

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 201**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08865592 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2240516**

54 Título: **Métodos y agentes que mejoran la dirección a las células tumorales que expresan CD138**

30 Prioridad:

26.12.2007 US 16614 P

08.08.2008 US 87590 P

08.08.2008 US 87466 P

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

17.08.2015

73 Titular/es:

BIOTEST AG (33.3%)

Landsteinerstr. 5

63303 Dreieich, DE;

IMMUNOGEN, INC. (33.3%) y

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

(33.3%)

72 Inventor/es:

DAELKEN, BENJAMIN;

UHEREK, CHRISTOPH;

ANDERSON, KENNETH;

HIDESHIMA, TERU;

BRUECHER, CHRISTOPH;

OSTERROTH, FRANK;

AIGNER, SILKE y

GERMER, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 543 201 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

Métodos y agentes que mejoran la dirección a las células tumorales que expresan CD138

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. 61/016.614, presentada el 26 de diciembre de 2007, de la solicitud provisional 61/087.466, presentada el 8 de agosto de 2008 y de la solicitud provisional 61/087.590, también presentada el 8 de agosto de 2008.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de inmunocombinados contra el antígeno CD138 y a composiciones que comprenden los inmunocombinados para disminuir la adhesión de células de estroma a las células diana que expresan CD138 y por lo tanto para tratar más eficazmente estados de enfermedad que implican las células que expresan CD138.

15 **Antecedentes**

20 El CD138, que actúa como un receptor para la matriz extracelular se sobre-expresa en células de mieloma múltiple (MM) y se ha demostrado que influye en el desarrollo y/o en la proliferación de las células de MM. El CD138 también se expresa en células de carcinoma ovárico, carcinoma de riñón, carcinoma de vesícula, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, células de carcinoma de colon y en células de linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL) por nombrar unas pocas.

25 Por conveniencia, en el siguiente texto las publicaciones se mencionan por autor y fecha y/o se enumeran alfabéticamente por autor en la bibliografía adjunta.

30 Tassone et al. (2004) han comunicado una unión excelente del anticuerpo IgG1 murino B-B4 con el antígeno CD138 que se expresa en la superficie de las células de MM. Tassone también comunicó una alta actividad citotóxica del inmunocombinado B-B4-DM1, que comprende el maitansinoide DM1 como molécula efectora, contra células de mieloma múltiple (véase también la Publ. de Patente de EE. UU. 20070183971).

35 Tassone también demostró que este combinado B-B4 era eficaz incluso en el microambiente de la médula ósea que induce resistencia en las células de mieloma múltiple (MM) a muchos fármacos que se administran comúnmente a los pacientes de MM, que incluyen, por ejemplo, dexametasona. Los inmunocombinados de Tassone eran capaces de destruir eficazmente las células tumorales de MM en el ambiente del estroma de la médula ósea.

Aunque Tassone et al. han contribuido a proporcionar un tratamiento eficaz de MM y una composición que se puede emplear en tal tratamiento, siguen existiendo varias necesidades en la técnica.

40 Existe una necesidad de tratamientos mejorados que utilizan inmunocombinados basados en B-B4. También existe la necesidad de tratamientos eficaces que empleen inmunocombinados basados en B-B4 que muestren una o más propiedades ventajosas. Las propiedades del inmunocombinado incluyen, preferentemente, unión mejorada al antígeno, destrucción mejorada de las células tumorales que comprenden, en particular, células tumorales que expresan CD138, y células accesorias de las mismas o la unión más homogénea de la diana, pero en particular la capacidad de combatir más eficazmente estados de enfermedad asociados con las células que expresan CD138.

45 **Sumario de la invención**

50 La invención se refiere a un inmunocombinado que se dirige a células tumorales que expresan CD138 para su uso en el tratamiento de células tumorales que expresan CD138 disminuyendo la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138, en el que el inmunocombinado comprende una molécula efectora y un anticuerpo de dirección modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo de dirección modificado están unidos entre sí mediante un enlace escindible,

55 en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de tubulina, en el que el anticuerpo de dirección modificado comprende una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2, y en el que el inmunocombinado es para su uso con un agente citotóxico adicional, en el que el inmunocombinado y el otro agente citotóxico se van a administrar consecutivamente y en el que la administración del otro agente citotóxico es después de la administración del inmunocombinado.

60 Además, la presente invención proporciona el uso de un inmunocombinado que se dirige a las células tumorales que expresan CD138 para la fabricación de un medicamento para tratar las células tumorales de un sujeto que expresan CD138, disminuyendo la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138, en el que el inmunocombinado comprende una molécula efectora y un anticuerpo de dirección modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo dirigido modificado están unidos entre sí mediante un enlace escindible,

en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de la tubulina,
 en el que el anticuerpo dirigido modificado comprende una región variable de cadena pesada que comprende los
 restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable
 de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de
 la SEC ID N° 2,

y en el que el inmunoconjugado es para su uso con un agente citotóxico más, en el que el inmunoconjugado y el otro
 agente citotóxico se van a administrar consecutivamente y en el que la administración del otro agente citotóxico es
 después de la administración del inmunoconjugado.

Además, la presente invención proporciona el uso de un inmunoconjugado que se dirige a las células tumorales que
 expresan CD138 y un agente citotóxico adicional para la fabricación de una preparación combinada para su uso
 secuencial en el tratamiento de células tumorales que expresan CD138 de un sujeto, en el que el inmunoconjugado
 comprende una molécula efectora y un anticuerpo dirigido modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo
 dirigido modificado se unen entre sí mediante un enlace escindible,

en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de la tubulina,
 en el que el anticuerpo dirigido modificado comprende una región variable de cadena pesada que comprende los
 restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable
 de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de
 la SEC ID N° 2, en el que el inmunoconjugado se va a administrar para disminuir la adhesión de las células del
 estroma a las células tumorales que expresan CD138, y en el que el agente citotóxico adicional se va a administrar a
 continuación de la administración del inmunoconjugado.

La adhesión se puede disminuir al menos aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente
 un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un
 70%, aproximadamente un 80% o más y/o puede dar como resultado en el alivio de la resistencia a los fármacos
 mediada por la adhesión, que incluyen la resistencia a los fármacos mediada por la adhesión contra un agente
 citotóxico adicional (que no es uno de los inmunoconjugados anteriores) y en el que dicho agente citotóxico adicional
 se administra en las células de un tumor en crecimiento inhibiendo, retrasando y/o previniendo la cantidad. El
 inmunoconjugado y este agente citotóxico(s) se van a administrar consecutivamente, en el que la administración del
 agente citotóxico es después de la administración del inmunoconjugado.

El inmunoconjugado de la presente descripción particular comprende

- (a) un anticuerpo dirigido modificado, y
- (b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunoconjugado se dirige homogéneamente a células diana que expresan CD138.

El anticuerpo dirigido modificado de la presente descripción puede

- (i) consistir esencialmente en la región de unión al antígeno (ABR) contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
- (ii) comprender una región de unión al antígeno (ABR) contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno
 es de un anticuerpo no humano, y

Una región de anticuerpo adicional, en el que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un
 anticuerpo humano.

La ABR puede comprender:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 99 a 111 de la SEC
 ID N° 1, y
- (b) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de la SEC ID
 N° 2, respectivamente.

La ABR puede comprender además:

- (a) regiones variables de cadena pesada CDR1 y CDR2 que comprenden los restos de aminoácidos 31 a 35 y 51
 a 68 de la SEC ID N° 1, y/o
- (b) regiones variables de cadena ligera CDR1 y CDR2 que comprenden los restos de aminoácidos 24 a 34 y 50 a
 56 de la SEC ID N° 2, respectivamente.

La región de anticuerpo adicional puede comprender:

- (a) los restos de aminoácidos 123 a 448 de la SEC ID N° 1, y/o
- (b) los restos de aminoácidos 108 a 214 de la SEC ID N° 2, respectivamente y mutaciones de los mismos que

- (i) mantienen o disminuyen la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad dependiente del complemento y/o
- (ii) estabiliza el anticuerpo dirigido modificado.

5 La molécula efectora puede unirse a dicho anticuerpo dirigido modificado por medio de un enlazador. El enlazador puede comprender un enlace disulfuro. La molécula efectora (por ejemplo, DM4) puede proporcionar un impedimento estérico entre el anticuerpo dirigido y la molécula efectora. La molécula efectora puede ser al menos un maitansinoide (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4) taxano o un CC1065, o un análogo de los mismos.

10 El inmunoconjugado puede unirse a CD138 con una variación de dirección de menos del 150%, 140%, 130%, 120%, 110%, 100%, 90%, 80%, 70%, 60% o 50%.

La presente descripción también se refiere a un inmunoconjugado que comprende:

- 15 (a) un agente de dirección que se dirige a CD138 que comprende
(b) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en la que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N° 1. Una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o dicha parte de la misma puede ser una región constante del isotipo IgG4.

20 La presente descripción también se refiere a un método de tratamiento de MM en un sujeto, que comprende:

proporcionar uno o más de los inmunoconjugados especificados en el presente documento, y administrar a dicho sujeto dicho inmunoconjugado en una cantidad eficaz para tratar el mieloma múltiple.

25 El agente dirigido del inmunoconjugado puede comprender una secuencia de cadena ligera que tiene al menos una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con la SEC ID N° 2. El agente dirigido del inmunoconjugado también puede comprender una secuencia de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70% con la SEC ID N° 1.

30 La presente descripción también se refiere a un método para el suministro de fármacos mediado por inmunoconjugado que comprende:

35 proporcionar uno o más de los inmunoconjugados especificados en el presente documento, y administrar dicho inmunoconjugado en una cantidad terapéuticamente eficaz, en el que dicho isotipo IgG4 alivia la ADCC, la citotoxicidad dependiente de complemento y/o la dirección mediada por FC de FcR hepático.

La presente descripción se refiere también a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de células tumorales en un cultivo celular que comprende:

40 administrar a dicho cultivo celular una cantidad eficaz de uno o más inmunoconjugados especificados en el presente documento para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de las células tumorales. La cantidad eficaz puede inducir muerte celular o detención del ciclo celular continuo en las células tumorales que expresan CD138 y, opcionalmente, en células auxiliares que no expresan CD138, en particular células del estroma tumoral. Las células en dicho cultivo celular se pueden obtener de un paciente de cáncer y, tras la administración de dicha cantidad eficaz de dicho inmunoconjugado, las células de dicho cultivo celular se pueden reimplantar en dicho paciente de cáncer.

La presente descripción también se refiere a un método de inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la diseminación de las células tumorales de tal tumor en un paciente que necesita del mismo, que comprende la administración a dicho paciente de al menos uno o más de los inmunoconjugados especificados anteriormente en una cantidad que inhibe o reduce el crecimiento de dicho tumor y/o la diseminación de dichas células tumorales,

50 En el que dicho inmunoconjugado inhibe, retarda o previene el crecimiento del tumor y/o la diseminación de dichas células tumorales.

55 La molécula efectora de dicho inmunoconjugado(s) puede ser una toxina, enzima citotóxica, fármaco citotóxico de bajo peso molecular, un agente formador de poros, un modificador de la respuesta biológica, una enzima activadora de pro-fármaco, un anticuerpo, citocina o un radionúclido.

60 Los inmunoconjugados de la presente invención se pueden administrar en una dosis única de 5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m², opcionalmente a intervalos de una hora, diarios o semanales o combinaciones de los mismos.

65 Los regímenes de dosis múltiples que incluyen regímenes de horas, diarios y semanales son parte de la presente invención e incluyen en particular la administración a intervalos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 semanas.

La presente descripción también se refiere a un método de inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor y/o diseminación de las células tumorales malignas en un paciente que necesita el mismo, que comprende

- 5 (a) administrar a dicho paciente uno o más agentes citotóxicos y/o radiación en una cantidad eficaz para reducir la carga tumoral; y
(b) administrar a dicho paciente al menos uno de los inmunoconjugados especificados en el presente documento en una cantidad que inhibe, retrasa o previene el crecimiento tumoral y/o la diseminación de las células tumorales,

10 en el que dicho inmunoconjugado inhibe, retrasa o previene el crecimiento y/o diseminación de células tumorales que comprenden células que expresan CD138.

15 El agente citotóxico de cualquiera de las realizaciones de la presente invención puede ser, en particular, melfalán, vincristina, doxorubicina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, talidomida, prednisona, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina, o combinaciones de los mismos o pueden estar basados en anticuerpos.

20 La presente descripción también se refiere a un método para tratar un sujeto que tiene una afección que se beneficiaría de la supresión de la supervivencia de células de mieloma, comprendiendo el método:

- 20 (a) proporcionar al menos una de cualquiera de los inmunoconjugados especificados en el presente documento,
y
(b) administrar el inmunoconjugado a un su jeto para disminuir selectivamente la supervivencia o crecimiento de
25 dichas células de mieloma de dicho sujeto.

La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados especificados en el presente documento para la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de tumores y/o la diseminación de las células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 La composición farmacéutica puede incluir agentes citotóxicos como se especifican en el presente documento.

35 La presente descripción también se refiere a un kit que comprende, en envases distintos, composiciones farmacéuticas para su uso en combinación, para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de tumores y/o la diseminación de las células tumorales, en el que un envase comprende una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior, y en el que, un envase distinto comprende una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente, preferentemente un agente citotóxico, para la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de tumores y/o la diseminación de células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 La presente descripción también se refiere a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la diseminación de las células tumorales de tal tumor en un sujeto que necesita el mismo, que comprende

- 45 (a) proporcionar un inmunoconjugado que comprende; un anticuerpo dirigido modificado contra CD138 unido a una molécula efectora por medio de un enlazador escindible, en el que dicha molécula efectora está impedida estéricamente, y
(b) administrar a dicho sujeto el inmunoconjugado de (a) en una cantidad que inhibe, retrasa y/o previene el crecimiento de dicho tumor y/o la diseminación de dichas células tumorales, en el que dicho inmunoconjugado de
50 (a) proporciona la inhibición de la actividad de crecimiento de un tumor que excede la de su equivalente sin impedimentos en aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40% o más.

55 La actividad de inhibición del crecimiento de un tumor de un equivalente sin impedimentos estéricos que comprende un enlazador no escindible, excede la inhibición del crecimiento de su equivalente sin impedimentos que comprende un enlazador escindible, tal como al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, hasta aproximadamente un 15%.

60 Dicho anticuerpo dirigido modificado contra CD138 puede consistir esencialmente en la región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano o puede comprender una región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano y una región de anticuerpo adicional, en el que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano.

65 Dicho enlazador escindible puede comprender un enlace disulfuro. La molécula efectora puede ser DM4. El inmunoconjugado puede ser parte de una composición farmacéutica y se puede administrar al sujeto en al menos una dosis en una cantidad de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m².

La presente descripción proporciona un inmunocombinado para su uso como un medicamento en el que el inmunocombinado comprende:

5 (a) un anticuerpo dirigido modificado

(i) que consiste esencialmente en la región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o

(ii) que comprenden una región de unión al antígeno contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano,

10 una región de anticuerpo adicional, en la que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano, y

(b) una molécula efectora,

15 en el que dicho inmunocombinado se une homogéneamente a CD138.

La presente descripción proporciona un inmunocombinado adicional para su uso como un medicamento que comprende:

20 un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N° 1.

25 En particular, en un aspecto de la descripción, el inmunocombinado del párrafo anterior es para el uso en el tratamiento del mieloma múltiple. En particular, el inmunocombinado se puede utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del mieloma múltiple.

30 La presente descripción proporciona además un inmunocombinado para su uso en el suministro de fármacos mediado por inmunocombinados a un paciente, en particular para el alivio de la ADCC, citotoxicidad dependiente de complemento y/o dirección mediada por Fc o FcR hepático, en el que el inmunocombinado comprende un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N° 1, y en el que una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma es una región constante de isotipo IgG4.

35 La presente descripción también proporciona células tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente en el que las células tumorales se han tratado en un cultivo celular con un inmunocombinado que comprende:

40 (a) un anticuerpo dirigido modificado

(i) que consiste esencialmente de la región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o

45 (ii) que comprende una región de unión al antígeno contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano,

una región de anticuerpo adicional, en el que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano, y

50 (b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunocombinado se une homogéneamente a CD138.

55 La presente descripción también proporciona células tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente en el que las células tumorales se han tratado en un cultivo celular con un inmunocombinado que comprende:

60 un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N° 1.

65 La presente descripción proporciona un inmunocombinado para su uso en la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la diseminación de las células tumorales de tal tumor en un paciente, en el que el inmunocombinado comprende:

(a) un anticuerpo dirigido modificado

(i) que consiste esencialmente en una región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o

(ii) que comprende una región de unión al antígeno contra CD138, en la que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, una región de anticuerpo adicional, en la que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de anticuerpo humano, y

(b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

De manera alternativa, la presente descripción proporciona un inmunoconjugado para su uso en la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la diseminación de las células tumorales de tal tumor en un paciente, en el que el inmunoconjugado comprende:

un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos un 70% con la SEC ID N° 1.

Aún más, la presente descripción proporciona un medicamento que comprende un inmunoconjugado y uno o más fármacos para el cáncer como una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de las células de tumores que comprenden células que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende:

(a) un anticuerpo dirigido modificado

(i) que consiste esencialmente en una región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o

(ii) que comprende una región de unión al antígeno contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, una región de anticuerpo adicional, en el que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de anticuerpo humano, y

(b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

De manera alternativa, la presente descripción proporciona un medicamento que comprende un inmunoconjugado y uno o más fármacos para el cáncer como una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de las células de tumores que comprenden células tumorales que comprenden CD138, en el que el inmunoconjugado comprende:

un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la SEC ID N° 1 y en el que el uno o más fármacos para el cáncer son capaces de reducir la carga tumoral.

En un aspecto más del uso de los dos párrafos anteriores, la preparación combinada se administra a un paciente que se ha tratado con radiación.

En un aspecto alternativo la descripción presente proporciona el uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar células tumorales en un paciente que comprende células que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende:

(a) un anticuerpo dirigido modificado

(i) que consiste esencialmente en una región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o

(ii) que comprende una región de unión al antígeno contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, y

(b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138,
y en el que el medicamento se administra a un paciente tratado con radiación para reducir la carga tumoral.

5 Aún más, la presente descripción proporciona el uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar las células tumorales de un paciente que comprende células que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende:

10 un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% de la SEC ID N° 1,
y en el que el medicamento se va a administrar a un paciente tratado con radiación para reducir la carga tumoral.

15 En los párrafos anteriores, el medicamento es capaz de inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor y/o la diseminación de las células tumorales malignas en un paciente.

Además la presente descripción proporciona un inmunoconjugado para la supresión de la supervivencia de las células de mieloma en un individuo, en el que el inmunoconjugado comprende:

20 (a) un anticuerpo dirigido modificado
(i) que consiste esencialmente en una región de unión al antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
25 (ii) que comprende una región de unión al antígeno contra CD138, en el que dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano,
una región de anticuerpo adicional, en el que al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de anticuerpo humano, y
30 (b) una molécula efectora,

en el que dicho inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

35 Aún más, la presente descripción proporciona un inmunoconjugado para la supresión de la supervivencia de las células de mieloma en un individuo, en el que el inmunoconjugado comprende:

un agente dirigido que se dirige contra CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en el que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% de la SEC ID N° 1,
40

En los dos párrafos anteriores el inmunoconjugado es, en particular, capaz de disminuir selectivamente la supervivencia o crecimiento de dichas células de mieloma en el individuo.

45 Además, la presente descripción proporciona un inmunoconjugado para su uso en la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la diseminación de células tumorales de tal tumor en un sujeto, en el que el inmunoconjugado comprende un anticuerpo dirigido modificado contra CD138 unido a una molécula efectora por medio de un enlazador escindible, en el que dicha molécula efectora está impedida estéricamente.

50 En el párrafo anterior, el inmunoconjugado es, en particular, capaz de proporcionar una inhibición de la actividad tumoral que excede la de su equivalente sin impedimento aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40% o más.

55 La presente descripción proporciona además un agente de dirección a CD138 para su uso en un método para la disminución de la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138 en las células tumorales de un sujeto.

60 La presente descripción proporciona además un medicamento que comprende un agente de dirección a CD138 y un agente adicional, tal como un inmunoconjugado dirigido o un agente citostático, como una preparación combinada para su uso simultáneo (co-administración), por separado, o secuencial en un método para disminuir la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138 en las células tumorales de un sujeto.

65 En el párrafo anterior, la preparación combinada es, en particular, capaz de inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 proporciona una representación esquemática de nBT062 que tienen unidas moléculas efectoras.

La FIG. 2 es una representación química de BT062.

5 La FIG. 3 muestra la conversión de ansamitocina P-3 a maitansinol (la estereoquímica se omite por simplicidad).

La FIG. 4 muestra un esquema representativo de la síntesis de DM4.

La FIG. 5 es una representación esquemática de una conjugación de anticuerpo (nBT062 a DM4).

10 La FIG. 6 muestra un análisis de la unión de los anticuerpos nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 y nBT062 a las células OPM-2. Se dieron concentraciones diferentes de n BT062 y conjugados a las células y se midió la fluorescencia media por análisis FACS.

Las FIG. 7 (A)-(D) representan la toxicidad in vitro de conjugados nBT062-DMx hacia las células MOLP-8 (CD138⁺) and BJAB (CD138⁻). Las células se cultivaron en placas de fondo plano y se incubaron con las concentraciones indicadas de inmunocombinados durante 5 días. Se añadió el reactivo WST por otras 3 horas para valorar la viabilidad celular. En (D) se analizó la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 en presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo (1 μ M nBT062).

15 La FIG. 8 muestra los volúmenes tumorales para ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) anticuerpo nBT062, (C) DM4 libre o (D) huC242-DM4 conjugado no dirigido a lo largo del tiempo (días) tras la inoculación con células tumorales MOLP-8.

20 La FIG. 9 muestra los volúmenes tumorales para ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) nBT062-SPDB-DM4, (C) B-B4-SPP-DM1 o (D) nBT062-SPP-DM1 a lo largo del tiempo (días) tras la inoculación con células tumorales MOLP-8.

La FIG. 10 representa la media de volumen tumoral (+/- DE) de xenoinjertos de mieloma múltiple humano MOLP-8 en ratones CB.17 SCID a lo largo del tiempo (días) tras la inoculación.

25 Las FIG 11A y B muestran la actividad anti-tumoral de nBT062-DMx contra células MOLP-8 CD138⁺ en un modelo de volumen de tumor MOLP-8 en ratones SCID. El volumen tumoral se presenta como la media (+/- DE) para cada grupo.

30 La FIG. 12 es un gráfico que refleja la eficacia anti-tumoral de nBT062 que contienen conjugados DMx en el modelo SCIDhu/INA-6 hacia las células de mieloma múltiple en el entorno de médula ósea humana. El receptor IL-6 humano soluble producido por las células de mieloma múltiple (shuIL-6R) se utilizó como un indicador de la carga tumoral. Triángulo: nBT062-SPPDM1, Cuadrado: nBT062-SPDB-DM4; Rombo: vehículo control.

La FIG. 13 muestra el testigo de destrucción mediado por nBT062-SPDB-DM4. Las células OPM2 positivas a CD138 y las células Namawla negativas a CD138 se cultivaron con nBT062-SPDB-DM4 a diferentes concentraciones y se midió la viabilidad celular. Los valores de la DO₄₅₀ representan una medida de la viabilidad celular.

35 La FIG. 14 muestra en (A) la expresión de CD138 en diferentes células del MM y en (B) un análisis microscópico de células DOX40 (panel superior) y células OPM21 (panel inferior). La expresión de CD138 se muestra en el lado a mano derecha, los ácidos nucleicos se muestran en el lado a mano izquierda.

