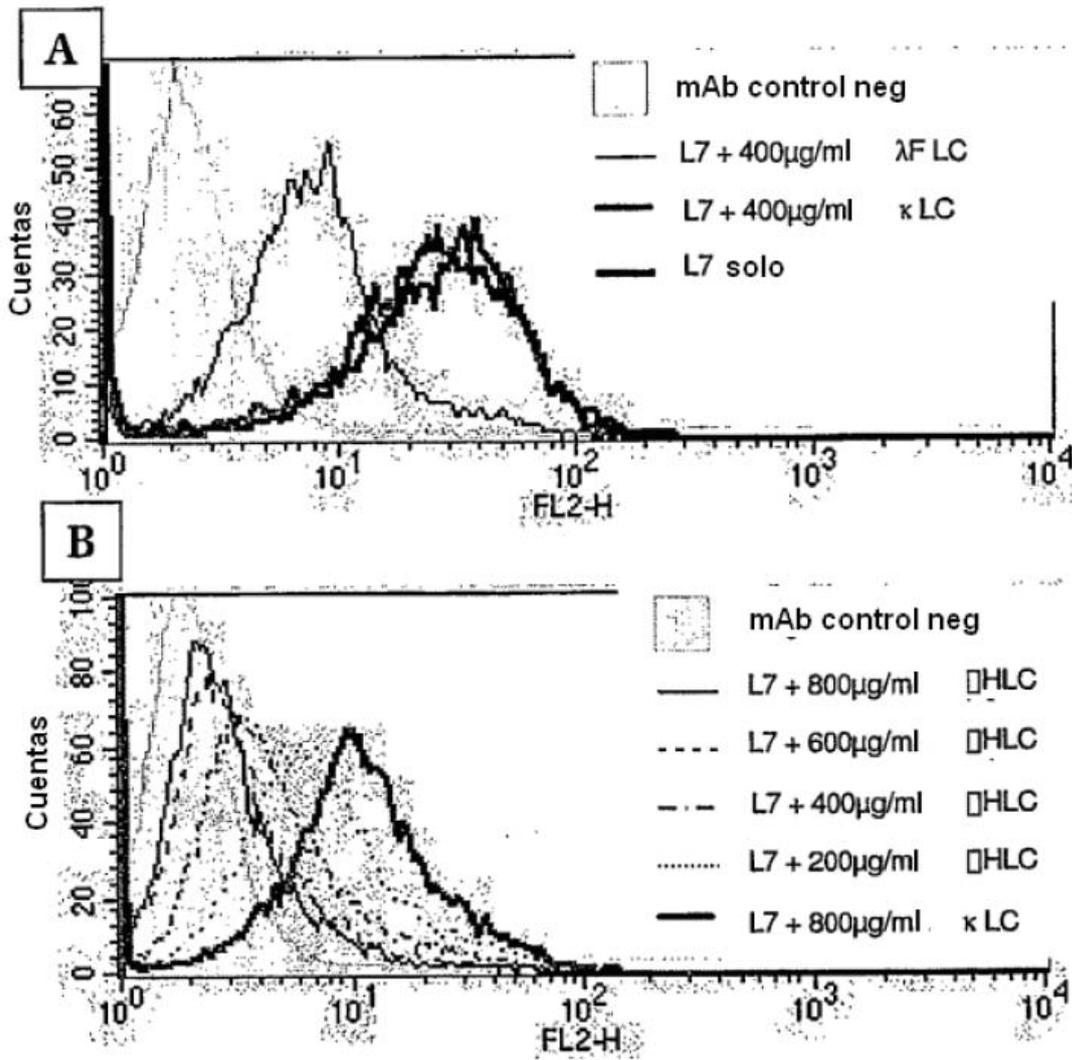


Figura 4

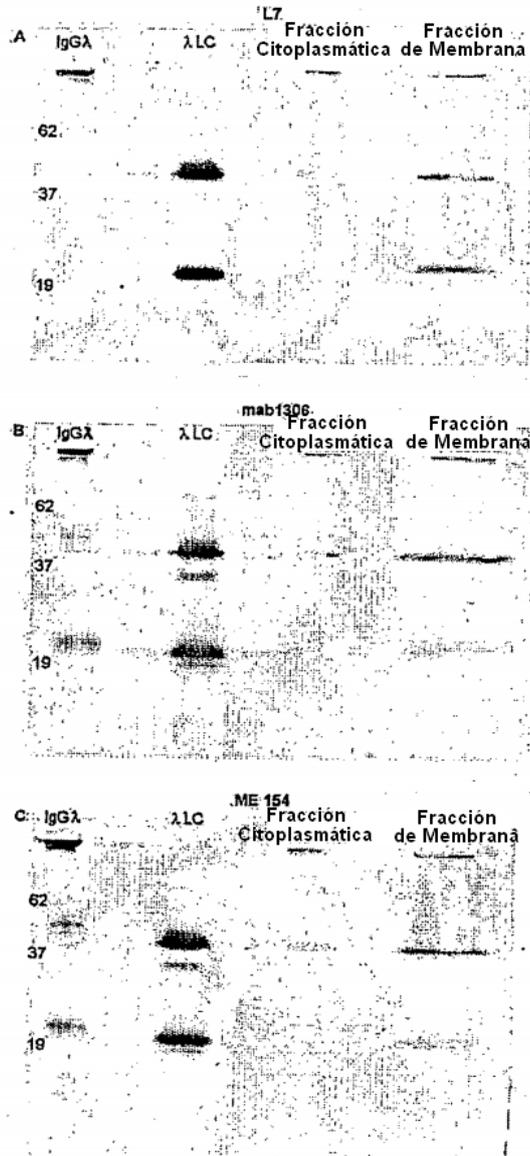


Figura 5

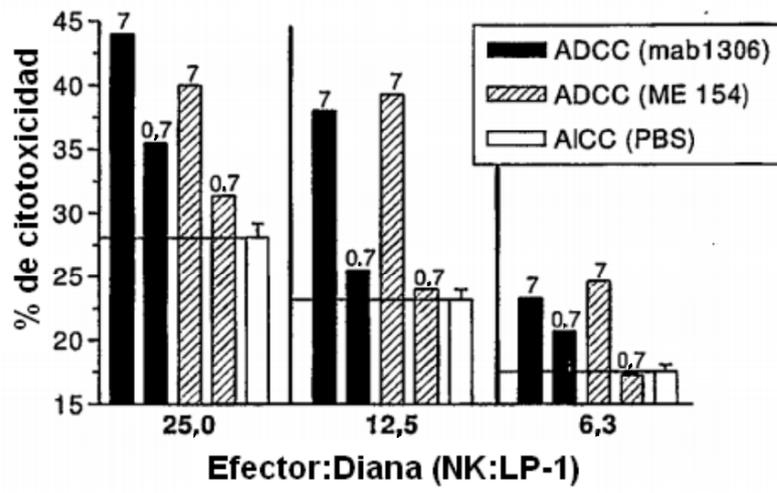


Figura 6