40 La FIG. 15 (A) representa la citotoxicidad de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 hacia las células del MM tras 40, 80 y 120 horas. La FIG. 15 (B) representa la viabilidad de las células del MM aisladas de tres diferentes pacientes tras el tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 durante 2 días. La FIG. 15 (C) muestra las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de 3 sujetos sanos que se cultivaron con nBT062-SPDB-DM4 durante 72 horas antes de determinarse la viabilidad celular.

La FIG. 16 (A) muestra un análisis del ciclo celular en el que las células OPM1 se trataron con inmunocombinados durante 0, 12 o 24 h y los perfiles del ciclo celular se analizaron por tinción PI.

45 En la FIG. 16 (B) se cultivaron las células OPM1 en presencia o ausencia de inmunocombinados durante 24, 48 o 72 h. Se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por tinción con anticuerpo Apo 2.7 y análisis de citometría de flujo.

En la FIG. 16 (C) se cultivaron las células OPM1 en presencia de 885 μ g/ml de nBT062-SPDB-DM4 durante los tiempos indicados (panel izquierdo) o con diferentes concentraciones de inmunocombinados (panel central). El inhibidor pan-caspasa zVAD-fmk bloqueaba la caspasa 8, 9 y 3 inducida por nBT062-SPDB-DM4 y la escisión por la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en células OPM1 (panel derecho).

50 La FIG. 17 muestra en (A) a (C) el efecto de IL-6, IGF-1 y BMSC sobre el crecimiento y sensibilidad de las células del MM hacia los inmunocombinados. La FIG. 17 (D) muestra los experimentos que utilizan Dexametasona en vez del inmunocombinado. La FIG. 17 (E) muestra los resultados del experimento de adhesión celular con co-cultivos de células tumorales y BMSC en presencia o ausencia de inmunocombinados.

55 La FIG. 18 (A) describe un análisis de la expresión de GFP por las células OPM1^{GFP}. La FIG. 18 (B) muestra el efecto de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o tampón de control sobre los tamaños tumorales en los grupos de SCID inyectados con 5×10^6 células OPM1^{GFP}. La FIG. 18 (C) el nBT062-SPDB-DM4 aumenta significativamente la supervivencia ($P < 0,0023$, línea discontinua, $n = 5$). La FIG. 18 (D) demuestra que nBT062-SPDB-DM4 induce apoptosis in vivo.

60 Descripción detallada de varias realizaciones preferidas de la invención

65 La presente descripción se refiere a inmunocombinados que comprenden agentes dirigidos a CD138 y el suministro de la molécula(s) efectora(s) de los inmunocombinados a los sitios diana y la liberación específica del sitio de la molécula(s) efectora(s) en o cerca de las células, tejidos u órganos diana. Las moléculas efectoras se pueden activar por escisión/disociación de la parte del agente de dirección del inmunocombinado en el sitio diana. La presente invención se refiere particularmente al uso de estos inmunocombinados para combatir el crecimiento tumoral in vivo y

al uso de la capacidad de estos inmunocombinados para superar o disminuir los mecanismos protectores que se encuentran en el microambiente de la médula ósea.

Los inmunocombinados de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un sujeto que necesita del tratamiento terapéutico o a las células aisladas de tal sujeto que necesita el tratamiento terapéutico. La molécula o moléculas efectoras se pueden liberar del inmunocombinado por escisión/disociación en, o cerca de la célula, tejido u órgano diana.

En un ejemplo de la descripción, el inmunocombinado comprende el anticuerpo nBT062, que se dirige a las células que expresan CD138, y al menos un fármaco altamente citotóxico o toxina como molécula efectora, se administra a un paciente con cáncer. Es este ejemplo, se administra por vía intravenosa a una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunocombinado a un paciente de forma que se concentra en las células del cáncer. La molécula o moléculas efectoras se liberan entonces del anticuerpo por medios naturales. Después o durante la escisión, la molécula efectora se puede estabilizar por alquilación y puede difundirse rodeando las células auxiliares tales como las células del estroma que no expresan CD138.

En un ejemplo de la invención, el inmunocombinado comprende el anticuerpo nBT062, que se dirige a las células que expresan CD138, y al menos un fármaco altamente citotóxico o toxina como molécula efectora, y un agente citotóxico adicional, se administra a un paciente con cáncer. En este ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunocombinado y el agente citotóxico consecutivamente. Primero se administra el inmunocombinado por vía intravenosa a un paciente de forma que se concentra en las células cancerosas del microambiente de la médula ósea. El inmunocombinado supera sustancialmente la resistencia a los fármacos mediada por la adhesión celular (CAM-DR) y destruye una parte sustancial de las células tumorales que expresan CD138 en el microambiente de la médula ósea. En particular, la molécula(s) efectora(s) se libera del anticuerpo por medios naturales y destruye las células tumorales. El inmunocombinado al menos en parte evita la adhesión de las células tumorales a las células del estroma, algunas de las cuales se pueden destruir por la difusión de la molécula efectora. Tras un intervalo de tiempo de 12 horas, se administra el agente citotóxico. El agente citotóxico, cuya actividad al menos se reduce normalmente por la CAM-DR puede actuar sobre las células tumorales que no están asociadas con las células del estroma y destruir las células tumorales que expresan CD138, que escaparon a la acción del inmunocombinado.

CD138 o Sindecan-1 (también descrito como SYND1; SYNDECAN; SDC; SCD1; ANTIGENO CD138, número de registro SwissProt: P18827 humano) es una glucoproteína de membrana que se describió originalmente por estar presente en las células de origen epitelial, y posteriormente se encontró en células hematopoyéticas (Sanderson, 1989). El CD138 tiene un largo dominio extracelular que se une a moléculas solubles (por ejemplo, los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF) y a moléculas insolubles (por ejemplo, a los componentes de la matriz extracelular, colágeno y fibronectina) por medio de cadenas de sulfato de heparano (Langford, 1998; Yang, 2007) y actúa como un receptor para la matriz extracelular. El CD138 también media en la adhesión célula a célula por medio de las moléculas de unión a heparina expresadas por las células adherentes. Se ha demostrado que el CD138 tiene un papel como co-receptor para los factores de crecimiento de las células de mieloma (Bisping, 2006). Los estudios en diferenciación de células plasmáticas demostraron que el CD138 también se debe considerar como un antígeno de diferenciación (Bataille, 2006).

En la hematopoyesis maligna, el CD138 se expresa altamente en la mayoría de las células del MM, carcinoma ovárico, carcinoma de riñón, carcinoma de vesícula, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, células de carcinoma de colon y células de linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL) (Horvathova, 1995), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML) (Seftalioglu, 2003 (a); Seftalioglu, 2003 (b)), sarcomas de tejidos sólidos, carcinomas de colon así como otras enfermedades malignas hematológicas y tumores sólidos que expresan CD138 (Carbone et al., 1999; Sebestyen et al., 1999; Han et al., 2004; Charnaux et al., 2004; O'Connell et al., 2004; Orosz y Kopper, 2001).

Otros cánceres en los que se ha demostrado que son positivos a la expresión de CD138 son muchos adenocarcinomas ováricos, carcinomas de células transicionales de vejiga, carcinoma de células claras de riñón, carcinoma de pulmón de células escamosas; carcinomas de mama y cánceres uterinos (véase, por ejemplo, Davies et al., 2004; Barbareschi et al., 2003; Mennerich et al., 2004; Anttonen et al., 2001; Wijdenes, 2002).

En el compartimento hematopoyético normal humano, la expresión de CD138 se restringe a las células plasmáticas (Wijdenes, 1996; Chilosi, 1999) y el CD138 no se expresa en linfocitos, monocitos y granulocitos de sangre periférica, y glóbulos rojos. En particular, las células madre CD34⁺ y progenitoras no expresan CD138 y los mAb anti- CD138 no afecta el número de unidades formadoras de colonias en los cultivos de células madre hematopoyéticas (Wijdenes, 1996). En los compartimentos no hematopoyéticos, el CD138 se expresa principalmente en el epitelio simple y estratificado del pulmón, hígado, piel, riñón e intestino. Solo se vio una débil tinción en las células endoteliales (Bernfield, 1992; Vooijs, 1996). Se ha informado de que existe CD138 en formas polimórficas en las células de linfoma humano (Gattei, 1999).

Se ha informado que los anticuerpos monoclonales BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7,

104-9, 281-2 en particular B-B4 son específicos para el CD138 y se demostró que reconocían el mismo o epítomos estrechamente relacionados (Gattei, 1999). Estudios previos comunicaron que B-B4 no reconocía CD138 soluble, sino solamente el CD138 de la membrana en forma unida (Wijdenes, 2002).

5 El B-B4 es un mAb IgG1 murino, que se une a un epítipo lineal entre los restos 90-95 de la proteína central del sindecan-1 humano (CD138) (Wijdenes, 1996; Dore, 1998). En consonancia con el patrón de expresión de CD138, se demostró que el B-B4 reaccionaba fuertemente con la línea celular plasmática RPMI8226, pero no reaccionaba con células endoteliales. También en consonancia con el patrón de expresión de CD138, el B-B4 reacciona también con líneas de células epiteliales A431 (derivado de queratinocitos) y HepG2 (derivado de hepatocitos). Una
10 inmunotoxina B-B4-saponina también era altamente tóxica para la línea celular plasmática RPMI8226, de hecho considerablemente más tóxica que la saponina libre. Sin embargo, en las dos líneas celulares epiteliales, la B-B4-saponina solo mostraba toxicidad para la línea celular A431, aunque en un ensayo clonogénico la BB4-saponina no mostraba un efecto inhibitor en el crecimiento de células A431 (Vooijs, 1996). Otros investigadores comunicaron falta de especificidad de los antígenos asociados a MM contra los tumores (Couturier, 1999).

15 Un anticuerpo/inmunoconjugado “consiste esencialmente en” ciertos componentes, significa en el contexto de la presente invención que el anticuerpo/inmunoconjugado consiste en los componentes especificados y cualquiera de los materiales adicionales o componentes que no afectan materialmente las características básicas del anticuerpo.

20 La presente invención utiliza la expresión “célula tumoral” para incluir las células del cáncer así como las células precancerosas que pueden formar parte o no de un tumor sólido.

Un “agente dirigido” de acuerdo con la presente descripción es capaz de asociarse con una molécula expresada por una célula diana e incluye péptidos y no péptidos. En particular, los agentes dirigidos de acuerdo con la presente
25 invención incluye anticuerpos dirigidos y moléculas dirigidas no inmunoglobulinas, que se pueden basar en proteínas no inmunoglobulinas, que incluyen pero no limitan a moléculas AFFILIN®, ANTICALINS® y AFFIBODIES®. Las moléculas dirigidas no inmunoglobulinas también incluyen moléculas dirigidas no peptídicas tales como oligonucleótidos ADN y ARN dirigidas (aptámeros), pero también ligandos fisiológicos, en particular, ligandos del antígeno en cuestión, tal como el CD138.

30 Un “anticuerpo dirigido” de acuerdo con la presente invención es o se basa en un anticuerpo natural o se produce sintéticamente o por modificación genética y se une a un antígeno en una célula o células (célula(s) diana) de interés. Un anticuerpo dirigido de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo dirigido puede estar modificado, por ejemplo, para mejorar su afinidad contra las células diana (Ross, 2003) o disminuir su inmunogenicidad. El anticuerpo dirigido se puede unir a una formulación de liposomas que incluyen las moléculas efectoras (Carter, 2003). Un fragmento de anticuerpo comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, pero también los diacuerpos; dominios de anticuerpo (dAb) (Ward, 1989; Patente de Estados Unidos 6.005.079); anticuerpos lineales; moléculas anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. En un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla variable (scFv) las cadenas pesada y ligera (VH y VL) se pueden unir por un enlazador de aminoácidos corto que tiene, por ejemplo, la secuencia (glicina₄ serina)_n, que tiene la suficiente flexibilidad para permitir que los dos dominios se unan a un bolsillo de unión al antígeno funcional. La adición de varias secuencias de señal puede permitir una dirección más precisa del anticuerpo dirigido. La adición de la región constante de la cadena ligera (CL) puede permitir la dimerización por medio de enlaces disulfuro, lo que aumenta la estabilidad y la avidéz. Las regiones variables para la construcción del scFv pueden, si está disponible un mAb contra una diana de interés, obtenerse por RT-PCR que clona las regiones variables a partir del ARNm extraído del hibridoma parental. De manera alternativa, el scFv se pueden generar de novo por tecnología de fago de presentación (Smith, 2001). Como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento funcional”, cuando se utilizan en referencia a un anticuerpo dirigido, se pretende que se refiere a una parte del anticuerpo dirigido que es capaz de unirse específicamente a un antígeno que está unido específicamente por el anticuerpo al que se hace referencia. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, tener al menos un brazo que es reactivo contra un tejido diana y un brazo que es reactivo contra un resto enlazador (Publicación de Patente de Estados Unidos 20020006379). Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede unirse también a más de un antígeno en una célula diana (Carter, 2003). Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede modificar por ejemplo, introduciendo restos de cisteína para introducir grupos tiol (Olafsen, 2004).

60 De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo dirigido se puede derivar de cualquier fuente y puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo de camélido, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico de ser humano/ratón o un anticuerpo quimérico de ser humano/mono, en particular, un anticuerpo quimérico de ser humano/ratón tal como nBT062.

65 Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias derivadas de un anticuerpo humano y un anticuerpo no humano y también están en el ámbito de la presente invención. Los métodos adecuados para

- humanizar anticuerpos incluyen el injerto-CDR (injerto de la región determinante de complementariedad) (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de Estado Unidos 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (P 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 199; Studnicka et al., 1994; Roguska et al., 1994), entremezclado de cadenas (Patente de Estados Unidos 5.565.332) y Delnimmunosación™ (Biovation, LTD). En el injerto-CDR, las regiones determinantes de complementariedad de ratón (CDR) de por ejemplo, el mAb B-B4 se injertan en los armazones variables humanos, que se unen entonces a las regiones constantes humanas, para crear un anticuerpo B-B4 (gB-B4). Varios anticuerpos humanizados por injerto-CDR están actualmente en uso clínico, que incluyen el MYLOTARG (Sievers et al., 2001) y HECEPTIN (Pegram et al, 1998).
- La tecnología de recubrimiento utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de las regiones variables del anticuerpo para que se parezcan a superficies de anticuerpos conocidos del huésped diana. Las estrategias y métodos para el recubrimiento de anticuerpos, otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpo en diferentes huéspedes, se desvelan, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos 5.639.641. Los anticuerpos humanos se pueden fabricar por una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de fago de presentación. Véase también las Patentes de Estados Unidos 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patente internacionales WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.
- Los anticuerpos dirigidos que se han sometido a una modificación no natural tal como los anticuerpos quiméricos humano/ratón o quimérico humano/mono, anticuerpos humanizados o anticuerpos que se modificaron para, por ejemplo, mejorar su afinidad para las células diana o para disminuir su inmunogenicidad pero también los fragmentos de anticuerpo, en particular los fragmentos funcionales de tales anticuerpos dirigidos que se han sometido a cualquier modificación no natural, diacuerpos; dominios de anticuerpo; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos se denominan en el presente documento anticuerpos dirigidos modificados.
- Los anticuerpos quimerizados, mantienen la región del anticuerpo de unión (región ABR o Fab) del anticuerpo no humano, por ejemplo, el anticuerpo murino en el que se basan, mientras que las regiones constantes se pueden proporcionar, por ejemplo, por un anticuerpo humano. En general, la quimerización y/o el intercambio de regiones constantes de un anticuerpo no afectará la afinidad de un anticuerpo debido a las regiones del anticuerpo que contribuyen a la unión con el antígeno no se afectan por este intercambio. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo modificado, en particular quimerizado, de la presente invención, puede tener una afinidad de unión más alta (como se expresa por los valores de K_D) que el anticuerpo no humano respectivo en el que se basa. En particular el anticuerpo nBT062 y los anticuerpos que se basan en el mismo pueden tener una afinidad de unión más alta que el B-B4 murino. En otra realización preferida de la presente invención, los inmunoconjugados que comprenden estos anticuerpos modificados/quimerizados también muestran esta alta afinidad de anticuerpo. Estos inmunoconjugados pueden presentar también en ciertas realizaciones otras propiedades ventajosas, tales como la alta reducción de la carga tumoral que sus equivalentes que contienen B-B4. En una realización preferida, los anticuerpos dirigidos modificados, en particular los anticuerpos dirigidos quimerizados presentan afinidades de unión que se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) de menos de 1,6, menos de 1,5 o aproximadamente o menos de 1,4, mientras que sus equivalentes murinos se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o más de 1,6. Se prefieren los inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos tales como los anticuerpos dirigidos que se pueden caracterizar por constantes de disociación de K_D (nM) de menos de 2,6, menos de 2,5, menos de 2,4, menos de 2,3, menos de 2,2, menos de 2,1, menos de 2,0, menos de o aproximadamente 1,9, mientras que los inmunoconjugados que comprenden anticuerpos del equivalente murino se pueden caracterizar por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o más de 2,6 (compárese la Tabla 3, Materiales y Métodos).
- Los anticuerpos totalmente humanos también se pueden utilizar. Estos anticuerpos se pueden seleccionar por la estrategia de fago de presentación, en el que CD138 o el determinante antigénico del mismo se utiliza para unirse selectivamente al fago que expresa, por ejemplo, las regiones variables de B-B4 (véase, Krebs, 2001). Esta estrategia se acopla ventajosamente con la técnica de maduración de afinidad para mejorar la afinidad del anticuerpo. Todos los anticuerpos a los que se refiere el presente documento son anticuerpos aislados.
- En una realización, el anticuerpo dirigido está, en su forma sin conjugar, moderada o pobremente internalizado. Una internalización moderada constituye aproximadamente del 30% al 70% de internalización del anticuerpo, la internalización pobre constituye aproximadamente del 0,01% hasta aproximadamente el 30% de internalización tras 3 horas de incubación a 37 °C. En otra realización preferida el anticuerpo dirigido se une al CD138, por ejemplo, los anticuerpos BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2 en particular el B-B4. Las células de hibridoma, que se generaban por hibridación de células de mieloma SP02/0 con células esplénicas de ratones Balb/c se han depositado en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig el 11 de diciembre de 2007. El número de identificación de estas células de hibridoma que expresan B-B4 es DSM ACC2874. En otra realización, el anticuerpo dirigido no se une sustancialmente al CD138 que se expresa en la superficie. Cuando, en el contexto de la presente invención, el nombre de un anticuerpo específico está combinado con el término "anticuerpo dirigido" tal como "anticuerpo dirigido nBT062", significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de unión del anticuerpo nBT062. Si se dice que

un anticuerpo dirigido está “basado en” un anticuerpo especificado, esto significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de unión de este anticuerpo, pero puede tomar cualquier forma que consistente con la descripción anterior de un anticuerpo dirigido. Cuando, en el contexto de la presente invención, el nombre de un antígeno específico se combina con la expresión “anticuerpo dirigido” tal como “anticuerpo dirigido CD138”, esto significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de unión por el CD138. Si, en el contexto de la presente invención, se dice , por ejemplo, que un anticuerpo dirigido hace algo “selectivamente” tal como “dirigido selectivamente contra el CD138 que se expresa en la superficie celular” o que es “selectivo” para algo, esto significa que hay una selectividad significativa (es decir, una afinidad más alta hacia las células positivas a CD138 en comparación con células negativas a CD138) para, en el caso del ejemplo que se proporciona, el CD138 que se expresa en la superficie celular, en comparación con cualquiera de otros antígenos. Los efectos secundarios adversos en un determinado ambiente se reducen sustancialmente o incluso se evitan debido a esta selectividad.

“Moléculas dirigidas no inmunoglobulinas” de acuerdo con la presente descripción incluye las moléculas dirigidas derivadas de proteínas no inmunoglobulinas así como de moléculas dirigidas no peptídicas. Las pequeñas proteínas no inmunoglobulinas que están incluidas en esta definición se diseñan para que tengan afinidades específicas hacia CD138 que se expresan en particular en la superficie. Estas pequeñas proteínas no inmunoglobulinas incluyen las moléculas modificadas basadas en armazones tales como moléculas Affilin® que tienen un peso molecular relativamente bajo tal como entre 10 kDa y 20 kDa. Los armazones apropiados incluyen, por ejemplo, cristalina gama. Estas moléculas tienen, en su estado natural, actividad de unión no específica hacia las moléculas diana. Modificando las superficies de las proteínas mediante aleatorización definida localmente de aminoácidos expuestos a disolventes, se crean sitios de unión completamente nuevos. Las primeras proteínas no unidas se transforman de esta manera en proteínas de unión específica. Tales moléculas se pueden diseñar específicamente para unirse a una diana, tal como el CD138, y permite el suministro específico de una o más moléculas efectoras (véase, scil Proteins GmbH at www.scilproteins.com, 2004). Otro tipo de moléculas dirigidas no inmunoglobulina se derivan de lipocalinas, e incluyen, por ejemplo ANTICALINS®, que se parecen en la estructura de alguna manera a las inmunoglobulinas. Sin embargo, las lipocalinas se componen por una única cadena polipeptídica con 160 a 180 restos de aminoácidos. Los bolsillos de unión de las lipocalinas están reformadas para reconocer una molécula de interés con alta afinidad y especificidad (véase, por ejemplo, Beste et al., 1999). Los receptores bacterianos artificiales tales como los que se comercializan bajo la marca Affibody® (Affibody AB) también están en el ámbito de la presente invención. Estas moléculas de receptor bacteriano artificial son proteínas pequeñas, simples que pueden estar compuestas por un manojo triple helicoidal basado en el armazón de uno de los dominios de unión IgG de la Proteína A (*Staphylococcus aureus*). Estas moléculas tienen propiedades de unión similares a muchas inmunoglobulinas, pero son sustancialmente más pequeñas, que tienen un peso molecular que no excede a menudo los 10 kDa y que son también comparativamente estables. Las moléculas de receptor bacteriano artificial adecuadas están, por ejemplo, descritas en las Patentes de Estados Unidos 5.831.012; 6.534.628 y 6.740.734.

Otras “moléculas dirigidas no inmunoglobulinas” son ligandos fisiológicos del antígeno en cuestión. Los ligandos fisiológicos del CD138 incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, ADAMTS4 (agrecanasa-1), antitrombina-3, bFGF, catepsina G, CCL5 (RANTES), CCL7, CCL11, CCL17, CD44, colágenos (colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, colágeno tipo 3, colágeno tipo 4, colágeno tipo 5, colágeno tipo 6), CXCL1, elastasa, gp120 , HGF [factor de crecimiento del hepatocito], laminina-1, laminina-2, laminina-5, midquina, MMP-7, neutrófilo elastasa, y pleiotrofina (HBNF, HBGF-8). Las moléculas dirigidas no peptídicas incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos ADN y ARN que se unen a CD138 (aptámeros).

Una “molécula efectora” de acuerdo con la presente invención es una molécula o un derivado, o un análogo de la misma que se une a un agente de dirección, en particular un anticuerpo dirigido y/o un anticuerpo dirigido modificado, y que ejerce el efecto deseado, por ejemplo apoptosis, u otro tipo de muerte celular, o una detención del ciclo celular continuo en la célula o células diana. Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas que pueden ejercer efectos deseados en una diana celular e incluyen, pero no se limitan a, toxinas, fármacos, en particular fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, radionúclidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes formadores de poros, ribonucleasas, proteínas de las cascadas de señalización apoptótica con actividades inductoras de apoptosis, enzimas citotóxicas, enzimas activadoras de profármacos, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos o citocinas, así como derivados funcionales o análogos/fragmentos de los mismos. Las toxinas pueden incluir toxinas bacterianas, tales como, pero sin limitarse a, toxina diftérica o Exotoxina A, toxinas vegetales, tales pero sin limitarse a, ricino. Proteínas de cascadas de señalización apoptóticas con actividades de inducción de apoptosis, que incluyen, pero no se limitan a, Granzima B, Granzima A, Caspasa-3, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Bid truncado (tBid), Bax y Bak.

En una realización preferida, el efector aumenta el suministro interno del efector del inmunoconjugado, en particular cuando la forma natural del anticuerpo en el que está basado el anticuerpo dirigido del inmunoconjugado es pobremente internalizable. En otra realización preferida el efector es, en su forma nativa, no selectivo. En ciertas realizaciones, el efector tiene una alta toxicidad no selectiva, que incluye toxicidad sistémica, cuando está en su forma nativa. La “forma nativa” de una molécula efectora de la presente invención es una molécula efectora antes de unirse al agente de dirección para formar un inmunoconjugado. En otra realización preferida, la molécula efectora produce, cuando alcanza la célula diana, la muerte o la detención del ciclo celular continuo en la célula diana. Una molécula efectora fármaco de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, un fármaco que

incluye, por ejemplo, fármacos pequeños altamente tóxicos que actúan como inhibidores de la polimerización de la tubulina tal como los maitansinoides, dolastatinas, auristatina y critoficina; agentes alquilantes de ADN como los análogos o derivados CC-1065 (Patentes de Estados Unidos 5.475.092; 5.585.499; 6.716.821) y duocarmicina; antibióticos enedinas tal como caliqueaminas y esperamicina; y potentes fármacos taxoides (taxano) (Payne, 2003).

5 Los maitansinoides y caliqueaminas son particularmente preferidos. Un efector maitansinoide incluye maitansinoides de cualquier origen, que incluyen, pero no se limitan a maitansinol sintético y análogo o derivado de maitansinol. Otras algunas moléculas efectoras en el ámbito de la presente invención son doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarzinostatina, macromicina, trenimon y α -amanitina. También están dentro del ámbito de la invención moléculas ADN antisentido como moléculas efectoras. Cuando el nombre de, por ejemplo, un
10 fármaco específico o clase de fármacos se combina en el presente documento con el término "efector" o "molécula efectora", se hace referencia a un efector de un inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención que está basado en el fármaco o clase de fármacos especificado.

La maitansina es un producto natural derivado originalmente del arbusto etíope *Maytenus serrata* (Remillard, 1975; Patente de Estados Unidos 3.896.111). Este fármaco inhibe la polimerización de la tubulina, dando como resultado el bloqueo mitótico y la muerte celular (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). La citotoxicidad de la maitansina es 200-1000 veces mayor que la de los fármacos anti-cáncer de uso clínico que afectan la polimerización de la tubulina, tales como los alcaloides de la vinca o taxol. Sin embargo, los ensayos clínicos de maitansina indican que carece de una ventana terapéutica debido a su alta toxicidad sistémica. La maitansina y los maitansinoides son
20 altamente citotóxicos pero su uso clínico en la terapia del cáncer se ha limitado mucho por sus efectos secundarios sistémicos que se atribuye primariamente a su pobre selectividad por los tumores. Los ensayos clínicos con maitansina demuestran serios efectos secundarios adversos en el sistema nervioso central y sistema gastrointestinal.

25 Los maitansinoides se han aislado también de otras plantas que incluyen el tejido seminal de *Trewia nudiflora* (Patente de Estados Unidos 4.418.064)

Ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Patente de Estados Unidos 4.151.042).

30 La presente invención se refiere a los maitansinoides de cualquier origen, incluyendo el maitansinol sintético y análogos de maitansinol que se desvelan por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.371.533; 4.424.219 y 4.151.042.

35 En una realización preferida, el maitansinoide es un maitansinoide que contiene tiol y se produce más preferentemente de acuerdo con los procesos desvelados en la Patente de Estados Unidos 6.333.410 de Chari et al o en Chari et al. (Chari, 1992).

40 La DM-1 (N^2 -deacetil- N^2 -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) es una molécula efectora en el contexto de la presente invención. La DM-1 es 3 a 10 veces más citotóxica que la maitansina, y se ha convertido en un pro-fármaco uniéndolo por medio de un enlace(s) disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno asociado a un tumor. Ciertos de estos conjugados (a veces llamados "profármacos activados por el tumor" (TAP) no son citotóxicos en el compartimento sanguíneo, aunque se activan cuando se asocian con células diana y se internalizan, liberando de esta forma el fármaco (Blättler, 2001). Se han desarrollado varios conjugados DM1-anticuerpo (Payne, 2003), y se han evaluado en ensayos clínicos. Por ejemplo, el tratamiento con huC242-DM1 en pacientes con cáncer colorrectal era bien tolerado, no inducía respuesta inmunitaria detectable y tenía un tiempo de circulación largo (Tolcher, 2003).

50 Otros maitansinoides particularmente preferidos comprenden una cadena lateral que contiene un enlace tiol impedido estéricamente, tal como, pero no limitado a, maitansinoides N^2 -desacetil- N^2 -(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también denominado "DM3," y N^2 -desacetil- N^2 -4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también denominado "DM4." La síntesis de DM4 se muestra en las FIG. 3 y 4 y se describe en otra parte del presente documento. El DM4 se diferencia de DM1 y DM3 en el que alberga grupos metilo en su α C. Esto da como resultado un impedimento estérico cuando DM4 se une por medio de un enlazador en particular, pero no limitado a, un enlazador que comprende un enlace disulfuro, a un agente de dirección tal como nBT062. Una amplia variedad de maitansinoides que albergan un grupo tiol impedido estéricamente (que posee uno o dos sustituyentes, en particular sustituyentes alquilo, tales como sustituyentes metilo de DM4) se desvelan en la Publicación de Patente de EE. UU 2004/0235840, publicada el 25 de nov. del 2004. El impedimento estérico conferido por los grupos alquilo tales como los grupos metilo en el carbono adyacente al átomo de azufre de DM3 y DM4 pueden afectar la tasa de escisión intracelular del inmunoconjugado. La unidad alquilo variable puede por lo tanto afectar la potencia, eficacia y seguridad/toxicidad in vitro e in vivo.

65 Como ha comunicado Goldmahker et al. en la Publicación de Patente de EE. UU. 2006/0233814, tal i CD138mpedimento induce la alquilación (por ejemplo, metilación) del fármaco libre, una vez que el fármaco se libera en su diana. La alquilación puede aumentar la estabilidad del fármaco permitiendo el llamado efecto testigo. Sin

embargo, como apreciará el experto en la técnica, son parte de la invención otras moléculas efectoras que comprenden sustituyentes tales como grupos alquilo en posiciones que dan como resultado un impedimento estérico cuando el efector se une a un agente de dirección por medio de un enlazador (Publicación de Patente de EE. UU. 2004/0235840). Preferentemente, este impedimento induce una modificación química tal como la alquilación del fármaco libre para aumentar su estabilidad total, lo que permite al fármaco no solo inducir muerte celular o detención del ciclo celular continuo en células tumorales que expresan CD138, sino, opcionalmente, también afectar a las células auxiliares que, por ejemplo, soportan o protegen el tumor de los fármacos, en particular las células del estroma tumoral y el sistema vascular tumoral y que generalmente no expresan para que disminuyan o pierdan su función de soporte o protectora.

Los agentes alquilantes ADN también son particularmente preferidos como moléculas efectoras e incluyen, pero no se limitan a, análogos o derivados CC-1065. El CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado de cultivos de *Streptomyces zelensis* y se ha demostrado que es un citotóxico excelente in vitro (Patente de Estados Unidos 4.169.888). En el ámbito de la presente invención están, por ejemplo, los análogos o derivados del CC-1065 descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.475.092, 5.585.499 y 5.739.350. Como apreciará fácilmente el experto en la técnica, los análogos o derivados de CC-1065 modificados como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.846.545 y los profármacos de análogos o derivados de CC-1065 como se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.756.397 también están en el ámbito de la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención, los análogos o derivados de CC-1065 pueden, por ejemplo, sintetizarse como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.534.660.

Otro grupo de compuestos que sirven de moléculas efectoras preferidas son los taxanos, especialmente los altamente potentes y los que contienen tiol o grupos disulfuro. Los taxanos son venenos del huso mitótico que inhiben la despolimerización de tubulina, dando como resultado un aumento del ensamblaje de microtúbulos y muerte celular. Los taxanos que están en el ámbito de la presente invención son por ejemplo, los que se desvelan en las Patentes de Estados Unidos 6.436.931; 6.340.701; 6.706.708 y Publicaciones de Patente de Estados Unidos 20040087649; 20040024049 y 20030004210. Otros taxanos se desvelan, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos 6.002.023, Patente de Estados Unidos 5.998.656, Patente de Estados Unidos 5.892.063, Patente de Estados Unidos 5.763.477, Patente de Estados Unidos 5.705.508, Patente de Estados Unidos 5.703.247 y Patente de Estados Unidos 5.367.086. Como un experto en la técnica apreciará, los taxanos PEGilados tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos 6.596.757 también están en el ámbito de la presente invención.

Las moléculas efectoras de calicheamicina de acuerdo con la presente invención incluyen 11, N-acetil calicheamicina y otros derivados de la calicheamicina. La calicheamicina se une al grupo menor de ADN de manera específica de la secuencia, se somete re-ordena y expone radicales libres, lo que lleva a la rotura del ADN bicatenario, dando como resultado la apoptosis y muerte de la célula. Un ejemplo de molécula efectora calicheamicina que se puede utilizar en el contexto de la presente invención se describe en la Patente de Estados Unidos 5.053.394.

Un inmunoconjugado de acuerdo con la presente descripción comprende al menos un agente de dirección, en particular un anticuerpo dirigido y una molécula efectora. El inmunoconjugado puede comprender más moléculas, por ejemplo para la estabilización. Para los inmunoconjugados, el término "conjugado" se utiliza en general para definir la asociación operativa del agente de dirección con una o más moléculas efectoras y no se pretende que se refiera solo a cualquier tipo de asociación operativa, y particularmente no se limita a "conjugación" química. Siempre que el agente de dirección sea capaz de unirse al sitio diana y el efector unido funcione suficientemente como se pretendía, particularmente cuando se suministra en el sitio diana, cualquier modo de unión será adecuado. Los métodos de conjugación de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, unión directa de la molécula efectora al anticuerpo dirigido, con o sin una modificación previa de la molécula efectora y/o el anticuerpo dirigido o unido mediante enlazadores. Los enlazadores se pueden categorizar funcionalmente en, por ejemplo, lábil a ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores escindible por enzimas, tales como los enlazadores que se pueden escindir por peptidasas. En la presente invención el anticuerpo dirigido modificado y la molécula efectora están unidos entre ellos por medio de un enlazador escindible. Tales enlazadores escindibles se pueden escindir bajo las condiciones presentes en el entorno celular, en particular, un entorno intracelular y que no tiene un efecto perjudicial sobre el fármaco liberado con la escisión. Los pH bajos tales como un pH de 4 o 5 como se encuentra en ciertos departamentos intracelulares escindirá los enlazadores lábiles a ácidos, mientras que los enlazadores fotolábiles se pueden escindir, por ejemplo, con rayos infrarrojos. Sin embargo, se prefieren los enlazadores que se escinden por/bajo condiciones fisiológicas que están presentes en la mayoría de las células en muchas realizaciones de la invención. Estos enlazadores son escindibles por medio de un intercambio disulfuro, que pueden existir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores disulfuro heterobifuncionales preferidos incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al.(1978)), N-succinimidil 4-(2-pyridylditio) butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 4.563.304), N-succinimidil 4-(2-pyridylditio) pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, número de Registro CAS 341498-08-6), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) cyclohexano-1-carboxilato (SMCC) (véase, por ejemplo, Yoshitake et al., (1979)), y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio] pentanoato (SMNP) (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 4.563.304). Las moléculas enlazadoras más preferidas para su uso en la composición inventiva son SPP y SPDB.

Otros enlazadores adecuados pueden incluir enlaces “no escindibles”, tales como, pero sin limitarse a carboxilato de sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano (SMCC), que es un enlazador heterobifuncional capaz de unir compuestos con compuestos que contienen SH. Las moléculas enlazadoras bifuncionales y heterobifuncionales, tales como las moléculas enlazadoras heterobifuncionales dirigidas a carbohidratos, tales como S-(2-tiopiridil)-L-cisteína hidrazida (TPCH), también están en el ámbito de la presente invención (Vogel, 2004). La molécula efectora, tal como un maitansinoide, se puede conjugar al anticuerpo dirigido por medio de un proceso de reacción en dos etapas, que incluye una primera etapa de modificación del anticuerpo dirigido con un reactivo entrecruzado tal como N-succinimidil piridiltiopropionato (SDPD) para introducir grupos ditiopiridilo en el anticuerpo dirigido. En una segunda etapa, un maitansinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, se puede añadir al anticuerpo modificado, lo que resulta en el desplazamiento de los grupos tiopiridilo del anticuerpo modificado, y la producción del conjugado anticuerpo/maitansinoide citotóxico unido por disulfuro (Patente de Estados Unidos 5.208.020). Sin embargo, los procesos de conjugación de una etapa tales como el que se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20030055226 de Chari et al. también están en el ámbito de la presente invención. En una realización de la presente invención, múltiples moléculas efectoras de la misma o distinta clase se unen a un anticuerpo dirigido. Como se trata en otra parte del presente documento, la naturaleza de los enlazadores empleados puede influir en la destrucción con testigo (Kovtun et al., 2006). Véase la exposición de la Fig. 13.

Los análogos o derivados de CC-1065 se pueden conjugar con agente de dirección por medio de, por ejemplo, grupos de enlace PEG como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.716.821.

Las calicheamicinas se puede conjugar con los anticuerpo dirigidos por medio de enlazadores (Patente de Estados Unidos 5.877.296 y Patente de Estados Unidos 5.773.001) o de acuerdo con los métodos de conjugación descritos en la Patente de Estados Unidos 5.712.374 y Patente de Estados Unidos 5.714.586. Otro método preferido para preparar conjugados de calicheamicina se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20040082764. Los inmunconjugados de la presente invención puede tener la forma de proteínas de fusión recombinantes.

El término “agentes citotóxicos” comprende los “fármacos citotóxicos/para el cáncer” que incluyen agentes quimioterápicos tales como melfalán, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, y doxorubicina liposomal (DOXIL), ciclofosfamida, etopósido, citarabina y cisplatino, corticosteroides tales como prednisona y dexametasona y agentes tales como la talidomida, bortezomib, lenalidomida, pero también inhibidores de la quinasa tal como sorafenib o inhibidores de la HDAC (histona desacetilasa) tales como romidepsina así como agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimulantes, agentes inmunosupresores, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteína tirosina quinasa (PTK). También se incluyen en esta definición anticuerpo basados en agentes citotóxicos que incluyen inmunconjugados y anticuerpos que tienen un efecto citotóxico reconocido en la técnica. El anti-CD40 es un anticuerpo preferido. Otros anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo AVASTIN (bevacizumab) o MYELOMACIDE (milatuzumab).

El THALOMID (α -(N-ftalimido) glutarimida; thalomida), es un agentes inmunomodulador. La fórmula empírica de la thalomida es $C_{13}H_{10}N_2O_4$ y el peso molecular gramo es 258,2. El número CAS de la talidomida es 50-35-1. Parece que tiene múltiples acciones, que incluyen la capacidad de inhibir el crecimiento y supervivencia de células de mieloma de varias maneras e inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

El VELCADE es un inhibidor del proteosoma utilizado para tratar el mieloma múltiple. Se cree que el VELCADE actúa en las células de mieloma y produce la muerte celular, y/o actúa indirectamente para inhibir el crecimiento celular del mieloma y la supervivencia actuando sobre el microambiente óseo. Si el deseo de quedar ligado por teoría alguna o modo de acción, el VELCADE destruye de esta manera los procesos celulares normales, dando como resultado una inhibición del proteosoma que promueve la apoptosis.

El REVLIMID es un agente inmunomodulador. Se cree que el REVLIMID afecta múltiples rutas en las células de mieloma, inhibiendo de esta manera apoptosis, inhibiendo el crecimiento celular del mieloma, inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por lo que inhibe la angiogénesis, y reduciendo la adhesión de las células de mieloma a las células del estroma de la médula ósea.

La dexametasona es una hormona esteroide glucocorticoide que actúa como antiinflamatorio e inmunosupresor. Cuando se administra a pacientes de cáncer, la dexametasona puede contrarrestar los efectos secundarios de la terapia para el cáncer. La dexametasona también se puede dar solo o junto con otros agentes anticáncer, incluyendo la talidomida, adriamicina o vincristina.

La expresión “en combinación con” no se limita a la administración al mismo tiempo exactamente. En vez de eso, la expresión engloba la administración del inmunconjugado de la presente invención y el otro régimen (por ejemplo, radioterapia) o agente, en particular los agentes citotóxicos enumerados anteriormente en una secuencia y con un intervalo de tiempo tal que puedan actuar juntos para proporcionar un beneficio que esté aumentado en comparación con el tratamiento con solo el inmunconjugado de la presente descripción o, por ejemplo, el otro agente o agentes. Se prefiere que el inmunconjugado y el otro agente o agentes actúen aditivamente, y especialmente se prefiere que actúen sinérgicamente. Tales moléculas se pueden proporcionar adecuadamente en cantidades que sean eficaces para el fin que se pretende. El experto facultativo médico puede determinar

empíricamente, o por la consideración de las farmacocinéticas y modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis adecuadas de cada agente terapéutico, así como los tiempos y métodos adecuados de administración. Como se utiliza en el contexto de la presente descripción “co-administración” se refiere a la administración al mismo tiempo que el inmunoconjugado, a menudo en una forma de dosificación combinada.

5 La expresión “identidad de secuencia” se refiere a una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de forma que se obtenga el orden de mayor coincidencia. “Identidad”, per se, tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando técnicas publicadas (véase, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Como existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término “identidad” se conocen bien entre los expertos (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Si cualquier molécula de ácido nucleico particular es idéntica en al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de nBT062, o una parte de la misma, se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos tales como el software DNAsis (Hitachi Software, San Bruno, Calif.) para el alineamiento de secuencia inicial seguido por el software de secuencias de proteínas/ADN ESEE versión 3.0 (cabot@trog.mbb.sfu.ca) para alineamientos de secuencias múltiples.

Si la secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la, por ejemplo, SEC ID N° 1 o a la SEC ID N° 2, o a una parte de la misma, se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos tales como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). El BESTFIT utiliza un algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias.

30 Cuando se utilizan los programas DNAsis, ESEE, BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia en particular es, por ejemplo, idéntica al 95% con respecto a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se fijan de tal manera que se calcula el porcentaje de identidad sobre el ácido nucleico de referencia de longitud completa o la secuencia de aminoácidos y que se permiten huecos de homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos de la secuencia de referencia.

Si, en el contexto de la presente invención, se hace referencia a una cierta identidad de secuencia con una combinación de restos de una secuencia particular, esta identidad de secuencia se refiere a la suma de todos los restos especificados.

La moléculas básica de anticuerpo es una estructura bifuncional en la que las regiones variables se unen al antígeno mientras que las regiones constantes restantes pueden provocar respuestas independientes del antígeno. Las clases principales de anticuerpo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, se determinan por las regiones constantes. Estas clases se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos). Por ejemplo, la clase IgG tiene cuatro isotipos, a saber, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 que se determinan pro las regiones constantes. De las distintas clases de anticuerpos humanos, solo de las IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas se sabe que activan eficazmente el sistema de complemento. Aunque las regiones constantes no forman sitios de unión al antígeno, la disposición de las regiones constantes y las regiones de bisagra pueden conferir la flexibilidad segmentaria en la molécula que le permita unirse con el antígeno.

Los diferentes isotipos de IgG se pueden unir a receptores Fc de células tales como monocitos, células B, y células NK, activando de esta manera las células que liberan citocinas. Varios isotipos pueden también activar el complemento, dando como resultado una inflamación local o sistémica. En particular, los diferentes isotipos IgG pueden unirse a Fc γ R en diferentes grados. Los Fc γ R son un grupo de glucoproteínas de superficie que pertenecen a la superfamilia Ig y se expresan principalmente en los leucocitos. Las glucoproteínas Fc γ R se dividen en tres clases denominadas Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Mientras que la IgG1, IgG2 e IgG3 se une fuertemente a una variedad de estas clases de glucoproteínas Fc γ R, la IgG4 muestra una unión más débil. En particular, la IgG4 es un ligante intermedio de Fc γ RI, lo que da como resultado una ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) relativamente baja o incluso ninguna, y no se une a Fc γ RIIIA o Fc γ RIIA. La IgG4 también es un ligante débil de Fc γ RIIB que es un receptor inhibitor. Además la IgG4 media una fijación de complemento débil o ninguna y una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) débil o ninguna. En el contexto de la presente invención, la IgG4 se puede emplear específicamente para prevenir la dirección mediada por Fc de FcR hepático ya que no muestra interacción con Fc γ RII en las LSEC (células endoteliales sinusoidales hepáticas), ninguna o débil interacción con Fc γ RI-III en células de Kupffer (macrófagos) y ninguna interacción con Fc γ RIII en

células NK hepáticas. Ciertas mutaciones que reducen más cualquier CDC también son parte de la presente invención, Por ejemplo los restos IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 demostraron que reducían la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Una o más mutaciones que establezcan el anticuerpo también son parte de la presente invención (también denominadas en el presente documento como “mutaciones estabilizantes”). Estas mutaciones incluyen en particular, mutaciones de leucina en ácido glutámico en la región CH2 de IgG4 e intercambios serina por prolina en la región centro de la bisagra de IgG4. Estas mutaciones disminuyen, en ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de semi-moléculas a menos del 10%, menos del 5% y preferentemente menos del 2% o 1%. Además, la semivida in vivo de los anticuerpos estabilizados de esta manera pueden aumentarse varios días, incluyendo, 1, 2, 3, 4, o más de 5 días (Schuurman, 1999).

Los agentes de dirección, incluyendo los anticuerpos dirigidos desvelados en el presente documento pueden describir también o especificarse en términos de su afinidad de unión con el antígeno, en particular para el CD138. Las afinidades de unión preferidas de los agentes de dirección tales como los anticuerpos dirigidos se caracterizan por las constantes de disociación K_D (nM) de menos de 1,6, menos de 1,5 o aproximadamente menos de 1,4. Para los inmunoconjugados que comprenden dichos agentes de dirección tales como los anticuerpos dirigidos se prefieren constantes de disociación K_D (nM) de menos de 1,6, menos de 1,5, o menos de 2,5, menos de 2,4, menos de 2,3, menos de 2,2, menos de 2,1, menos de 2,0, menos de o aproximadamente 1,9.

Una **región de unión al antígeno** (ABR) de acuerdo con la presente descripción variará basándose en el tipo de anticuerpo dirigido o el anticuerpos dirigido modificado que se emplee. En un anticuerpo de origen natural y la mayoría de los anticuerpos quiméricos y humanizados, la región de unión al antígeno se compone de una cadena ligera y de los primeros dos dominios de una cadena pesada y así comprende un ABR con un solo sitio de combinación con el antígeno. Por otro lado, los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos regiones de unión al antígeno. En el contexto de la presente invención, sin embargo, una región de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido o anticuerpo dirigido modificado es cualquier región que determina primariamente la **especificidad de unión** del anticuerpo dirigido o anticuerpo dirigido modificado.

Si una ABR u otra región del anticuerpo dirigido se dice ser “**de un cierto anticuerpo**”, por ejemplo, un anticuerpo humano o no humano, significa en el contexto de la presente descripción que la ABR es o idéntica a una ABR de origen natural correspondiente o está basada en la misma. Una ABR se basa en una ABR de origen natural si tiene la especificidad de unión de la ABR de origen natural. Sin embargo, tal ABR puede comprender, por ejemplo, mutaciones puntuales, adiciones, eliminaciones o modificaciones post-traduccionales tales como glucosilación. Tal ABR puede en particular tener una identidad de secuencia de más del 70%, más del 80%, más del 90%, preferentemente más del 95%, más del 98%, o más del 99% con la secuencia de la ABR de origen natural.

Dirección homogénea de un agente de dirección tal como un anticuerpo dirigido, pero en particular, un inmunoconjugado que comprende el mismo, en el contexto de la presente invención, es una medida de la variación que se asocia con la obtención del resultado deseado de dicha dirección con el agente de dirección. En ciertas realizaciones de la invención, el resultado deseado se obtiene por unión simple a la diana. Este es, por ejemplo, el caso de realizaciones en las que un cierto agente de dirección proporciona un escudo contra la unión posterior. Sin embargo, la homogeneidad de un agente dirigido se puede evaluar fácilmente, por ejemplo, por medio de la eficacia de un inmunoconjugado que comprende dicho agente de dirección. Por ejemplo, la eficacia de dicho inmunoconjugado contra un antígeno tumoral tal como el CD138 que comprende un efector que ayuda a la destrucción de las células tumorales y/o la detención del crecimiento de un tumor se puede determinar por el grado de supresión del crecimiento de un tumor que comprende células que expresan el antígeno CD138. Tal inmunoconjugado puede presentar una gran variación en su eficacia. Esto puede, por ejemplo, detener el crecimiento tumoral a veces con alta eficacia, pero otras veces con una eficacia que apenas excede la eficacia del control. Una baja variación de la eficacia de un inmunoconjugado, por otra parte, muestra que el inmunoconjugado y/o el agente dirigido, respectivamente, proporciona el resultado deseado constantemente. Una forma de cuantificar la homogeneidad de la dirección es calcular la variación de dirección. En el contexto de la detención del crecimiento tumoral por un inmunoconjugado que comprende un cierto agente de dirección, la variación de dirección se puede calcular primero determinando el tiempo para que un tumor alcance un volumen predeterminado, por ejemplo, 300 mm³. Preferentemente, el volumen predeterminado se escoge de forma que el crecimiento de cualquier tumor antes y después de haber alcanzado dicho volumen predeterminado aumenta establemente a aproximadamente la misma tasa. Tras determinar tal tiempo para un grupo de sujetos, se calcula la media de estos tiempos (T_m) en el grupo de sujetos (por ejemplo, ratones SCID u otro modelo adecuado que muestre un crecimiento tumoral homogéneo). El T_m se correlaciona entonces con las observaciones que se hacen en el sujeto del grupo que muestra la eficacia mínima en la dirección y de esta manera se asocia con tumores que necesitan el tiempo mínimo (T_f) para alcanzar dicho volumen predeterminado, y por otra parte, el sujeto del grupo que muestra la eficacia máxima en la dirección y que se asocia con tumores que necesitan el mayor tiempo (T_s) para alcanzar dicho volumen predeterminado calculando la variación de dirección para el volumen predeterminado de acuerdo con la siguiente fórmula:

VARIACIÓN DE DIRECCIÓN [%] =
Ts - Tf/Tm x 100

5 En una realización preferida, la variación de dirección del inmunoconjugado que comprende el anticuerpo dirigido modificado de la presente descripción es menor del 150%, menor del 140%, menor del 130%, menor del 120%, menor del 110%, menor del 100%, menor del 90%, menor del 80%, menor del 70%, menor del 60%, o menor del 50%, y en ciertas realizaciones incluso menor del 45%. Preferentemente, la variación de dirección es entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 150%, preferentemente entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 80%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 60%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50%.

15 La homogeneidad de dirección también se puede cuantificar por otros medios tales como la determinación del retraso del crecimiento tumoral. También, como entenderá fácilmente un experto en la técnica el volumen tumoral de un cierto tamaño es solo un parámetro con el que se puede determinar la base de la variación de dirección. Dependiendo del resultado deseado, se pueden emplear otros parámetros que incluyen el tiempo (por ejemplo, por medición del retraso del crecimiento tumoral) o el % de unión. El experto en la técnica puede fácilmente determinar tales otros parámetros.

20 La FIG. 9 muestra en (C) y (D) las diferencias de homogeneidad de dirección/unión entre inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo murino BB4 (BB4-SPP-DM1; FIG. 9C) y el anticuerpo dirigido modificado nBT062 (nBT062-SPP-DM1; FIG. 9D) que se basa en el mismo. Como se puede apreciar en estos gráficos, los resultados obtenidos con el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo dirigido modificado son sustancialmente más homogéneos que los que se obtienen con los inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo murino. Esto es particularmente notable ya que la región de unión de anticuerpo del BB4 no se modificó en nBT062. Por lo tanto, el inmunoconjugado que comprende la región de unión de anticuerpo del anticuerpo murino, pero no otras partes del anticuerpo murino, mostraba propiedades que excedieran los resultados que esperaba el experto en la técnica.

30 El nBT062 (véase también la FIG. 1) es un mAb IgG4 versión quimérica humana murina de B-B4. Esta versión quimérica de B-B4 se creó para reducir la respuesta HAMA (Anticuerpo humano anti-ratón), a la vez que mantiene la funcionalidad de la región de unión de anticuerpo del B-B4 para el CD138. Sorprendentemente, los resultados obtenidos con el uso de un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo dirigido modificado eran mucho más homogéneos (la variación en los resultados estaba reducida). El protocolo para la producción de nBT062 se especifica por debajo. Las células ováricas de hámster chino que expresan nBT062 se han depositado en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig el 11 de diciembre de 2007. El número de identificación es DSM ACC2875. El anticuerpo quimérico específico CD138 basado en B-B4 se denomina genéricamente c-B-B4.

40 La secuencia de aminoácidos de ambos, las cadenas pesada y ligera se han predicho de la traducción de la secuencia de nucleótidos para nBT062. Las secuencias de aminoácidos previstas para la cadena pesada y la cadena ligera se presentan en la Tabla 1. Las regiones variables previstas están en negrita, las CDR previstas están subrayadas.

45 **Tabla 1.** Secuencia de aminoácidos prevista para nBT062

Secuencia de cadena pesada de nBT062 prevista (SEC ID N° 1):

1	QVQLQ^QSGSE	LMPGASVKI	SKATGYTFS	<u>NYWIEWVKQR</u>	PGHGLEWIGE
51	<u>ILPGTGR</u>TIY	<u>NEKFRGKATF</u>	TADISSNTVQ	<u>QLSSLTSED</u>	<u>SAVYYCARRD</u>
101	<u>YYGNFYAMD</u>	<u>YWQGTSVTV</u>	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL
151	VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSSV	VTVPSSSLGT
201	KTYTCNV^DHK	PSNTKVDKRV	ESKYGPPCPS	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK
251	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSQ	EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS
301	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKGL	PSSIEKTISK	AKGQPREPQV
351	YTLPPSQEEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVVL
401	DSDGSFFLYS	RLTVDKSRWQ	EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQKSLSLSLG	(K)

50 La lisina del extremo C es susceptible de cortarse y puede estar presente debido a un corte incompleto en cierta medida. La (K) entre paréntesis no es parte de la SEC ID N° 1

- Secuencia de la cadena ligera de Nbt062 prevista (**SEC ID N° 2**):

1 **DIQMTQSTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIN NYLWNWYQQKP DGTVELLIYY**
 51 **TSTLQSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIGTYYCQQ YSKLPRTFGG**
 101 **GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV**
 151 **DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG**
 201 **LSSPVTKSFN RGEN**

5 **Tabla 2.** Se muestra la comparación de las definiciones generales de CDR de Kabat y Chothia y las CDR previstas para BT062

Definición CDR de Kabat		nBT062
Cadena ligera	CDR1: restos 24-34	<u>CDR1: restos 24-34</u>
	CDR2: restos 50-56	<u>CDR2: restos 50-56</u>
	CDR3: restos 89-97	<u>CDR3: restos 89-97</u>
Cadena pesada	CDR1: restos 31-35	<u>CDR1: restos 31-35</u>
	CDR2: restos 50-56	CDR2: restos 51-68
	CDR3: restos 95-102	CDR3: restos 99-111
Definición CDR de Chothia		nBT062
Cadena ligera	CDR1: restos 26-32	CDR1: restos 24-34
	CDR2: restos 50-52	CDR2: restos 50-56
	CDR3: restos 91-96	CDR3: restos 89-97
Cadena pesada	CDR1: restos 26-32	CDR1: restos 31-35
	CDR2: restos 52-56	CDR2: restos 51-68
	CDR3: restos 96-101	CDR3: restos 99-111

10 El BT062 es un inmunocombinado que comprende el anticuerpo nBT062 quimérico que se dirige a CD138 que está unido por medio de un enlazador, aquí SPDB, al derivado maitansinoide citostático DM4. Una representación del BT062 se proporciona en las FIG. 1 y 2. Los inmunocombinados que comprenden nBT062 y una molécula efectora maitansinoide a menudo se caracteriza en términos de su enlazador y efector maitansinoide, por ejemplo, nBT062-SMCC-DM1, es un inmunocombinado que comprende nBT062, SMCC (un enlazador "no escindible" que contiene un enlace tioéster) y DM1 como efector. Más genéricamente, un inmunocombinado contiene nBT062 y una molécula efectora también se puede describir como nBT062-enlazador-efector o solo como nBT062-efector (nBT062N, en el que N es cualquiera de los efectores descritos en el presente documento).

20 Se hace referencia en el presente documento a un equivalente sin impedimentos (UI: inmunocombinado sin impedimentos) de un inmunocombinado que comprende un anticuerpo dirigido modificado contra CD138 que está unido a una molécula efectora por medio de un enlazador escindible (CL) y se describe en el presente documento UICL, que se contrasta con un inmunocombinado en el que dicha molécula efectora tiene un impedimento estérico, y contiene un enlazador escindible (HICL - inmunocombinado con impedimentos, enlazador escindible). El UICL es un inmunocombinado equivalente al HICL que comprende un anticuerpo dirigido modificado en el que la molécula efectora está, sin embargo, no impedida estéricamente. Son ejemplos de un par HICL/UICL BT062 y nBT062-SPP-DM1. Un equivalente no impedido de tal inmunocombinado que comprende un enlace no escindible (UINCL) se refiere al inmunocombinado equivalente que comprende un anticuerpo dirigido modificado en el que la molécula efectora no está impedida estéricamente y comprende un enlazador no escindible. Para BT062, nBT062-SMCC-DM1 constituiría un ejemplo de tal equivalente sin impedir que comprende un enlazador no escindible (UNICL).

30 Una actividad de inhibición del crecimiento de un tumor (= actividad de inhibición del crecimiento tumoral) de un inmunocombinado es una medida relativa. Describe la actividad de inhibición del tumor de un combinado con respecto a la actividad de inmunocombinado de máxima actuación cuya actividad se fija como el 100%. Por ejemplo, si la actividad del inmunocombinado de máxima actuación, digamos, BT062, que causa un retraso del crecimiento tumoral (TGD) de 32 días, se fija como el 100%, la actividad, por ejemplo, del nBT062-DM1, que muestra un retraso del crecimiento tumoral (TGD) de 18 días se calcula de la siguiente manera:

Actividad de inhibición del crecimiento tumoral =

$$100 \times (\text{TGD}_{\text{nBT062-DM1}} / \text{TGD}_{\text{BT062}}),$$

5 más genéricamente:

Actividad de inhibición del crecimiento tumoral =

$$100 \times (\text{TGD}_{\text{Muestra}} / \text{TGD}_{\text{Referencia}}).$$

10

La Tabla 3 proporciona ejemplos adecuados de los resultados representados en la Fig. 11 B:

Tabla 3: Retraso del crecimiento tumoral (TGD) y % de actividad de nBT062-DMx contra xenoinjertos tumorales de MOP-8 en ratones SCID basado en los grupos de tratamiento que reciben dosis de 450 µg/kg.

15

	TGD* (días)	% Actividad**
PBS	0	0
nBT062-SMCC-DM1	18	56
BT062	32	100
nBT062-SPP-DM1	13	40

(*) Retraso del crecimiento tumoral en días (TGD) como la media de tiempo en días que alcanza un tamaño predeterminado (160 mm³) para un grupo de tratamiento menos la media de tiempo para alcanzar este tamaño predeterminado para el grupo de control.
 (**) Actividad de inhibición del crecimiento tumoral = $100 \times (\text{TGD}_{\text{Muestra}} / \text{TGD}_{\text{Referencia}})$ - Se define que la actividad de BT062 es del 100%.

20

En el ejemplo proporcionado en la Tabla 2, el BT062 proporciona una actividad de inhibición del crecimiento de un tumor que excede la de su equivalente sin impedimentos (nBT062-SPP-DM1) en un 60%, y una inhibición del crecimiento de un tumor que excede la de su inmunocombinado sin impedimentos equivalente que comprende un enlazador no escindible (nBT062-SMCC-DM1) en un 44%.

25

Se comunicó anteriormente que un enlazador escindible en, por ejemplo, inmunocombinados maitansinoides-huC242 puede proporcionar un efecto denominado de testigo. Goldmahker et al. (Publicación de Patente de EE. UU. 2006/0233814) también desvela que el efecto testigo es particularmente pronunciado cuando la molécula efectora se somete a más modificaciones, en particular alquilación cuando se produce la escisión del agente de dirección. Goldmahker et al. también demuestran que UICL mostraba un TGD mejor que el UINCL respectivo (véase, por ejemplo, la Fig. 6 de la Publicación de Patente de EE. UU. 2006/0233814).

30

Sin embargo, la eficacia total de inmunocombinados HICL/UICL/UINCL parece diferenciarse de inmunocombinado a inmunocombinado y/o diana a diana. Por ejemplo el trastuzumab-SPP-DM4 HICL era claramente superior en su capacidad para reducir el tamaño tumoral por el trastuzumab-SMCC-DM1 UINCL, mientras que la actuación del inmunocombinado UICL trastuzumab-SPP-DM1 se parecía sustancialmente al del HICL correspondiente (véase la Publicación de Patente de EE. UU. 2008/0171040 de Eberts et al.), estableciendo los resultados obtenidos como una función del inmunocombinado y la diana.

35

La Fig. 11 A muestra que el HICL superaba a UICL y UNICL, también se encontró sorprendentemente que UICL en un régimen de dosificación única alta (250 µg/kg) actualmente no mostraba mejores resultados que el UINCL. De hecho, el TGD en días que se observaba en un UICL en tal régimen era actualmente más baja que el UINCL. Esta observación era más pronunciada con un aumento de dosificación (450 µg/kg). En suma, como se muestra en la Fig. 11 A, el HICL supera a UICL en experimentos de una sola dosis en un grado inesperado. En consonancia con estos resultados, en experimentos con dosificación repetida, el HICL superaba al UICL considerablemente, el último de los cuales proporciona resultados que solo exceden marginalmente los del control. Además, el UICL era superado por el UINCL a dosificaciones altas.

40

45

La adhesión de las células de mieloma múltiple a las células del estroma, en particular las células del estroma de la médula ósea, se ha hecho responsable de la resistencia a fármacos mediada por la adhesión (CAM-DR) que se ha observado en pacientes de mieloma múltiple. En ciertas realizaciones, los inmunocombinados de la presente invención puede aliviar la CAM-DR. En particular, en ciertas realizaciones, los inmunocombinados de la presente invención esta adhesión se disminuye administrando el inmunocombinado a dichas células de mieloma múltiple, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80% o más. Como se muestra en la Fig. 17 E, en particular UICL y HICL eran capaces de

50

inhibir la adhesión celular de mieloma múltiple a las BMSC (células del estroma de médula ósea) en muestras en las que solo se trataban las células del estroma (así como en muestras en los que las células del estroma no se trataban), mientras que el equivalente UINCL no tenía este efecto. Estos resultados sugieren el que el efecto de disminución del efecto depende de la naturaleza del enlazador del inmunoc conjugado, con un enlazador escindible se permite disociarse a la molécula efectora más fácilmente, siendo preferidos. El hecho de que las células de mieloma múltiple se salvaguardan por la adherencia a las BMSC también las hace más fácilmente accesibles a otros agentes citotóxicos, que incluyen los que habitualmente tienen una acción inhibida, al menos con total eficacia, sobre las células de mieloma múltiple como resultado de la CAM-DR. Por lo tanto, la administración del inmunoc conjugado se combina preferentemente con una administración simultánea o posterior de agente citotóxico. Los intervalos de tiempo entre la administración del inmunoc conjugado y el agente citotóxico puede comprender de 12 horas a 6 días, incluyendo 12 horas, 24 horas, 2, 3, 4 o 5 días.

Los inmunoc conjugados desvelados en el presente documento se pueden administrar por cualquier vía, incluyendo la vía intravenosa, parenteral, oral, intramuscular, intratecal o como un aerosol. El modo de administración dependerá del efecto deseado. Un experto en la técnica conocerá fácilmente la mejor vía de administración para un tratamiento particular de acuerdo con la presente invención. La dosificación apropiada dependerá de la vía de administración y del tratamiento indicado, y puede determinarlo fácilmente un experto en la técnica en vista de los protocolos de tratamiento actuales.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el inmunoc conjugado de la presente descripción y/o cualquier agente citotóxico como ingredientes activos pueden prepararse de acuerdo con las técnicas de composición farmacéuticas convencionales. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a Ed. (1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Típicamente, las cantidades eficaces de los ingredientes activos se mezclarán con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, intravenosa, oral, parenteral, intratecal, transdérmica, o por aerosol.

Para la administración oral, el inmunoc conjugado y/o el agente citotóxico se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar, fusiones, polvos, suspensiones o emulsiones. En la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes suspensores, y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas o comprimidos). Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan las formas de dosificación unitaria orales más ventajosas, en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden estar cubiertos con azúcar o con recubrimiento entérico por técnicas de referencia. El agente activo debe ser estable para el paso a través del tracto gastrointestinal. Si fuera necesario, se pueden utilizar agentes adecuados para el paso estable, y pueden incluir fosfolípidos o derivados de lecitina descritos en la bibliografía, así como liposomas, micropartículas (incluyendo microsferas y macrosferas).

Para la administración parenteral, el inmunoc conjugado y/o agente citotóxico se puede disolver en un vehículo farmacéutico y se administra como una solución o una suspensión. Son ilustrativos de vehículos adecuados el agua, solución salina, solución de fosfato tampón (PBS), soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol. O aceites de origen animal, vegetal o sintético. El vehículo también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y similares. Cuando el agente no conjugado y/o inmunoc conjugado y/o agente citotóxico se van a administrar por vía intracerebroventricular o intratecal, también se pueden disolver en líquido cefalorraquídeo.

Las dosificaciones que se administran a un sujeto se pueden especificar como la cantidad, por área de superficie del sujeto (que incluye seres humano así como animales no humanos). La dosis se puede administrar a tal sujeto en cantidades, preferentemente, pero no exclusivamente desde aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m², incluyendo aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 200 mg/m² y aproximadamente 250 mg/m². En ciertas realizaciones, en las que el inmunoc conjugado se administra en combinación con un agente citotóxico, la dosis de inmunoc conjugado puede ser menor. Los inmunoc conjugados se administran adecuadamente de una vez o sobre una serie de tratamientos. En un régimen de múltiples dosis, estas cantidades se pueden administrar una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada seis semanas. Las dosis de carga con una sola dosis alta o, de manera alternativa, las dosis más bajas que se administran enseguida una tras la otra, seguidas por dosificaciones separadas por intervalos largos constituyen una realización preferida de la presente invención. En una realización preferida, la planificación de las dosificaciones se ajustan para un sujeto de forma que pase el tiempo suficiente antes de un segundo y/o cualquier tratamiento posterior de forma que se haya metabolizado la dosis inicial sustancialmente, pero la cantidad de inmunoc conjugado presente en el sistema del paciente aún inhibe, retrasa y/o previene el crecimiento de un tumor. Un regimen ejemplar de "dosis única repetida" comprende la administración de

una dosis inicial de inmunoc conjugado de aproximadamente 200 mg/m² una vez cada tres semanas. Alternativamente, una dosis inicial alta puede estar seguida por una dosis de mantenimiento bisemanal de aproximadamente 150 µg/m². Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. La dosificación puede variar dependiendo de si se administran con fines terapéuticos o preventivos, el curso de cualquier terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente de dirección/inmunoc conjugado, y a discreción del facultativo.

En una realización, el inmunoc conjugado se administra con uno o más agentes citotóxicos adicionales, que es eficaz para tratar la misma enfermedad pero que está, cuando se administra sin el inmunoc conjugado, limitado a menudo en su eficacia debido a CAM-DR; por ejemplo, se puede administrar un inmunoc conjugado específico CD138 en combinación con dexametasona. En particular, la dexametasona se administra a un paciente que necesita la misma en una cantidad eficaz dos horas antes de administrarse el inmunoc conjugado.

Por lo tanto, el inmunoc conjugado de la presente descripción también puede administrarse particularmente en regímenes de tratamiento con quimioterapia de alta dosis (preferentemente, melfalán, melfalán/prednisona (MP), vincristina/doxorubicina/dexametasona (VAD), doxorubicina/vincristina, dexametasona liposómicas (DVd), ciclofosfamida, etopósido/dexametasona /citarabina, cisplatino (EDAP)), trasplantes de células madre (por ejemplo trasplantes autólogos de células madre, y/o trasplante de células madre mini-alogénico (no-mieloablato)), esteroides (por ejemplo, corticosteroides, dexametasona, talidomida/dexametasona, prednisona, melfalán/prednisona), terapia de soporte (por ejemplo, bifosfonatos, factores de crecimiento, antibióticos, inmunoglobulina intravenosa, radioterapia de dosis baja, y/o intervenciones ortopédicas), THALOMID (talidomida, Celgene), VELCADE (bortezomib, Millennium), y/o REVLIMID (lenalidomida) (Chelgene Corporation) y/o otros tratamientos del mieloma múltiple incluyendo la radioterapia.

Si un inmunoc conjugado de la presente descripción se administra en combinación con agentes citotóxicos, las dosis y regímenes anteriores a menudo se mantienen. Sin embargo, si el inmunoc conjugado y el agente citotóxico se co-administran, se prefieren, en ciertas realizaciones, dosis menores de cada uno de estos componentes terapéuticos. En tal situación el inmunoc conjugado se puede administrar a dosis desde aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m², incluyendo aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², mientras que el agente citotóxico se administra a dosis como las que se recomiendan cuando se administran solos.

Los datos experimentales que se obtienen basándose en el cultivo celular (Fig. 7) y los experimentos con ratones (Fig. 8 a 11), se confirmó más con experimentos que además apoyaban estos hallazgos.

La patogénesis del mieloma múltiple implica la unión de las células de mieloma, por medio de las moléculas de adhesión de superficie celular, no solo a las células del estroma de la médula ósea (BMSC) sino también a la matriz extracelular (ECM). Esta unión desencadena, y por tanto puede ser el responsable en último término, del crecimiento celular del mieloma múltiple, la resistencia a los fármacos y la migración de las células del MM en el medio de la médula ósea (Munshi et al. 2008). En particular, la adhesión de células de mieloma múltiple a la ECM por medio de sindecan-1 (CD138) al colágeno tipo I, induce la expresión de la metaloproteínasa de la matriz 1, promoviendo de esta forma la resorción ósea y la invasión tumoral (Hideshima et al. 2007). Las interacciones entre las células de mieloma múltiple y el microambiente de la médula ósea producen la activación de una cascada proliferativa pleiotrópica y anti-apoptótica.

Después del asentamiento de las células de mieloma múltiple en el compartimento del estroma de la médula ósea, la adhesión entre las células del mieloma múltiple y las BMSC regula positivamente muchas citocinas tales como la interleucina-6 (IL-6) y factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) que tienen actividades angiogénicas y de crecimiento tumoral (Hideshima et al. 2007). Las cascadas de señalización iniciadas por estas citocinas eventualmente da como resultado la resistencia de las células del MM a los agentes terapéuticos convencionales (Anderson et al. 2000; Hideshima et al. 2006).

La eficacia in vivo de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 contra las células tumorales positivas a CD138 en presencia de médula ósea humana se analizó en un modelo de ratón y los resultados de este análisis se muestran en la Fig. 13. Las figuras muestra que ambos, HICL y UICL funcionan bien en este ambiente. El aumento en el nivel de ShuL-6R que se pueden utilizar, en este modelo, como un parámetro de crecimiento celular de MM, ambos se suprimieron con estos inmunoc conjugados.

De acuerdo con la presente descripción, el MM se trata de la siguiente manera, con el uso de BT062 como ejemplo. Este ejemplo no pretende limitar la presente descripción de ninguna manera, y un experto en la técnica podría determinar fácilmente otro inmunoc conjugado o sistemas basados en nBT062 que estén dentro del ámbito de la presente descripción y otros regímenes de tratamiento que se podrían utilizar para el tratamiento de enfermedades tales como la MM.

Debido a la expresión selectiva de CD138 en las células MM del paciente por medio de las células accesibles de la corriente sanguínea, la especificidad de nBT062 y la estabilidad de BT062 en la corriente sanguínea, el BT062 elimina la toxicidad sistémica del DM4 y proporciona una oportunidad de dirigir el suministro de la molécula efectora

DM4. Los inmunoconjugados de esta descripción proporcionan un medio para la administración eficaz de las moléculas efectoras a los sitios celulares en el que las moléculas efectoras se pueden liberar de los inmunoconjugados.

- 5 Se administran uno o más agentes citotóxicos en las dosificaciones y formas de dosificación y de acuerdo para establecer protocolos de tratamiento para estos agentes citotóxicos a un individuo que también se trata con un inmunoconjugado de la presente descripción.

10 En particular, un paciente se somete a un regimen de tratamiento utilizando una dosificación apropiada de BT062, por ejemplo, 100 mg/m² de acuerdo con la presente invención a ciertos intervalos, por ejemplo inicialmente diariamente y luego semanalmente. Doce horas tras cada tratamiento semanal con el inmunoconjugado, el paciente se trata también con melfalán, por ejemplo, administrando una dosificación oral de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, se administra al paciente una píldora registrada bajo la marca registrada ALKERAN).

15 De acuerdo con la presente invención, en tumores sólidos particulares se pueden tratar también de la siguiente manera utilizando BT062 como ejemplo. Este ejemplo no pretende limitar la presente invención de ninguna manera, y un experto en la técnica podría fácilmente determinar otros inmunoconjugados de la presente invención y otros regímenes de tratamiento que podrían utilizarse para el tratamiento de tumores sólidos. El tumor se trata primero para reducir el tamaño del tumor, por ejemplo con radioactividad. Posteriormente a la administración de
 20 BT062 se continúa con una dosis de un agente citotóxico, por ejemplo, en forma de un píldora de ALKERAN, proporciona un medio altamente eficaz para eliminar las células cancerosas residuales. La administración del inmunoconjugado permite la dirección específica de estas células residuales y libera las moléculas efectoras en el sitio diana. El inmunoconjugado no solo supera o disminuye la CAM-DR con respecto a su propia actividad, sino que debido al hecho de que inhibe la adhesión de las células del mieloma múltiple a las células del estroma, el
 25 inmunoconjugado también supera o disminuye la CAM-DR para otros agentes citotóxicos. La alta eficacia del inmunoconjugado permite, en realizaciones preferidas, un regimen de dosis única.

La presente invención se describe además en referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración.

30 Se utilizan técnicas de referencia bien conocidas en la técnica o las técnicas descritas específicamente a continuación.

35 **Materiales y Métodos**

Construcción de anticuerpo quimérico (cB-B4; nBT062)

B-B4

40 Se utilizó el anticuerpo murino B-B4 que se había caracterizado previamente (Wijdenes et al., Br J Haematol., 94 (1996), 318).

Clonación y expresión de B-B4 y cB-B4/nBT062

45 Se llevaron a cabo técnicas de ADN recombinante de referencia como se describe en detalle en los libros de texto, por ejemplo en J. Sambrook; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 2nd Ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, o como se recomienda por las instrucciones del fabricante en los casos en el que se utilizan kits. La clonación PCR y la modificación de las regiones variables de ratón se han llevado a cabo utilizando metodología PCR de referencia. Se utilizaron los cebadores indicados en las respectivas secciones de resultados.

50 *Expresión de cB-B4/nBT062*

Las células COS en crecimiento exponencial de, cultivados en DMEM suplementado con un 10% de FCS, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina se recolectaron por tripsinización y
 55 centrifugación y se lavaron en PBS. Las células se re-suspendieron en PBS a una concentración final de 1 x 10⁷ células/ml. Se transfirieron 700 µl de la suspensión de células COS a una cubeta Gene Pulser y se mezclaron con el vector ADN de expresión de cadena ligera kappa y cadena pesada (10 µg de cada o 13 µg de Suprvector). Las células se electroporaron a 1900 V, 25 µF utilizando el Pulsador Bio-Rad Gene. Las células transformadas se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS libre de gamma-globulinas, 580 µg/ml de L-glutamina, 50
 60 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina durante 72 h antes de que se recolectaran los sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo.

Captura ELISA para medir los niveles de expresión de cB-B4/ nBT062

65 Se recubrieron placas de 96 pocillos con alícuotas de 100 µl de 0,4 µg/ml de anticuerpo IgG anti-humano de cabra

5 diluido en PBS (4 °C, una noche). Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS + 0,1% de Tween-20). Se bloquearon los pocillos con 0,2% de BSA, 0,02% de Tween-20 en PBS, antes de la adición de 200 µl de sobrenadantes de cultivo celular que contenían los anticuerpos segregados (incubación a 37 °C durante una hora). Los pocillos se lavaron seis veces con el tampón de lavado, antes de la detección de anticuerpo unido con el conjugado de peroxidasa de la cadena ligera kappa anti-humano de cabra.

Purificación de cB-B4 / nBT062 de los sobrenadantes del cultivo celular

10 El anticuerpo cB-B4 se purificó de los sobrenadantes de células COS 7 transformadas utilizando el kit Protein A ImmunoPure Plus (Pierce, Rockford, IL), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Ensayo de unión y competición de cB-B4

15 Se llevó a cabo el análisis de actividad de unión de B-B4 y cB-B4 al CD138 utilizando el kit sCD138 Diaclone (Besançon, Francia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, considerando los cambios descritos en la sección de resultados.

Preparación de ARN y síntesis de ADNc

20 SE cultivaron células de hibridoma B-B4 y se procesaron utilizando el kit Qiagen Midi (Hilden, Alemania) para aislar el ARN siguiendo el protocolo del fabricante. Se sometieron aproximadamente 5 µg de ARN B-B4 a transcripción inversa para producir ADNc B-B4 utilizando el kit de síntesis de 1ª cadena de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo del fabricante.

Clonación del ADNc de inmunoglobulina B-B4

30 El ADNc de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) se amplificó por PCR utilizando el cebador IgH MHV7 (5'-ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG-3') [SEC ID NO:3] y el cebador de región constante de IgG1 MHCG1 (5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3') [SEC ID NO:4]. De manera similar, se amplificó la cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) utilizando los tres cebadores I κ diferentes MKV2 (5'-ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTG-3') [SEC ID NO:5], MKV4 (5'-ATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTCTTG-3') [SEC ID NO:6] y MKV9 (5'-ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') [SEC ID NO:7], cada uno en combinación con el cebador MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3') [SEC ID NO:8]. Todos los productos de la amplificación se ligaron directamente en el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Se seleccionaron las bacterias *E. coli* TOP 10 transformadas con las construcciones del vector pCR2.1 ligado en placas de agar LB-ampicilina-Xgal. Se inocularon cultivos a pequeña escala con colonias blancas únicas, se cultivaron una noche y los plásmidos se aislaron utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de la secuencia de ADNc

45 Los plásmidos se secuenciaron utilizando el kit de reacción lista para secuenciación en ciclo BigDye Termination v3.0 (ABI, Foster City, CA) Cada plásmido seleccionado se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores 1210 y 1233 ciclados en el aparato PCR GeneAmp9600. El análisis de secuencia electroforética se realizó en el secuenciador capilar ABI.

50 El ciclo de RT-PCR completo, la clonación y el análisis de secuencia de ADN se repitió para obtener tres grupos completamente independientes de información de secuencia para cada cadena de inmunoglobulina.

Secuencia del ADN B-B4 V κ

55 La síntesis de la 1ª cadena se llevó a cabo en tres reacciones independientes. Los productos PCR que se generan utilizando cebadores MKC y MKV2 (secuencias dadas anteriormente) se ligaron el vectores pCR2.1-TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones de cada grupo de las reacciones RT-PCR se secuenciaron en ambas direcciones. La secuencia del producto cebado con MKV2 era altamente similar a las transcripciones kappa estériles que se originaban del compañero de fusión de mieloma tal como MOPC-21, SP2 y Ag8 (Carroll et al., Mol Immunol., 25 (1988), 991; Cabilly et al., Gene, 40 (1985); 157) y por lo tanto se ignoraron.

60 Los productos PCR que utilizaron MKC con cebadores MKV4 y MKV9 eran similares a los otros y se diferenciaban solo en las posiciones oscilantes con el cebador de la secuencia directora.

Secuencia del ADN B-B4 V H

65 La síntesis de la 1ª cadena se llevó a cabo en tres reacciones independientes y se clonaron los productos PCR y

secuenciaron de cada producto de 1ª cadena. Se secuenciaron cinco clones de cada 1ª cadena.

Construcción de vectores de expresión cB-B4 quiméricos

5 La construcción de los vectores de expresión quiméricos supone añadir una secuencia directora adecuada a VH y V κ , precedido por un sitio de restricción *Bam*HI y una secuencia Kozak. La secuencia de consenso Kozak es crucial para la traducción eficaz de una secuencia de región variable. Define el codón AUG correcto a partir del que el ribosoma puede comenzar la traducción, y la única base más crítica es la adenina (o menos preferible, una guanina) en la posición -3, corriente arriba del inicio AUG. La secuencia directora se selecciona como la secuencia más similar en la base de datos Kabat (Kabat *et al.*, NIH National Technical Information Service, 1991). Estas adiciones se codifican con los cebadores directos (Dir) (que tienen ambos la secuencia 5'-AGAGAAGCTT**GCCGCCACCATGATT-GCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCC**-3' [SEC ID NO: 9]; el sitio de restricción está subrayado, la secuencia Kozak está en negrita). Además, la construcción de los vectores de expresión quimérica suponen la introducción de un fragmento 5' de la región constante humana gamma 1, hasta un sitio de restricción *Apal* natural, contiguo al extremo 3' de la región J de B-B4 y, para la cadena ligera, la adición de un sitio donante de corte empalme y un sitio *Hind*III. La secuencia donante de corte empalme es importante para el acoplamiento correcto en fase de la región variable a su región constante correcta, así el corte empalme fuera del intrón V:C. El intrón kappa + CK se codifican en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia B-B4 V κ . De manera similar la CH4 gamma se codifica en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia VH B-B4.

Los genes VH y V κ B-B4 primero se analizaron cuidadosamente para identificar cualquier sitio donante de corte empalme, sitios aceptores de corte empalme, secuencias Kozak y la presencia de cualquier sitio de restricción de sub-clonaje extra que pudiera más tarde interferir con la subclonación y/o expresión del anticuerpo completo funcional. Un sitio *Hind*III no deseado se encontraba en la secuencia V κ que era eliminado necesariamente por mutagénesis dirigida al sitio por medio de PCR sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Para estas reacciones se utilizaron los cebadores oligonucleotídicos BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEC ID NO:10] y BT04 (5'-CCACCGAACGTCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3') [SEC ID NO:11] y se llevó a cabo la mutagénesis de acuerdo con el protocolo del kit de mutagénesis Quickchange de Stratagene (La Jolla, CA).

Cebadores de quimerización de cadena Kappa

La secuencia directora B-B4 V κ no ambigua, independiente de la secuencia de cebador PCR, se alinearon con las secuencias directoras murinas de la base de datos Kabat. La coincidencia más cercana para la directora VH B-B4 era VK-10 ARS-A (Sanz *et al.*, PNAS, 84 (1987), 1085). Se preveía que esta secuencia directora se cortaba correctamente por el algoritmo SignalP (Nielsen *et al.*, Protein Eng, 10 (1997); 1). Los cebadores CBB4Kdir (véase anteriormente) y g2258 (5'-CGCGGGATCCACTCACGTTTGGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC-3' [SEC ID NO:12]; El sitio de restricción está subrayado) se diseñaron para generar un producto PCR que contenía esta región directora B-B4 V κ completa, y los sitios de restricción terminales *Hind*III y *Bam*HI, para la clonación en el vector de expresión pKN100. El cebador directo CBB4K, introduce un sitio de restricción *Hind*III, un sitio de inicio de la traducción Kozak y la secuencia directora VK-19 ARS-A. El cebador inverso g2258 introduce un sitio de corte empalme y un sitio de restricción *Bam*HI. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *Hind*III/*Bam*HI de pKN100.

Cebadores de quimerización de cadena pesada

La secuencia directora B-B4 VH no ambigua, independiente de la secuencia de cebador PCR, se alineó con las secuencias directoras murinas de la base de datos Kabat. La coincidencia más cercana para la directora B-B4 VK era VH17-1A (Sun *et al.*, PNAS, 84 (1987), 214). Se preveía que esta secuencia directora se cortaría correctamente por el algoritmo SignalP. Los cebadores cBB4Hdir (véase anteriormente) y g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGA-GACGGTGACTGAGGTTCC-3' [SEC ID NO:13]; el sitio de restricción está subrayado) se diseñaron para generar un producto PCR que contenía la directora VH17-1A, la región B-B4 VH, y los sitios de restricción terminales *Hind*III y *Apal*, para la clonación en el vector de expresión pG4D200. El cebador directo cBBHdir introduce un sitio de restricción *Hind*III, un sitio de inicio de la traducción Kozak y la secuencia directora VH17-1A. El cebador inverso g22949 introduce el extremo 5' de la región 4 C gamma y un sitio de restricción *Apal* natural. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *Hind*III/*Apal* de pG4D200, dando como resultado el vector pG4D200cBB4.

Producción de anticuerpo cBB4

60 Un vial de células COS 7 se descongeló y se cultivó en DMEM suplementado con un 10% de suero fetal clon I con antibióticos. Una semana más tarde, las células (0,7 ml a 10⁷ células/ml) se electroporaron con pG4D200cBB4 más pKN100cBB4 (10 μ g de ADN cada uno) o sin ADN. Las células se colocaron en placas con 8 ml de medio de cultivo durante 4 días. Se repitió la electroporación siete veces.

65

Detección de anticuerpo quimérico

5 Para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes de células COS 7 se utilizó un ELISA de tipo sándwich. Las células COS 7 que se transformaron transitoriamente segregaban aproximadamente 6956 ng/ml de anticuerpo (datos no mostrados).

Actividad de unión de cB-B4

10 Para ensayar la actividad de unión de cB-B4 en los sobrenadantes del cultivo de COS 7, se utilizó el kit sCD138 Diaclone, un ELISA de tipo sándwich de fase sólida. Se habían revestido pocillos de las tiras de microtitulación proporcionadas, con un anticuerpo monoclonal específico para sCD138. Durante la primera incubación, se incubaron juntos simultáneamente sCD138 y el anticuerpo B-B4 biotinilado (bio-B-B4) con una serie de diluciones de anticuerpo de ensayo sin marcar (B-B4 o cB-B4).

15 Las concentraciones de bio-B-B4 en este ensayo se redujeron con el fin de obtener la competición con bajas concentraciones o anticuerpo sin marcar (la concentración de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo celular eran de otra manera demasiado bajas para obtener la suficiente competición). Los resultados de este ensayo revelan que ambos anticuerpos tiene la misma especificidad para CD138 (datos no mostrados).

Purificación de cB-B4

20 El B-B4 quimérico se purificó de los sobrenadantes COS 7 utilizando el kit Protein A ImmunoPure Plus (Pierce), según las recomendaciones del fabricante (datos no mostrados).

Determinación de K_D : Comparación nBT062 / BB4*Purificación de CD 138 soluble*

30 El antígeno soluble CD138 de sobrenadante del cultivo celular U-266 se purificó por FPLC utilizando la columna "HP activada-NHS HiTrap" de 1 ml acoplada con B-B4. Es sobrenadante del cultivo celular se cargó en tampón PBS pH 7,4 en la columna y después en antígeno CD138 se eluyó con tri-etilamina 50 mM pH 11 en fracciones de 2 ml. El CD138 eluido se neutralizó inmediatamente con 375 μ l de Tris-HCl 1 M para evitar daños estructurales y/o funcionales.

Biotinilación de CD138

35 Se utilizó Sulfo-NHS-LC (Pierce) para marcar el CD138. Las biotinas activadas- NHS reaccionan eficazmente con grupos amino primarios tipo restos de lisina en tampones a pH 7-9 para formar enlaces amida estables.

40 Para la biotinilación de CD138, se desalaron 50 μ l de CD138 utilizando columnas centrífugas desaladoras de proteínas (Pierce). El reactivo de biotinilación (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) se disolvió en H₂O desionizada enfriada en hielo a una concentración final de 0,5 mg/ml. El reactivo de biotinilación y la solución del reactivo de captura se mezclaron teniendo un exceso molar de 12 veces de reactivo de biotinilación en comparación con el reactivo de captura (60 pmol de CD138 a 600 pmol de reactivo de biotinilación) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente mientras se agitaba el vial cuidadosamente. El reactivo de biotinilación no unido se retiró utilizando las columnas de desalado de proteínas.

Inmovilización de bCD138

50 La microplaca detectora (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) que se utilizó en el ensayo BIACORE se diseñó para unirse a moléculas biotiniladas para los análisis de interacción en sistemas BIACORE. La superficie consiste en una matriz de dextrano carboximetilada pre-inmovilizada con estreptavidina y lista para la captura de alta afinidad de ligando biotinilados. La inmovilización de bCD138 se llevó a cabo en la microplaca detectora SENSOR CHIP SA utilizando una tasa de flujo de 10 μ l/min por inyección manual. La superficie de la microplaca se acondicionó con tres inyecciones sucesivas de 1 minuto de NaCl 1M en 50 mM de NaOH. Luego se inyectó el CD138 biotinilado durante 1 minuto.

Determinación de K_D de diferentes anticuerpos utilizando BIACORE

60 El software BIACORE C utiliza máscaras pre-definidas, denominadas "Asistentes" para diferentes experimentos en el que solo se pueden cambiar ciertos ajustes. Como el BIACORE C se desarrolló originalmente para medir concentraciones, no hay asistente diseñado para llevar a cabo mediciones de afinidad. Sin embargo, con los ajustes adecuados, el asistente para "unión no específica" se podría utilizar para medir las constantes de la tasa de afinidad y por lo tanto utilizarse para la determinación de K_D . Con este asistente, se midieron dos células en flujo y la fase de disociación se fijó a 90 s llevando a cabo la "Regeneración 1" con el tampón de ejecución BIACORE. La "Regeneración 2" que es equivalente a la regeneración real se llevó a cabo con 10 mM de Glicina-HCl pH 2,5. Tras

esta etapa, el ligando CD138 estaba en su estado competente de unión de nuevo. Durante todo el procedimiento se utilizó HBS-EP como tampón de ejecución y dilución. Para determinar la unión de los diferentes anticuerpos (~ 150 kDa) contra el CD138, se analizaron la asociación y la disociación a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,13 nM). Las constantes del equilibrio de disociación se determinaron calculando las constantes de tasa k_d y k_a . A continuación, los valores de K_D de los análisis se calcularon por el cociente de k_d y k_a con el software BIAevaluation. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Análisis comparativo de los valores de K_D de nBT062 y B-B4. Se dan los valores de desviación estándar para los valores medios de K_D .

Anticuerpo	Afinidad	
	K_D (nM)	media K_D (nM)
nBT062	1,4	1,4 +/- 0,06
	1,4	
	1,5	
B-B4	1,7	1,6 +/- 0,06
	1,7	
	1,6	
nBT062-SPDB-DM4	1,9	1,9 +/- 0,00
	1,9	
	1,9	
B-B4-SPP-DM1	2,6	2,6 +/- 0,06
	2,7	
	2,6	

Conclusión

Los valores medios de K_D para cada anticuerpo se calcularon en tres experimentos independientes. Los resultados muestran que en todas las mediciones nBT062 muestra valores de K_D ligeramente menores en comparación con el B-B4 (los valores medios de la K_D eran 1,4 y 1,6 nM, respectivamente).

Preparación de inmunoconjugados

nBT062-DM1 y huC242-DM1

El maitansinoide DM1 que contiene tiol se sintetizó a partir del producto de fermentación ansamitocina P-3, como había descrito anteriormente Chari (Chari, et al., Cancer Res. 1 (1992), 127). La preparación de C242 humanizado (huC242) (Roguska et al., PNAS, 91 (1994), 969) se había descrito previamente. Los conjugados de fármacos-anticuerpos se prepararon como se había descrito previamente (Liu et al., PNAS, 93 (1996), 8618). Una media de 3,5 moléculas de DM1 se unieron por molécula de anticuerpo.

nBT062-DM4

El BT062 es un conjugado fármaco-anticuerpo compuesto por el fármaco maitansinoide citotóxico, DM4, unido por puentes disulfuro por medio de un enlazador al anticuerpo monoclonal quimerizado nBT062. Los maitansinoides son anti-mitóticos que inhiben la polimerización de la tubulina y el ensamblaje de microtúbulos (Remillard et al., Science 189 (1977), 1002). Las representaciones química y esquemática de BT062 (nBT062-DM4) se muestran en las FIG. 1 y 2.

Síntesis de DM4

El DM4 se prepara a partir del derivado maitansinol bien conocido (Kupchan et al., J. Med. Chem., 21 (1978), 31). El maitansinol se prepara por escisión reductora del resto éster del producto de fermentación microbiana, ansamitocina P-3, con hidruro de litio trimetoxialuminio. (Véase la FIG. 3).

El DM4 se sintetiza por acilación del maitansinol con N-metil-N-(4-metilditiopentanoil)-L-alanina (cadena lateral del DM4) en presencia de ciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de zinc para dar al maitansinoide que contiene disulfuro DM4-SMe. El DM4-SMe se reduce con ditiotreitól (DTT) para dar el maitansinoide DM4 que contiene tiol deseado (véase la FIG. 4 para el diagrama de flujo de proceso del DM4).

Inmunoconjugado BT062

El procedimiento para la preparación de nBT062-DM4 se perfila en la FIG. 5. El anticuerpo nBT062 se modifica con N-succimidil- 4-(2-piridiltio) butirato (enlazador SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El DM4 se mezcla con el anticuerpo modificado a una concentración en exceso de equivalentes de grupos ditiopiridilo. El conjugado BT062 se

forma por una reacción de intercambio de disulfuros entre el grupo tiol de DM4 y los grupos ditiopiridilo introducidos en el anticuerpo por medio de un enlazador. La purificación por cromatografía y diafiltración elimina los reactantes de bajo peso molecular (DM4) y los productos de reacción (tiopiridina), así como los agregados de anticuerpo conjugado, para producir la sustancia farmacológica en bruto.

5

Análisis FACS y ensayos de citotoxicidad WST

Análisis FACS

10 Las células OPM-2 son células plasmáticas de líneas celulares de leucemia que muestran una alta expresión de CD 138. Se incubaron las células OPM-2 con nBT062, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (indicadas en la FIG. 6). Las células se lavaron u el anticuerpo unido a CD138 o los conjugados se detectaron utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en el análisis FACS. La media de fluorescencia medida en estos experimentos se representó contra la concentración de anticuerpo.

15

Ensayos de viabilidad celular

20 Las células MOLP-8 CD138⁺ se sembraron en placas de fondo plano a 3000 células por pocillo, Las células BJAB CD138⁻ de control se sembraron a 1000 células por pocillo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (como se indica en la FIG. 7) durante cinco días. Se añadió el reactivo WST (sal de tetrazolio soluble en agua, ROCHE) con el fin de medir la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). El reactivo se incubó durante 7,5 horas sobre las células MOP-8 y durante 2 h sobre las células BJAB. La fracción de células supervivientes se calculó basándose en las densidades ópticas medidas en un lector de placas utilizando procedimientos de referencia.

25

Conclusión

30 La unión de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1o nBT062 se analizó por FACS. Las células OPM-2 CD138⁺ como células diana se incubaron con nBT062 o inmunoconjugados y se detectaban las moléculas unidas a las células utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. En la FIG. 6, las fluorescencias medias como una medida de la cantidad de anticuerpos unidos a células se representa contra las concentraciones diferentes de los anticuerpos o conjugados. Los resultados muestran que nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 muestran características de unión muy similares. Además los resultados sugieren fuertemente que las características de unión del anticuerpo no conjugado no se afecta por las toxinas conjugadas.

35

40 En los ensayos de viabilidad celular, se analizó la actividad citotóxica del anticuerpo contra células diana MOLP-8 CD138⁺ y contra las células control de linfoblastoma B BJAB CD138⁻. Ambas líneas celulares se sembraron en placas de fondo plano y se incubaron con concentraciones progresivas de los inmunoconjugados. El anticuerpo no conjugado se utilizó como un control. Se analizó la actividad citotóxica cinco días tras la adición de los inmunoconjugados utilizando el reactivo WST con el fin de medir la viabilidad celular. En la FIG. 7 (A) - (C), la fracción de células supervivientes con respecto a las células control tratadas con un vehículo de control se representa contra las concentraciones en aumento de inmunoconjugados. Los resultados muestran que la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 contra células MOLP-8 sin muy similares. Como se esperaba. Las células BJAB CD138⁻ de control no se destruyeron por los inmunoconjugados, indicando que todos los inmunoconjugados actúan por medio de unión específica celular al CD138. En los experimentos de competición, en el que las células MOLP-8 se pre-incubaron con exceso molar de nBT062 no conjugado. La pre-incubación sustancialmente bloquea la citotoxicidad de nBT062-SPDB-DM4, proporcionando más evidencias de que los inmunoconjugados destruyen las células por medio de unión específica al CD138 en la superficie celular (FIG. 7(D)).

50

Experimentos de xenoinjertos en ratón

55 Para evaluar la importancia de la dirección a CD138 sobre la actividad anti-tumoral o los conjugados anticuerpo-maitansinoide de una versión química humana del anticuerpo B-B4, nBT062, se llevaron a cabo los xenoinjerto en ratón. Se prepararon dos versiones de conjugados nBT062-maitansinoide que podían diferir en la estabilidad química de sus enlaces disulfuro (nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4). La actividad anti-tumoral de estos conjugados anticuerpo-fármaco se comparó con la actividad del conjugado B-B4-SPP-DM1 (que comprende el anticuerpo parental de ratón), así como el maitansinoide libre no conjugado (DM4), el anticuerpo NATIVO sin modificar nBT062, y un conjugado maitansinoide-IgG1 no dirigido (irrelevante). Los conjugados se evaluaron en un modelo de xenoinjerto positivo CD138 (MOLP-8) de mieloma múltiple humano en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

60

65 En estos ratones, se establecieron tumores subcutáneos (ratones SCID CB.17 hembras) por inoculación con suspensiones celulares MOLP-8. El tratamiento con una inyección intravenosa en una única embolada se llevó a cabo cuando los volúmenes alcanzaban la media de 113 mm³. Se controlaban los cambios en el tamaño tumoral y el

peso corporal dos veces por semana. Los experimentos se llevaron a cabo durante 68 días tras la inoculación celular del tumor.

Experimentos A de xenoinjerto en ratón

5 **Ratones**

Los ratones SCID CB.17 hembras, de cinco semanas de edad, se obtuvieron en Charles River Laboratories.

Líneas celulares tumorales humanas

10 La línea celular de mieloma múltiple humano, MOLP-8, se suministró por la ATCC. Las células MOLP-8, que expresan el antígeno CD138 en su superficie celular y desarrollan tumores de xenoinjerto en ratones SCID, se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 4 mM de L-glutamina (Biowhittaker, Walkersville, MD), un 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah) y un 1% de estreptomycin/penicilina, a 37 °C en una atmósfera
15 humidificada que contenía un 5% de CO₂.

PARTE I

Crecimiento tumoral en ratones

20 Cada ratón se inoculó con 1×10^7 células MOLP-8 por vía subcutánea en el área bajo la escápula derecha. El volumen total era de 0,2 ml por ratón, en los que la tasa de medio libre de suero respecto a matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) era de 1/1 (v/v). Antes del tratamiento, los tumores xenoinjertados se controlaron diariamente y se les permitió que se establecieran. El volumen tumoral alcanzó aproximadamente 113 mm³ aproximadamente a los 11
25 días tras la inoculación celular del tumor. La tasa de captación tumoral de los ratones SCID CB.17 fue del 100%.

Once días después de la inoculación celular del tumor, se seleccionaron 42 ratones basándose en los volúmenes tumorales y los pesos corporales. El volumen del tumor estaba en un intervalo de 68,2 a 135,9 mm³. Los 42 ratones se dividieron aleatoriamente en siete grupos (A-G) de seis animales cada uno, basándose en el volumen tumoral.

30 Cada uno de los seis ratones del Grupo A recibieron 200 µl de PBS como vehículo control. Cada ratón del grupo B recibió 13,8 mg/kg de anticuerpo desnudo. Esta dosis es la equivalente a la cantidad de compuesto anticuerpo nBT062 en 250 µg/kg de maitansinoide ligado. La relación de pesos moleculares de maitansinoides al anticuerpo nBT062 en una molécula de conjugado es aproximadamente de 1/55. Cada ratón del grupo C recibió 250 µg/kg de
35 DM4. Cada ratón del Grupo D recibió 250 µg/kg de huC242-DM4. Los ratones de los grupos E, F y G recibieron 250 µg/kg de nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1 cada uno, respectivamente.

40 Todos los agentes se administraron por vía intravenosa como una inyección en una embolada única por medio de una vena lateral del rabo con una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 27, ½ pulgada. Antes de la administración, las soluciones madre de anticuerpo nBT062, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se diluyeron con PBS estéril hasta concentraciones de 2 mg/ml, 28,1 µg/ml y 28,1 µg/ml, respectivamente, de forma que el volumen inyectado a cada ratón era entre 120-220 µl.

PARTE II

45 En un segundo grupo de experimentos, se inyectaron por vía subcutánea las células MOLP-8 ($1,5 \times 10^7$ células por ratón), suspendidas en una mezcla 50:50 de medios libres de suero y matrigel, en el área bajo la escápula derecha en 100 µl. Los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 80 mm³ el día 11 y la media de los controles era aproximadamente de 750 mm³ el día 25, tras la inoculación celular. El tiempo de doblaje del tumor se estimaba en
50 4,58 días. Cada ratón del grupo de control (n = 6) recibió 0,2 ml de PBS estéril administrado en la vena lateral del rabo (i.v.) en una inyección en embolada. Todas las dosis de tratamiento se basaban en el maitansinoide conjugado. Se trataron nueve grupos (n=6) con una inyección única intravenosa de nBT062-SMCC-DM 1, nBT062-SPDB-DM4, o nBT062-SPP-DM1, cada uno a dosis de 450, 250 y 100 µg/kg. Un grupo adicional (n=6) recibió 250 µg/kg de nBT062-SMCC-DM1 en una dosificación repetida (semanalmente durante cinco semanas). Los ratones se
55 repartieron aleatoriamente en once grupos (n=6) por volumen tumoral utilizando el programa LabCat. Los volúmenes tumorales variaban de 40,0 a 152,5 mm³. Los ratones se dosificaron basándose en su peso corporal individual.

60 El tamaño tumoral se midió dos veces a la semana en tres dimensiones utilizando el Sistema LabCat (Tumor Measurement and Tracking, Innovative Programming Associated, Inc., Princeton, NJ). El volumen tumoral en mm³ se calculó utilizando la metodología descrita en Tomayko et al., Cancer Chemother. Pharmacol, 24 (1989), 148:

$$\text{Volumen} = \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura} \times 1/2$$

65 Se calculó el Log₁₀ de muerte celular con la fórmula descrita en Bissery et al., Cancer Res., 51 (1991), 4845:

$$\text{Log}_{10} \text{ destrucción celular} = (T - C) / T_d \times 3,32$$

5 en el que (T-C) o retraso de crecimiento tumoral, es el tiempo medio en días necesario para que los tumores del grupo de tratamiento (T) y el grupo de control (C), alcanzaran un tamaño predeterminado (600 mm³). T_d es el tiempo de doblaje del tumor, y 3,32 es el número de células que se doblan por logaritmo de crecimiento celular.

Resultados

10 El crecimiento tumoral en ratones individuales se muestra en las **FIG. 8 y 9**. La media (+/- DE) del crecimiento del tumor para cada grupo se muestra en la **FIG. 10**.

15 Cuando se compara con el crecimiento del tumor en los animales tratados con PBS, el tratamiento con el anticuerpo nBT062, el DM4 libre no conjugado o el conjugado no relevante no dirigido huC242-DM4 no produjeron ninguna inhibición significativa del crecimiento tumoral.

20 Los tres conjugados dirigidos contra CD138, nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1, a una dosis de 250 µg/kg producían un marcado retraso del crecimiento tumoral. Basándose en la media de volúmenes tumorales medidos en los grupos de tratamiento, el conjugado con DM4 nBT062-SPDB-DM4 era el más activo, mientras que el conjugado nBT062-SPP-DM1 mostraba un ligero aumento de actividad al compararlo con su equivalente murino B-B4-SPP-DM1 (**FIG. 10**). Los resultados obtenidos en ratones individuales muestran además que la actividad anti-tumoral obtenida con B-B4-SPP-DM1 es más heterogénea y por lo tanto menos predecible que con la medida de los ratones tratados con nBT062-SPP-DM1. En términos de homogeneidad de actividad anti-tumoral, el otro conjugado que utiliza nBT062 como anticuerpo dirigido nBT062-SPDB-DM4 se comportaba de forma similar a nBT062-SPP-DM1.

25 No se observó una reducción de peso en ningún grupo de tratamiento sugiriendo que los tratamientos eran bien tolerados.

Conclusión

30 Los resultados de los tres conjugados dirigidos contra CD138 en los animales de experimentación demuestran la importancia del suministro dirigido para la actividad anti-tumoral. Mientras los conjugados con maitansinoide de los anticuerpos nBT062 quimérico humano y el B-B4 murino muestran una actividad significativa como se mide por el log de destrucción celular, no había un impacto significativo sobre el crecimiento tumoral con el DM4 sin conjugar, el anticuerpo huBT062 nativo sin modificar, o un conjugado no dirigido de control (huC242-DM4).

40 El inmunconjugado preparado a partir del anticuerpo quimérico de ser humano, nBT062-SPP-DM1, daba una actividad anti-tumoral ligeramente mayor que el conjugado preparado de su equivalente murino, B-B4-SPP-DM1. Además, el tratamiento con nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4 daban como resultado respuestas más homogéneas en los ratones individuales en comparación con el tratamiento con B-B4-SPP-DM1. La alta variación de unión de B-B4-SPP-DM1 explicaba que la medición del volumen tumoral medio (+/- DE) de los xenoinjertos de mieloma múltiple humano MOLP-8 en ratones SCID CB.17 a lo largo del tiempo (días) tras la inoculación proporciona actualmente resultados relativamente mejores para el B-B4-SPP-DM1 que para el nBT062-SPP-DM1 (datos no mostrados). Esta característica de los inmunconjugados que utilizan nBT062 como anticuerpo dirigido parece ser beneficiosa especialmente para el uso terapéutico de los conjugados.

45 Por último, el más potente de los conjugados maitansinoides, después de una única administración i.v. en los modelos de xenoinjerto en ratones SCID, era el nBT062-SPDB-DM4.

50 Destrucción del testigo (ensayo de viabilidad celular)

55 Las células OPM2 CD138⁺ y Namalwa CD138⁻ se sembraron en placas de fondo redondo o en pocillos distintos o en co-cultivo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4 a concentraciones que variaban desde 1 x 10⁻⁸ a 1 x 10⁻⁹ M. La fracción de células viables se detectó utilizando el reactivo WST (sal de tetrazolio soluble en agua, ROCHE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). La fracción de células supervivientes se calculó basándose en las densidades ópticas medidas en un lector de microplacas utilizando procedimientos de referencia.

Conclusión

60 La destrucción del testigo de las células no dirigidas en estrecha proximidad (como las presentes en los pocillos de fondo redondo) a las células de mieloma múltiple en el tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 se analizó en un estudio *in vitro* en el que las células OPM2 positivas a CD138 se cultivaron en co-cultivo con células Namawla negativas a CD138 (**FIG.13**). En general, mientras que las células positivas a CD138 se eliminan eficazmente por nBT062-SPDB-DM4, las células negativas a CD138 no se ven afectadas por el conjugado. Sin embargo, en el co-cultivo en pocillos de fondo redondo, el nBT062-SPDB-DM4 también eliminaba las células negativas al antígeno en estrecha

proximidad con las células positivas al antígeno (un efecto que se denomina a menudo como destrucción del testigo). Kovtun et al. (2006) exponen el que la destrucción del testigo, mediada con maitansinoides por los conjugados, se produce solo en estrecha proximidad con las células positivas al antígeno. Kovtun et al. (2006), también exponen la importancia del enlazador en el inmunoc conjugado. *In vivo*, la destrucción del testigo puede contribuir a 1) la erradicación de las células tumorales que expresan de manera heterogénea CD138, 2) la destrucción del microambiente tumoral por la destrucción de las células del estroma celular, y 3) la prevención de la selección de células negativas a CD138 resistentes a nBT062-SPDB-DM4.

El efecto testigo es de particular importancia si la actividad de un inmunoc conjugado está alterada por un antígeno diana que se expresa en tumores de una manera heterogénea. Si este es el caso, una célula particular de un tumor expresa, si lo hace, el antígeno en una cantidad que no permitiría una dirección directa eficaz y la destrucción de dicha célula por el inmunoc conjugado respectivo. La eficacia antitumoral de nBT062-SPDB-DM4 en células negativas a CD138 en un co-cultivo con células positivas a CD138 clarificaba que la presencia de células diana tiene influencia, bajo las circunstancias apropiadas, en la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 hacia las células no dirigidas.

Experimentos B de xenoinjerto en ratón

En este grupo de experimentos, se inocularon ochenta y cinco ratones con células MOLP-8 ($1,5 \times 10^7$ células/ratón) por vía subcutánea en la escápula derecha. La tasa de captación del tumor era del 100%. Sesenta y seis ratones SCID que portaban masas tumorales MOLP-8 con una media de volumen tumoral de aproximadamente 80 mm^3 se distribuyeron aleatoriamente en once grupos ($n=6$). Los ratones se trataron con una dosis única de uno de los tres conjugados (nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1). Un grupo adicional recibió cinco dosis semanales de nBT062-SMCC-DM1 y un grupo de control que recibieron una dosis única de PBS. La media de los volúmenes tumorales se muestra en la **FIG. 11A**. Se estableció una respuesta dependiente de la dosis para cada conjugado. Se alcanzó un volumen tumoral medio de 750 mm^3 en los animales tratados con PBS el día 25. El tiempo de doblaje del tumor determinado por la curva de regresión lineal de mejor ajuste que se fija en un gráfico lineal logarítmico de control del crecimiento tumoral era de 4,58 días. Los animales tratados con nBT062-SPDB-DM4 a $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ tenía el mayor logaritmo de destrucción celular (LCK = 2,89), seguido por los animales tratados con nBT062-SMCC-DM1 con una dosificación semanal de $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ (LCK = 2,1; véase la **Tabla 5**). La comparación de las curvas de medias de crecimiento tumoral para los grupos de tratamiento por medidas repetidas ANOVA llevando a cabo el ensayo de comparación múltiple de Dunnett mostraba una diferencia significativa entre el grupo de control PBS y el de nBT062-SPDB-DM4 a $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0,01$), $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ de nBT062-SPDB-DM4 ($p<0,05$) y las cinco dosis semanales de $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ de nBT062-SMCC-DM1 ($p<0,05$). No se produjo regresión tumoral ni parcial ni completa en ninguno de los grupos de tratamiento con la excepción de un animal que recibió $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ de nBT062-SPDB-DM4, que tuvo una regresión parcial del tumor hasta el día 85 tras la inoculación.

Tabla 5. Valores del logaritmo de destrucción celular (LCK) como medida de una actividad anti-tumoral de diferentes conjugados nBT062-DMx en diferentes esquemas de dosificación. Refiérase a la sección de Materiales y Métodos para la información del cálculo de los valores LCK

Material de ensayo	Dosis($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LCK	Dosificación
PBS			dosis única
nBT062-SMCC-DM1	450	0,85	dosis única
nBT062-SMCC-DM1	250	0,53	dosis única
nBT062-SMCC-DM1	100	0	dosis única
nBT062-SPDB-DM4	450	2,89	dosis única
nBT062-SPDB-DM4	250	1,05	dosis única
nBT062-SPDB-DM4	100	0,39	dosis única
nBT062-SPP-DM1	450	0,8	dosis única
nBT062-SPP-DM1	250	0,39	dosis única
nBT062-SPP-DM1	100	0,2	dosis única
nBT062-SMCC-DM1	250	2,1	Semanalmente durante 5 semanas

Eficacia in vivo de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 en el ambiente de la médula ósea*Preparación de ratones SCID que tienen implantes de hueso fetal humano*

5 Los huesos largos humanos (trozos de hueso fetal humano) se implantaron en la parte superior del cuerpo de ratones SCID CB17 (SCID-hu) como se había descrito previamente (Urashima et al., 1997) y proporcionar así un modelo de ratón para albergar las células de MM humano en células BM humanas.

Regimen de tratamiento (ratones SCID-hu/INA-6)

10 4 semanas después de la implantación, se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células INA-6 con un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo celular RPMI-1640 directamente en la cavidad de la médula ósea humana en los ratones SCID-hu descritos anteriormente. Se utilizó como un parámetro del crecimiento celular MM y carga de enfermedad el aumento de los niveles de receptor IL-6 soluble humano (shuIL-6R), que es liberado por las células INA-6.

15 Los ratones desarrollaban shuIL-6R medible en el suero aproximadamente 4 semanas después de la inyección celular de INA-6 y luego recibieron 0,176 mg de conjugado o vehículo de control por medio de inyección en la vena del rabo semanalmente durante 7 semanas. Tras cada tratamiento, se recolectaron las muestras de sangre y se midieron los niveles de shuIL-6R con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se representan en la **Fig. 12**.

Conclusión

25 La interleucina 6 (IL-6) es un factor de crecimiento y supervivencia para las células de mieloma múltiple. INA-6 es una línea celular de mieloma humano dependiente de IL-6, que también necesita células del estroma de médula ósea (BMSC) para proliferar. Las líneas celulares INA-6 producen receptor IL-6 soluble (shuIL-6R). Un aumento en los niveles de shuIL se puede utilizar como un parámetro del crecimiento celular de MM y la carga de enfermedad.

30 Por lo tanto, los ratones sCID-hu/INA-6 proporcionan un modelo para el crecimiento de células de mieloma múltiple en su ambiente de médula ósea normal. Las células tumorales de este modelo, que interactúan directamente con la médula ósea humana, se parece estrechamente a la situación de los pacientes, en los que el crecimiento celular del tumor también está promovido por la presencia de células del estroma. Como las células INA-6 liberan receptor de interleucina-6 humano soluble (shuIL-6R), las concentraciones en el suero de esta proteína se pueden utilizar como una medida de la carga celular tumoral en estos ratones. La potencia in vivo de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se ensayaron en este ambiente.

40 El tratamiento de los ratones SCIDhu/INA-6 con administraciones i.v. semanales de nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1 durante 7 semanas inducían una regresión tumoral eficaz, como se detecta por un descenso en los niveles de suero shuIL-6R con respecto al control, que indica una buena eficacia de los conjugados incluso en el ambiente de médula ósea humana, lo que refleja la situación relevante en pacientes (Fig. 12).

Análisis de la eficacia sobre nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 in vitro e in vivo en animales de experimentación.**45 Materiales y métodos****Cultivo celular**

50 Las líneas celulares sensibles a Dex (MM.1S) y resistente (MM.1R) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Steven Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). Las líneas celulares RPMI8226 y U266 de MM humano se obtuvieron de la Colección de cultivos tipo americana (Manassas, VA). Las células resistentes a Doxorubicina (Dox) (RPMI-Dox40) y resistentes a Melfalán (LR5) las proporcionó amablemente el Dr. William Dalton (Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, FL). Las células de leucemia de células plasmáticas OPM1 y OPM2 las proporcionó amablemente el Dr. Edward Thompson (University of Texas Medical Branch, Galveston).

55 Todas las líneas celulares de MM y de estroma de médula ósea (BM) se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco DMEM (Sigma) que contenía un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina (Life Technologies), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Life Technologies). Las muestras de sangre recolectadas de voluntarios sanos se procesaron por gradientes de Ficoll Paque para obtener las células mononucleares de sangre periféricas (PBMC). Las células MM y BM derivadas de pacientes se obtuvieron de muestras de BM después de obtenerse el consentimiento informado según la Declaración de Helsinki y aprobado por la Oficina de Revisión Institucional del Instituto de Cáncer Dana-Farber (Boston, MA) Las células mononucleares de BM se separaron utilizando la sedimentación por densidad Ficoll-Paque, y las células plasmáticas se purificaron (>95% CD138⁺) por selección positiva con las microperlas de separación celular activadas magnéticas anti-CD138 (Miltenyi Biotec Auburn, CA). Las células tumorales se purificaron a partir de la BM de los pacientes con MM utilizando el sistema de selección negativa RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), como se había descrito

anteriormente (Hideshima, 2001). El cóctel de anticuerpos RosetteSep se dio a las muestras de médula ósea. Las células negativas a CD138 se entrecruzaron con glóbulos rojos (rosado) con los reactivos RosetteSep, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, antes de la separación por densidad en centrifugación de Ficoll.

5 Ensayo de inhibición del crecimiento y proliferación

El efecto inhibitorio del crecimiento de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y Dexametasona sobre el crecimiento de líneas celulares de MM, PBMC, y BMSC se evaluó en un ensayo MTT midiendo la metabolización del colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrasódico (MTT; Chemicon International, Temecula, CA), como se había descrito anteriormente.

Efecto de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 sobre el crecimiento celular en la BM

Para evaluar el efecto estimulante sobre el crecimiento de células BM sobre la sensibilidad de las células de MM hacia los inmunoconjugados, las células MM (2×10^4 células/pocillo) se co-cultivaron durante 48 h con células del estroma de médula ósea (BMSC, 1×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA), en presencia o ausencia de fármaco. La síntesis de ADN se midió por la captación de [3H]-timidina (Perkin-Elmer, Boston, MA). Se añadió [3H]-timidina ($0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$) durante las últimas 8 horas del experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

20 Análisis de ciclo celular

Las células de MM (1×10^6 células) se incubaron durante 48 horas en presencia o ausencia de inmunoconjugados, se lavaron con solución salina fosfato tamponada (PBS), se permeabilizaron con una exposición de 30 minutos a etanol al 70% a -20°C , se incubaron con yoduro de propidio (PI) ($50 \mu\text{g/ml}$) en $0,5 \text{ ml}$ de PBS que contenía 20 U/ml de RNasa A (Roche Diagnostics) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se analizó el contenido de ADN utilizando un citómetro de flujo.

30 Inmunofluorescencia

Las células cultivadas en portaobjetos se fijaron en acetona absoluta fría durante 10 min, se lavaron en PBS y se bloquearon durante 60 min con FBS al 5% en PBS. Los portaobjetos se incubaron entonces con anticuerpo anti-CD138 (sc12765, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 24 h a 4°C . Las células se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con una IgG anti ratón de cabra marcada con fluorescencia durante 1 h a 4°C y se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon E800 como se ha descrito previamente (Ikeda, 2005; Kiziltepe, 2007).

40 Modelo de xenoinjerto de MM humano positivo a proteína fluorescente verde autofluorescente (GFP) y modelo murino de xenoinjerto de MM humano

Se transfectaron las células OPM1 con proteínas fluorescente verde (OPM1^{GFP}) utilizando un vector lentivírico, como se había descrito previamente (Zufferey, 1998). Los ratones SCID CB17 (de 48-54 días de edad) se adquirieron en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto del Cáncer Dana-Farber. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células OPM1^{GFP} MM en $100 \mu\text{l}$ de RPMI-1640. Cuando los tumores eran palpables, los ratones se asignaron en el grupo de tratamiento que recibían $176 \mu\text{g/ratón}$ basándose en el peso molecular del conjugado, una vez semanalmente durante 4 semanas por inyección en la vena lateral del rabo, y 5 ratones se asignaron en el grupo de control que recibían solo al vehículo. Se llevaron a cabo mediciones con calibre de los diámetros perpendiculares más largos día sí día no para estimar el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula que representa el volumen 3D de una elipse: $4/3 \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{longitud}/2)$. Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó 2 cm o si el ratón parecía moribundo. Se evaluó la supervivencia desde el primer día de tratamiento hasta la muerte. El crecimiento tumoral se evaluó utilizando mediciones con calibre desde el primer día de tratamiento hasta el día del sacrificio que era el día 10 para el control y el día 21 para el grupo de tratamiento con nBT062-SPDB-DM4. Los ratones se siguieron por imagen de fluorescencia de cuerpo completo utilizando un Illumatool Bright Light System LT-9900 (Lighttools Research, Encinitas, CA), después del afeitado cutáneo del área del tumor. Las imágenes se capturaron con una cámara canon IXY digital 700. El análisis ex vivo de las imágenes del tumor se capturaron con un microscopio LEICA DM IL conectado a una cámara LEICA DFC300 FX a $40 \times$ (Leica, Heidelberg, Alemania)

60 Detección de células apoptóticas

Las células MM (1×10^6) se lavaron con PBS y se incubaron en presencia o ausencia de inmunoconjugados. Las células apoptóticas se tñeron con anticuerpo Apo 2.7 conjugado con PE (7A6, Beckman Coulter, Inc.). Las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo Epics (Beckman Coulter, Inc.) utilizando el software Cytomics RXP.

Transferencia de Western

Las células de MM se cultivaron en presencia o ausencia de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1, se recolectaron, se lavaron y se lisaron utilizando un tampón del ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) que contenía 2 mM de Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro, 5 mg/ml de inhibidor de proteasa completo, como se ha descrito anteriormente (Yasui, 2005; Hayashi, 2002). Los lisados celulares completos (20 µg por calle) se sometieron a separación por electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato de dodecil sódico (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa pura (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se inmunotransfirió con anticuerpo contra poli-ADP (adenosina difosfato)- ribosa polimerasa (PARP), caspasa-8, caspasa-3, caspasa-9, AKT, y fosfo(Ser 473) Akt (señalización celular), así como anticuerpos anti-tubulina y anti-CD138 (Santa Cruz Biotechnology).

Ensayo de adhesión celular

En una placa de 96 pocillos, se pipetearon 1×10^4 BMSC en cada pocillo y se incubaron durante 12 h en presencia o ausencia de los inmunoconjugados a 37 °C. En esta incubación, se unieron células de MM en presencia o ausencia de los fármacos a las BMSC. Por lo tanto, las células MM se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio RPMI libre de suero a densidades de 2×10^5 células en 100 µl en presencia o ausencia de los fármacos. Cada grupo de muestra se procesó por triplicado o cuadruplicado. Tras 2 horas en co-cultivo, las células no adherentes, débilmente adheridas y el medio se retiraron volcando la placa. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces en PBS. Las células adherentes restantes se cultivaron en un medio RPMI con un 10% de FBS en presencia de [3H]-timidina (0,5 µCi/pocillo, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) por 8 horas más, para medir la síntesis de ADN.

25 Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias observadas en los cultivos tratados con inmunoconjugado (IC) frente a los cultivos de control se determinaron utilizando ensayos de comparación múltiple de Dunn. El nivel mínimo de significación era un valor de P menor de 0,5. Para los experimentos in vivo, los volúmenes tumorales se compararon utilizando ensayos de comparación múltiple de Dunn de una vía. La supervivencia se evaluó utilizando curvas de Kaplan-Meier y análisis de rango logarítmico.

Resultados

35 Expresión de CD138 en líneas celulares de MM

Se analizaron los niveles de expresión de CD138 líneas celulares de mieloma múltiple por transferencia de Western utilizando los lisados celulares completos de células MM1S, OPM1, OPM2, RPMI8226, DOX40, MM1R, LR5, y U266 (FIG. 14A).

Como se puede apreciar en la FIG. 14A, las células MM1S y LR5 mostraban expresión débil de CD138 y las células Dox40 eran negativas a CD138. Las otras líneas celulares mostraban niveles de alta expresión de CD138. Esto demostraba que el CD138 se expresa en 7 de 8 (87,5%) de las líneas celulares de mieloma.

La FIG. 14B muestra un análisis que utiliza la tinción inmunofluorescente utilizando anticuerpos específicos para CD138. Se llevó a cabo el análisis microscópico de células DOX40 (panel superior) y células OPM1 (panel inferior). La expresión de CD138 se muestra a la izquierda y los ácidos nucleicos a la derecha. La FIG. 14B muestra que las células DOX40 casi no presentan expresión detectable de CD138. Por el contrario, las células OPM1 mostraban una inmunorreactividad a CD138.

50 nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 muestran citotoxicidad selectiva para las líneas celulares positivas a CD138

La eficacia de los conjugados anticuerpos contra CD138 y maitansinoides también se ensayaron en ensayos de viabilidad celular. Los inmunoconjugados nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se ensayaron en cuanto a su potencia citotóxica contra células positivas a CD138 (OPM1, RPM18226), células que expresaban débilmente CD138 (MM1S) y células negativas a CD138 (DOX40), utilizando el ensayo basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difeniltetrazolio (MTT). La FIG. 16A representa las células OPM1 (■), RPM18226 (◆), DOX40 (□) y MM1S (Δ) al exponerse a nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1, respectivamente. Se midió la supervivencia en ensayos MTT. Las viabilidades celulares tras los tiempos de incubación indicados (40, 80, 120 h) se dieron en % de viabilidad de los controles sin tratar. El tratamiento de las células con nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 a concentraciones que varían desde 3 a 354 ng/ml inducían la inhibición del crecimiento en las células positivas a CD138. Este efecto se producía de una manera dependiente del tiempo y la dosis y era más prominente tras las 120 h en las dos líneas celulares que expresaban altos niveles de CD138. Bajo las mismas condiciones, casi no se podía medir citotoxicidad contra las células DOX40 negativas a CD138 (FIG. 15A). De manera importante, los tres inmunoconjugados también eran

citotóxicos contra las células MM seleccionadas negativas derivadas del paciente cuando se analizaban en un intervalo de concentración de 111-442 ng/ml, medidos tras un tiempo de incubación de 48 h (**FIG. 15B**). La **FIG. 15C** muestra las PBMC derivadas de 3 sujetos sanos que se cultivaron con nBT062-SPDB-DM4 durante 72 h antes de que se determinara la viabilidad celular. La viabilidad celular de OPM1 mm tratadas bajo las mismas condiciones se muestran como un control (cuadrados opacos), Como se puede ver en la FIG. 43 15C, los inmunoconjugados no inducían efectos citotóxicos en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) aisladas de 3 voluntarios sanos (FIG.15 C). Estos resultados demuestran que nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 destruyen selectivamente las células de MM positivas a CD138 (Todos los datos que se muestran en esta figura representan medias de triplicados. Las desviaciones estándar se indican por barras de error).

nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 inducen detención del ciclo celular G2/M en células OPM1

Como el maitansinoide actúa suprimiendo la polimerización de microtúbulos, se ha visto previamente que el DM1 y el DM4 induce detención del ciclo celular G2/M en células tumorales (Erickson, 2006). Por lo tanto, el perfil del ciclo celular de las células OPM1 se examinó tras el tratamiento con nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1. Las células se incubaron con los inmunoconjugados durante 0 a 72 horas, se marcaron con PI, y se analizaron por citometría de flujo. La **FIG. 16A** muestra las células OPM1 tratadas con inmunoconjugados durante 0, 12 o 24 h y el análisis de los perfiles de ciclo celular por tinción PI. Como se puede ver en la **FIG. 16A**, estos compuestos tienen efectos significativos sobre la proporción de las células en fase G2/M al compararse con las células sin tratar. La exposición de las células OPM1 a nBT062-SPDB-DM4 induce una respuesta más rápida y fuerte comparada con las células tratadas con los otros dos fármacos.

nBT062-SPDB-DM4 induce apoptosis en células OPM1

Después, se determinó si nBT062-SPDB-DM4 induce apoptosis en células diana. La **FIG. 16B** muestra las células OPM1 cultivadas en presencia o ausencia de los inmunoconjugados durante 24, 48 o 72 h. El porcentaje de células apoptóticas se evaluó por tinción con anticuerpo Apo 2.7 y análisis de citometría de flujo. Como se muestra en la FIG. 16B, la tinción de las células con anticuerpo Apo2.7 demostraba la inducción de apoptosis de las células tratadas con inmunoconjugados.

La **FIG.16C** muestra las células OPM1 en presencia de 885 µg/ml de nBT062-SPDB-DM4 durante los tiempos indicados (panel izquierdo) o con diferentes concentraciones de inmunoconjugado (panel central). En esta Figura, FL indica bandas correspondientes a las formas de longitud completa de caspasas y PARP; CL indica bandas que corresponden con productos de escisión. Las células OPM1 se pre-incubaron con zVAD-fmk (50 µmol/l) durante 60 minutos antes del tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 durante 24 h a las dosis indicadas. El total de lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia utilizando capasa-3, 8, 9, PARP, y anticuerpos específicos de tubulina. Como se puede ver en la FIG. 16C, el tratamiento de las células OPM1 con nBT062-SPDB-DM4 inducía escisión de la caspasa 8, 9 y 3 y PARP de una manera dependiente del tiempo y la dosis (panel izquierdo y central). El inhibidor pancaspasa zVAD-fmk bloqueó la escisión de caspasa 3, 8, 9 y PARP inducida por nBT062-SPDB-DM4 en células OPM1 (FIG. 16C, panel derecho). Estos resultados indican que nBT062-SPDB-DM4 activa las caspasas e induce apoptosis en células diana.

nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 inhiben el efecto protector de las BMSC

En los pacientes de mieloma múltiple, el microambiente de la médula ósea induce el crecimiento, supervivencia y resistencia a fármacos en células de MM por medio de al menos dos mecanismos: adhesión de células MM a la fibronectina confiere la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR); y citocinas como la interleucina 6 (IL-6) y factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) en el medio de la médula ósea inducen cascadas de señalización importantes que finalmente media en la resistencia de células de MM a los agentes terapéuticos convencionales. La citotoxicidad de los inmunoconjugados hacia las células MM en co-cultivos con BMSC se analizó en presencia de IL-6 o en presencia de células del estroma de médula ósea (BMSC).

En las **FIG. 17A a 17C**, las células se cultivaron durante 48 h con el medio de control (barras negras) o con concentraciones crecientes de nBT062-SPDB-DM4: 55 ng/ml (barras gris oscuro; *), 111 ng/ml (barras grises; **), 221 ng/ml (barras grises claro; ***), 442 ng/ml (barras grises muy claras; ****) 885 ng/ml (barras blancas; *****). Las células de la **FIG. 17D** se trataron durante 72 h con el medio de control (barras negras) o con concentraciones crecientes de Dexametasona: 250 nM (barras grises; +), 500 nM (barras grises claro; ++), 1000 nM (barras blancas; +++). La IL-6 estaba presente en algunos cultivos a concentraciones de 1 a 10 ng/ml (**FIG. 17A**). El IGF-1 se utilizó a concentraciones de 10 o 50 ng/ml (**FIG. 17B**). Ninguna de estas citocinas inducía resistencia de las células a los inmunoconjugados.

Para analizar la influencia del microambiente de la BM sobre el crecimiento y la resistencia de OPM1 hacia los inmunoconjugados, las células se cultivaron en presencia o ausencia de las BMSC como se ha descrito anteriormente.

El co-cultivo de las células OPM1 en presencia o ausencia de BMSC se muestra en el panel (C) y (D) de la FIG. 17. En todos los experimentos, la síntesis de ADN se determinó por la medición de la incorporación de [3H]-timidina durante las últimas 8 h de cultivo. La adherencia de células OPM1 a las BMSC desencadenaba el aumento de captación de [3H]-timidina. De manera importante, la citotoxicidad de los inmunoconjugados no se afectaba en presencia de BMSC (FIG. 17C). Por el contrario, la Dexametasona, que se incluía como control, no era capaz de desencadenar el efecto protector de BMSC (FIG. 17D).

nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 inhibe la adherencia celular de MM1s a las BMSC

Se analizó si los inmunoconjugados inhiben la adhesión de las células de mieloma múltiple a las BMSC. Las células MM1S, que expresaban solo niveles moderados de CD138 y mostraban solo débilmente sensibilidad hacia BT062 (FIG. 14A y FIG. 15A) se cultivaron con o sin nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 durante 2 h (885 ng/ml). Tras el tratamiento, las células MM 1 S se co-cultivaron con BMSC durante 2 horas más. En algunas muestras, las BMSC también se trataban con los inmunoconjugados durante 12 h (885 ng/ml) antes de co-cultivar (tratamiento de estroma). Tras 3 etapas de lavado con PBS, las células adheridas se midieron por captación de [3H]-timidina.

La FIG. 17E muestra las BMSC cultivadas 24 h en placas de fondo plano de 96 pocillos en presencia o ausencia de los inmunoconjugados. Las BMSC se lavaron tres veces con PBS. Las células MM1S que se incubaron durante 2 horas con los inmunoconjugados se agregaron a las BMSC. La síntesis de ADN se midió por la captación de [3H]-timidina.

Como se representa en la FIG. 17E, el nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 inhibía la adhesión celular del mieloma múltiple a las BMSC en comparación con las muestras en las que solo se trataban las células de estroma (3,6 veces y 2,5 veces, respectivamente). El nBT062-SMCC-DM1 casi no mostraba efecto sobre la adhesión celular. El resultado sugiere que nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 era capaz de alterar la adhesión celular de MM a BMSC y que esos inmunoconjugados también son capaces de superar la resistencia a fármacos mediada por la adhesión celular (CAM-DR).

nBT062-SPDB-DM4 inhibe el crecimiento tumoral en modelo de xenoinjerto de MM humano en ratones SCID

Las actividades in vivo de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se determinaron en un modelo de xenoinjerto de MM humano positivo a GFP en ratones SCID.

La FIG. 18A muestra un análisis de la expresión de GFP por las células OPM1^{GFP}. Como se representa en la figura, se podía establecer un clon altamente fluorescente de células OPM1 MM (OPM1^{GFP}) y se examinó la actividad antitumoral de los inmunoconjugados con estas células en animales de experimentación in vivo. En la FIG. 18 B, se inyectó a 5 ratones por grupo con 5×10^6 células OPM1^{GFP}. A los ratones se les inoculó por vía subcutánea con 5×10^6 células OPM1^{GFP} en 100 μ l de medio RPMI-1640. El tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 (cuadrados), nBT062-SPP-DM1 (triángulos) o tampón de control se empezó cuando los tumores se establecieron. Los tamaños tumorales se determinaron por calibraciones en serie de los diámetros perpendiculares. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Todos los ratones desarrollaban tumores medibles 14 días después de la inyección de células tumorales y se distribuyeron aleatoriamente para recibir tratamiento una vez a la semana con nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o vehículo control (PBS). Las mediciones con calibre en serie de los diámetros perpendiculares se llevaron a cabo día sí y día no para calcular el volumen tumoral. El tratamiento de ratones que albergan el tumor con nBT062-SPDB-DM4 (176 μ g/ratón basándose en el peso molecular del conjugado, una vez a la semana durante 4 semanas) inhibía significativamente el crecimiento del tumor MM, al compararse con los animales control tratados con vehículo PBS (ensayo de comparación múltiple de Dunn; vehículo control vs nBT062-SPDB-DM4: $P < 0,01$ Figura 16B). El conjugado nBT062-SPP-DM1 era menos eficaz que el nBT062-SPDB-DM4 (ensayo de comparación múltiple de Dunn; nBT062-SPP-DM1 vs. nBT062-SPDB-DM4: $P < 0,05$ Figura 5B). Todos los ratones de control se tuvieron que sacrificar el día 19 tras el inicio del tratamiento, debido a los tamaños tumorales tan grandes. Utilizando las curvas de Kaplan-Meier y el análisis de rango logarítmico, la OS media era de 13,6 días (95% de intervalo de confianza [CI], 10-19 días) en la cohorte de control frente a los 26 días (95% de CI, 23-42 días) en los grupos tratados con nBT062-SPDB-DM4, respectivamente (FIG. 5C). Como se puede ver en la FIG. 18C, el nBT062-SPDB-DM4 aumentaba significativamente la supervivencia ($P < 0,0023$, línea discontinua, $n=5$) en comparación con el grupo de control tratado con solo el vehículo (línea sólida; solución salina normal, $n=5$). Los ratones se sacrificaron y se extirparon los tumores de un ratón tratado con nBT062-SPDB-DM4 y un ratón de control tratado con tampón para los análisis TUNEL. El análisis ex vivo de los tumores extirpados de los ratones que albergaban OPM1^{GFP} demostraba aumento de apoptosis en los animales tratados con BT062 en comparación con los ratones control (FIG. 18D). Por lo tanto el nBT062-SPDB-DM4 induce apoptosis in vivo. Ninguno de los compuestos mostró influencia en el peso corporal en este estudio.

Conclusión

Anteriormente, se demostró una actividad antitumoral selectiva de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 contra células MM que expresan CD138 in vitro y en animales de experimentación in vivo. Utilizando inmunotransferencia y análisis de inmunofluorescencia, encontramos que la mayoría de las líneas

celulares MM analizadas expresan CD138. Sin embargo DOX40, no expresan proteína CD138 y las células MM1S y LR5 mostraban una expresión débil de la proteína. Las restantes cinco mostraban altos niveles de expresión de CD138. Los inmunocombinados nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 mostraban una citotoxicidad significativa contra las líneas celulares de MM siendo el nBT062-SPDB-DM4 el compuesto más potente de estos tres agentes. Las células OPM1 y RPMI8226 que expresan altos niveles de CD138 eran más sensibles a los inmunocombinados que las células MM1S que expresaban bajo CD138 o las Dox40 negativas a CD138. De manera importante, estos agentes también eran citotóxicos contra las células aisladas de pacientes que padecen MM. De manera importante, no se observó citotoxicidad contra las células mononucleares de médula ósea o de médula ósea de voluntarios sanos. Estos resultados sugieren el que los inmunocombinados tienen una actividad selectiva de antígeno contra las células tumorales de MM.

Se podría demostrar que nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 inhiben la proliferación celular de las células MM induciendo la detención del ciclo celular G2/M lo que da lugar a la muerte celular apoptótica. La escisión de la caspasa-3, 8, 9 y la PARP diana de la caspasa-3 corriente abajo se puede detectar en células OPM1 tratadas con inmunocombinados. Además, las células positivas al antígeno APO2.7 aumentaron tras veinticuatro horas de incubación con estos fármacos.

Se comunicó previamente que la IL-6 desencadena la proliferación de células de mieloma múltiple por medio de la activación de las cascadas de señalización PI3-K/Akt, MEK/ERK y JAK2/STAT3. El IGF-1 se ha descrito que también promueve la proliferación de células de mieloma múltiple y la supervivencia utilizando las mismas rutas. La IL-6 protege contra la apoptosis inducida por la dexametasona por medio de la inducción de la señalización PI3-K/Akt. Se examinó si la IL-6 e IGF-1 inhibía la citotoxicidad inducida por los inmunocombinados. Aunque se notó un aumento de la proliferación en las células tratadas con IL-6 o IGF-1, estas citocinas no podían inhibir la apoptosis inducida por nBT062-SPDB-DM4 en células OPM1, sugiriendo que estos agentes pueden superar los efectos protectores de estas citocinas. De manera importante, los inmunocombinados inhibían el crecimiento y la adherencia de células MM1S adheridas a las BMSC, confirmando más que pueden superar la resistencia a fármacos mediada por la adhesión celular (CAM-DR). En animales de experimentación, el nBT062-SPDB-DM4 inducía un retraso significativo del crecimiento de xenoinjertos de MM establecidos sin influencia sobre los pesos corporales.

Todos los combinados ensayados mostraban una alta actividad citotóxica contra las líneas celulares de MM y contra las células MM primarias derivadas de pacientes, mientras que las células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos no mostraban sensibilidad hacia los combinados.

Los inmunocombinados específicos de CD138 desencadenaban detención del ciclo celular G2/M e inducían apoptosis en las células diana, asociada con la escisión de la caspasa -8/9 y 3 y la escisión de la diana corriente abajo de la caspasa-3 la PARP. De manera importante, la interleucina-6, el factor de crecimiento tipo insulina 1 o la presencia de células del estroma de médula ósea no protegían las células de MM contra la citotoxicidad mediada por inmunocombinados

El combinado nBT062-SPDB-DM4 inhibía significativamente el crecimiento tumoral del MM ($p < 0,01$) y prolongaba la supervivencia de los ratones.

Bibliografía

Akkina RK, Rosenblatt JD, Campbell AG, Chen IS, Zack JA. Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1994;84:1393-1398.

Armour KL, Clark MR, Hadley AG, et al. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*. 1999; 29(8):2613-24.

Anderson KC, Kyle RA, Dalton WS, Landowski T, Shain K, Jove R, Hazlehurst L, Berenson J. Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. *Hematology* 2000;147-165.

Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. 2001 Jun; 32(3):297-305.

Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003 Aug 1; 98(3):474-83.

Bataille R, Jégou G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234-40. Review.

- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:365-393.
- 5 Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96, 1898-1903.
- Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett.* 1977; 75:159-162.
- 10 Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Müller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):2079-89. Epub 2005 Nov 8.
- 15 Blättler WA and Chari RVJ. Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs. In: Ojima, I., Vite, G.D. and Altmann, K.-H., Editors, 2001. *Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 317-338.
- 20 Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1490-1496.
- Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, Ferlito A, Rinaldo A, Stein H. AIDS-related plasma- blastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1999; 108: 95-99.
- 25 Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J* 1978; 173: 723-737.
- Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:118-129.
- 30 Chari RV, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blattler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res.* 1992;52:127-131.
- 35 Chari RV, Jackel KA, Bourret LA, Derr SM, Tadayoni BM, Mattocks KM, Shah SA, Liu C, Blättler WA and Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res.* 1995; 55: 4079-4084.
- 40 Charnaux N, Brule S, Chaigneau T, Saffar L, Sutton A, Hamon M, Prost C, Lievre N, Vita C, Gattegno L. RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. *Glycobiology.* 2004 Sep 8 [Epub ahead of print]
- 45 Chen BP, Galy A, Kyoizumi S, Namikawa R, Scarborough J, Webb S, Ford B, Cen DZ, Chen SC. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood.* 1994;84:2497-2505.
- Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol.* 1999;12:1101-1106.
- 50 Clement C, Vooijs, W.C., Klein, B., and Wijdenes, J. In: al. SFSe, ed. *J. Leukocyte Typing V.* Oxford: Oxford University Press; 1995:714-715.
- 55 Couturier O, Faivre-Chauvet A ; Filippovich IV; Thedr ez P, Sa -Maurel C; Bardies M; Mishra AK; Gauvrit M; Blain G; Apostolidis C; Molinet R; Abbe JC; Bateille R; Wijdenes J; Chatal JF; Cherel M; Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 5(10 Suppl.) (Oct 1999) 3165s-3170s.
- 60 Davies EJ et al., Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer *Clin Cancer Res.* 2004; 10(15):5178-86.
- Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood.* 1998;91:2679-2688.
- 65 Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of BB2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 1998;426:67-70.

- 5 Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibodytargeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:1206-1214.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia*. 1999;1:303-310.
- 10 Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol*. 1999;104:152-162.
- Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upeslakis J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem*. 2002;13:40-46.
- 15 Han I, Park H, Oh ES. New insights into syndecan-2 expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells. *J Mol Histol*. 2004; 35(3):319-26.
- Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006;107(10):4053-62.
- 20 Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007;7(8):585-98.
- 25 Horvathova M, Gaillard, J.-P., Liutard, J., Duperray, C., Lavabre-Bertrand, T., Bourquard, P et al. In: al. SFS, ed. *Leucocyte Typing V*. Oxford: Oxford University Press; 1995:713-714.
- Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, Xie H, Ruberti MF, Phinney SJ, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Res* 2006;66(6):3214-21.
- 30 Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. 2001. *J. Immunol. Methods* 254, pp. 67-84.
- 35 Kupchan SM, Sneden AT, Branfman AR, Howie GA, Rebhun LI, Mclvor WE, Wang RW, Schnaitman TC. Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids. *J Med Chem*. 1978;21:31-37.
- 40 Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H, McCune JM, Yee EJ, Namikawa R. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*. 1992;79:1704-1711.
- 45 Kyoizumi S, Murray LJ, Namikawa R. Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1993;81:1479-1488.
- Langford JK, Stanley MJ, Cao D, Sanderson RD. Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function. *J Biol Chem*. 1998 Nov 6;273(45):29965-71.
- 50 Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blattler WA, Chari RV. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8618-8623.
- 55 McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*. 1988;241:1632-1639.
- Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlentz HD, Thierauch KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*. 2004 Jun; 40(9):1373-82.
- 60 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
- 65 Munshi NC, Longo DL, Anderson KC. Plasma cell disorders. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York : McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p. 700-7.

- Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCIDhu mice. *Blood*. 1993;82:2526-2536.
- 5 O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:254-263.
- Ojima I, Geng X, Wu X, Qu C, Borella CP, Xie H, Wilhelm SD, Leece BA, Bartle LM, Goldmacher VS and Chari RV. Tumor-specific novel taxoid-mono-clonal antibody conjugates. 2002. *J. Med. Chem.* 45, pp. 5620-5623.
- 10 Olafsen, T, Cheung, CC, Yazaki, PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman, MA, Williams, LE, Shively, JE, Raubitschek, AA, and Wu, AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. 2004; *Prot. Eng. Design & Selection* 17:1: 21-27.
- 15 Orosz Z, Kopper L. Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. *Anticancer Res.* 2001; 21(1B):733-7. Padlan, EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 1991; 28: 489-498.
- Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2003;3:207-212.
- 20 Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA and Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. 1998. *J. Clin. Oncol.* 16, pp. 2659-2671.
- 25 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997;97:46-55.
- 30 Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science.* 1975;189:1002-1005.
- Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:969-973.
- 35 Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, Lutz RJ, Frantz G, Hillan K, Peale F, Tobin P, Eberhard D, Rubin MA, Lasky LA, Koeppen H. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2546-53.
- 40 Ross JS, Gray K, Gray G, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer Antibodies, *Am J Clin Path.* (4/17/2003). Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989;1:27-35.
- 45 Sandhu JS, Clark BR, Boynton EL, Atkins H, Messner H, Keating A, Hozumi N. Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone. *Blood.* 1996;88:1973-1982.
- Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res.* 1995;55:3551-3557.
- 50 Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *Br J Haematol.* 1997;97:56-64.
- 55 Schuurman J, Van Ree R, G. J. Perdok GJ, Van Doorn HR, Tan KY, Aalberse RC, Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites, *Immunology* 1999; 97:693-698.
- Sebestyen A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol.* 1999; 104(2):412-9.
- 60 Seftalioglu A, Karakus S. Syndecan-1/CD138 expression in normal myeloid, acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells. *Acta Histochem.* 2003;105:213-221.
- 65 Seftalioglu A, Karakus S, Dundar S, Can B, Erdemli E, Irmak MK, Oztas E, Korkmaz C, Yazar F, Cavusoglu I. Syndecan-1 (CD138) expression in acute myeloblastic leukemia cells-an immuno electron microscopic study.

Acta Oncol. 2003;42:71-74.

5 Senter PD, Doronina S, Cerveny C, Chace D, Francisco J, Klussman K, Mendelsohn B, Meyer D, Siegall CB, Thompson J et al. (2002). Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates. Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.), 414.

10 Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG.. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. J Biol Chem. 2001; 276(9):6591-604.

15 Sievers EL, Larson R.A., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L. et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. 2001. J. Clin. Oncol. 19, pp. 3244-3254.

Sievers EL and Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. 2001. Curr. Opin. Oncol. 13, pp. 522-527.

20 Smith R., Single chain antibody variable region fragments; www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html (last updated on May, 2001).

25 Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. Protein Eng. 1994; 7(6): 805-814.

30 Tai YT, Li XF, Catley L, Coffey R, Breikreutz I, Bae J, Song W, Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Treon SP, Grewal IS, Munshi NC, Anderson KC. Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications. Cancer Res. 2005 Dec 15; 65(24):11712-20.

35 Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shamma MA, Whiteman KA, Hylander-Gans LL, Carrasco DR, Hideshima T, Shringarpure R, Shi J, Allam CK, Wijdenes J, Venuta S, Munshi NC, Anderson KC, Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells, Blood, 2004, 104 (12), pp. 3688-3696.

40 Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, Patnaik A, Edwards T, Takimoto C, Smith L, de Bono J, Schwartz G, Mays T, Jonak ZL, Johnson R, DeWitte M, Martino H, Audette C, Maes K, Chari RV, Lambert JM, Rowinsky EK. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. J Clin Oncol. 2003;21:211-222.

45 Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dederda DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. Blood. 1997;90:754-765.

Vogel CW. Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties. Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods. 2004;283:087-108.

50 Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, Stirpe F, Bast EJ, de Gast GC. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. Cancer Immunol Immunother. 1996;42:319-328.

55 Ward, E.S., D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, and G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. Nature. 1989. 341:544-546.

Wargalla UC, Reisfeld RA. Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86:5146-5150.

60 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. Br J Haematol. 1996; 94: 318-323.

Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138, J Biol Regul Homeost Agents. 2002 Apr-Jun;16(2):152-5.

65 Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. Cytometry. 1996;26:113-120.

Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;308(3):1073-82.

5 Yang M, Jiang P, An Z, Baranov E, Li L, Hasegawa S, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3549-3559.

10 Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:1206-1211.

15 Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodavsky I, Suva LJ, Epstein J, Yaccoby S, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Sanderson RD. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):2041-8. Epub 2007 May 29.

20 Yoshitake S, Yamada Y, Ishikawa E, Masseyeff R. Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. *Eur J Biochem* 1979;101:395-399.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Biotest AG Dana-Farber Cancer Institute, Inc. ImmunoGen, Inc.

<120> MÉTODOS Y AGENTES QUE MEJORAN LA DIRECCIÓN A LAS CÉLULAS TUMORALES QUE EXPRESAN CD138

30 <130> 319932.WO/JND/CJS

<150> 61/016.614

<151> 26-12-2007

35 <150> 61/087.466

<151> 08-08-2008

<150> 61/087.590

<151> 08-08-2008

40 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos (prevista) de cadena pesada de anticuerpo quimérico de ser humano/ratón

<220>

<221> CDR1

<222> (31)..(35)

55

<220>

<221> CDR2

<222> (51)..(68)

60

<220>

<221> CDR3

<222> (99)..(111)

65

<220>

<221> región de IgG4

<222> (123)..(448)

ES 2 543 201 T3

<400> 1

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

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

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 543 201 T3

	35		40		45														
Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Arg	Thr	Ile	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe				
	50					55					60								
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Ile	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Gln				
65					70					75					80				
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp				
			100					105					110						
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro				
		115					120					125							
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr				
	130					135					140								
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr				
145					150					155					160				
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro				
			165						170					175					
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr				
		180						185					190						
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp				
		195					200					205							
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr				
	210					215					220								
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				245					250					255					
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp				
			260					265					270						
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
		275					280					285							

ES 2 543 201 T3

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

- 5 <210> 2
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos (prevista) de cadena ligera de anticuerpo quimérico de ser humano/ratón
- <220>
- <221> CDR1
- <222> (24)..(34)
- 15 <220>
- <221> CDR2
- <222> (50)..(56)
- 20 <220>
- <221> CDR3
- <222> (89)..(97)
- 25 <220>
- <221> región de IgG4
- <222> (108)..(214)

ES 2 543 201 T3

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 3
 <211> 31
 <212> ADN

ES 2 543 201 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador IgH MHV7
 5
 <400> 3
 atgggcatca agatggagtc acagaccag g 31
 <210> 4
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador de región constante de IgG1 MHCG1
 <400> 4
 cagtggatag acagatgggg g 21
 <210> 5
 20 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador Ig Kappa MKV2
 <400> 5
 30 atggagacag acacactcct gctatgggtg 30
 <210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador Ig Kappa MKV4
 <400> 6
 40 atgagggccc ctgctcagtt tttggcttc ttg 33
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador Ig Kappa MKV9
 <400> 7
 50 atggtatcca cacctcagtt ccttg 25
 <210> 8
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador MKC
 60 <400> 8
 actggatggt gggaagatgg 20
 <210> 9
 65 <211> 50
 <212> ADN

ES 2 543 201 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo (Dir)
 5
 <400> 9
 agagaagctt gccgccacca tgattgcctc tgctcagttc ctgggtctcc 50
 <210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador oligonucleotídico BT03
 <400> 10
 caacagtata gtaagctccc tccgacgttc ggtgg 35
 20 <210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador oligonucleotídico BT04
 <400> 11
 ccaccgaacg tccgagggag ctactatac tgttg 35
 30 <210> 12
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador g2258
 <400> 12
 40 cgcgggatcc actcacgttt gattccagc ttgggcctc c 41
 <210> 13
 <211> 45
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador g22949
 50 <400> 13
 cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gtcc 45

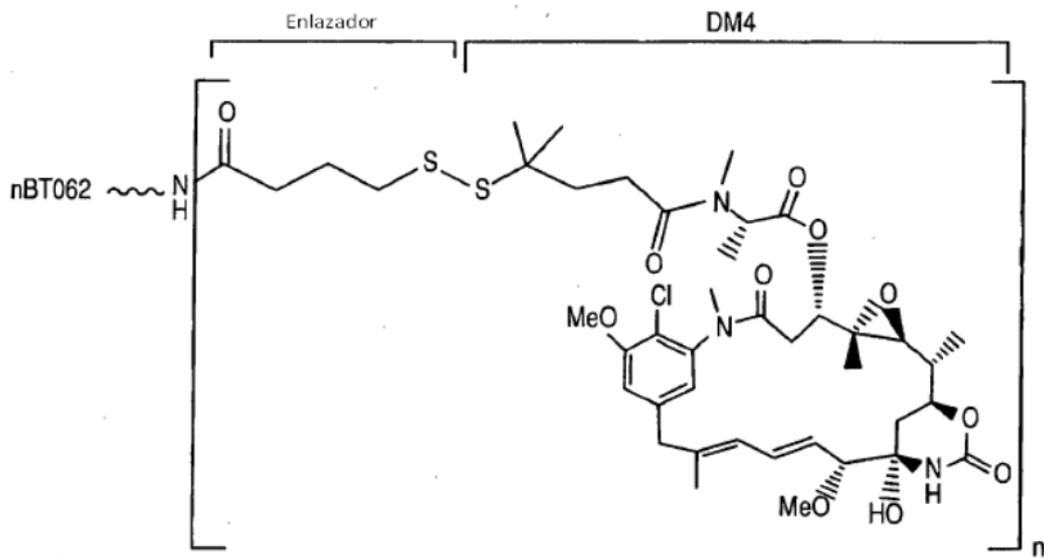
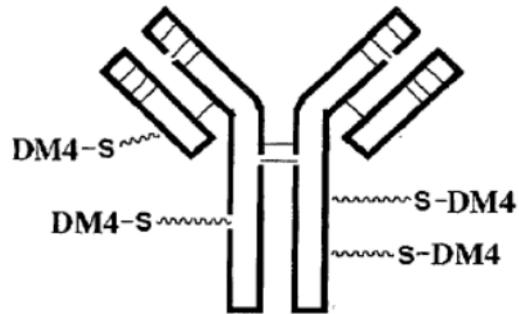
REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado dirigido a las células tumorales que expresan CD138 de un sujeto disminuyendo la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende una molécula efectora y un anticuerpo dirigido modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo dirigido modificado están unidos entre sí mediante un enlazador escindible,
 5 en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de tubulina,
 en el que el anticuerpo dirigido modificado comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable
 10 de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácido 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2,
 y en el que el inmunoconjugado es para su uso con un agente citotóxico adicional, en el que el inmunoconjugado y el agente citotóxico adicional son para administrarse consecutivamente y en el que la administración del agente citotóxico adicional se realiza después de la administración del inmunoconjugado.
 15
2. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador escindible contiene un enlace disulfuro, y preferentemente en el que el enlazador es SPP o SPDB.
3. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha
 20 disminución de la adhesión da como resultado el alivio de la resistencia a fármacos mediada por la adhesión.
4. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la resistencia a fármacos mediada por la adhesión contra el agente citotóxico adicional está disminuida y en el que dicho agente citotóxico adicional se administra en una cantidad que inhibe, retrasa y/o previene el crecimiento de las células tumorales.
 25
5. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho agente citotóxico es melfalán, vincristina, doxorubicina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, talidomida, prednisona, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina o combinaciones de los mismos, o en el que el agente citotóxico está basado en anticuerpo.
 30
6. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha molécula efectora está estéricamente impedida.
7. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula
 35 efectora es al menos un maitansinoide, o un análogo del mismo.
8. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la molécula efectora es al menos un maitansinoide tal como DM1, DM3, o DM4, y es preferentemente DM4.
- 40 9. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado comprende:
- una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% con la SEC ID N° 1.
 45
10. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una SEC ID N° 1, y una secuencia de cadena ligera que tiene una SEC ID N° 2.
- 50 11. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 5, en el que dicho sujeto es un paciente de cáncer que padece uno de los siguientes cánceres: mieloma múltiple, carcinoma ovárico, carcinoma de riñón, carcinoma de vesícula, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma de colon, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML) o un sarcoma tisular sólido, y preferentemente en el que dicho paciente padece
 55 mieloma múltiple.
12. El uso de un inmunoconjugado dirigido a las células tumorales que expresan CD138 para la fabricación de un medicamento para tratar células tumorales de un sujeto que expresan CD138 disminuyendo la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende una molécula efectora y un anticuerpo dirigido modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo dirigido modificado están unidos entre sí por medio de un enlazador escindible,
 60 en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de tubulina,
 en el que el anticuerpo dirigido modificado comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácido 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2,
 65

y en el que el inmunoconjugado es para su uso con un agente citotóxico adicional, en el que el inmunoconjugado y el agente citotóxico adicional son para administrarse consecutivamente y en el que la administración del agente citotóxico adicional se realiza después de la administración del inmunoconjugado.

- 5 13. El uso de un inmunoconjugado dirigido a las células tumorales que expresan CD138 y un agente citotóxico adicional para la fabricación de una preparación combinada para su uso secuencial en el tratamiento de células tumorales de un sujeto que expresan CD138, en el que el inmunoconjugado comprende una molécula efectora y un anticuerpo dirigido modificado, en el que la molécula efectora y el anticuerpo dirigido modificado están unidos entre sí mediante un enlazador escindible,
- 10 en el que la molécula efectora es un inhibidor de la polimerización de tubulina, en el que el anticuerpo dirigido modificado comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y una región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácido 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2,
- 15 en el que el inmunoconjugado es para administrarse para disminuir la adhesión de las células del estroma a las células tumorales que expresan CD138, y en el que la administración del agente citotóxico adicional es para administrarse después de la administración del inmunoconjugado.

FIG. 1



*n es aproximadamente 3,5 fármaco unido por molécula de anticuerpo

FIG. 2

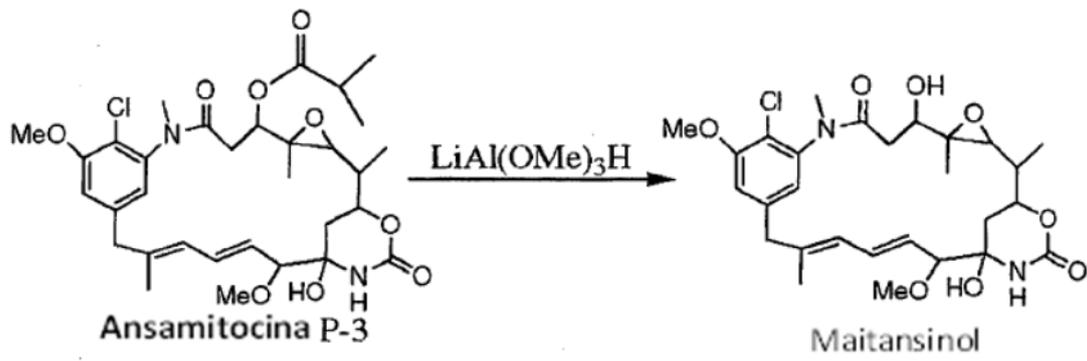
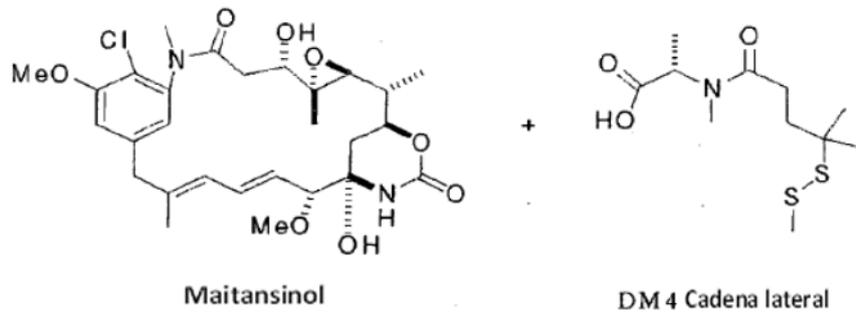


FIG. 3



Etapa I
 1) DCC, ZnCl₂, CH₂Cl₂
 2) Cromatografía

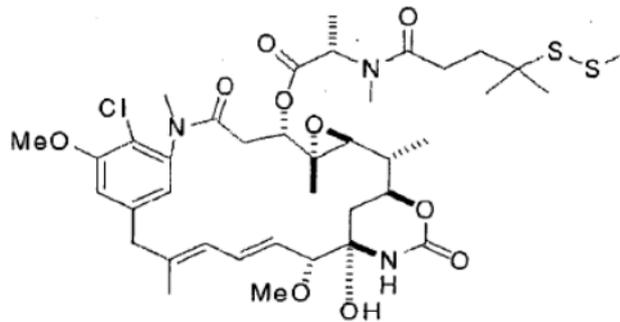
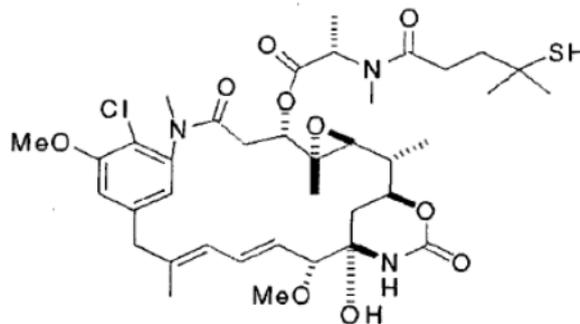


FIG. 4

Etapa II
 1) DTT, DME, Tampón fosfato
 2) Cromatografía



DCC: 1,3-diciclohexilcarbodiimida
 DTT: Ditiotretitol
 DME: 1,2-Dimetoxietano

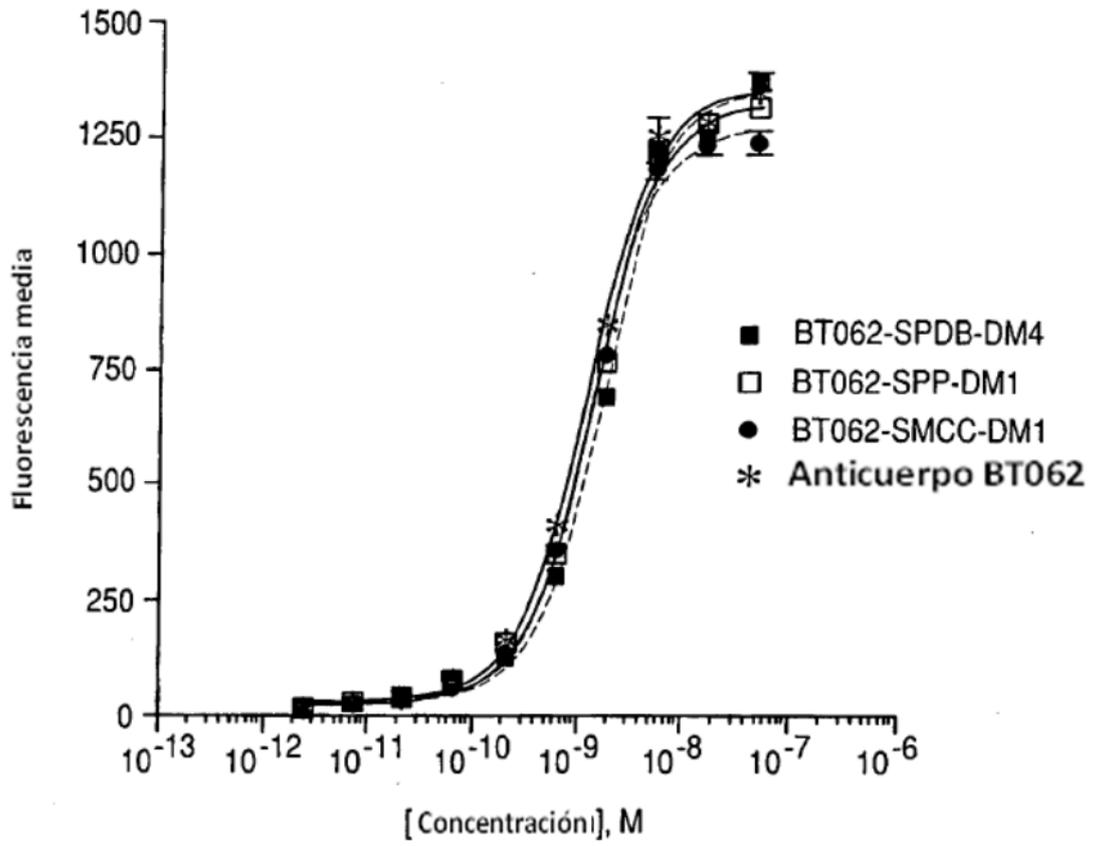


FIG. 6

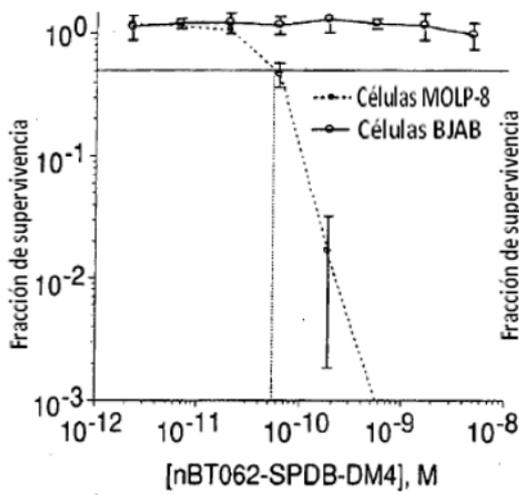


FIG. 7A

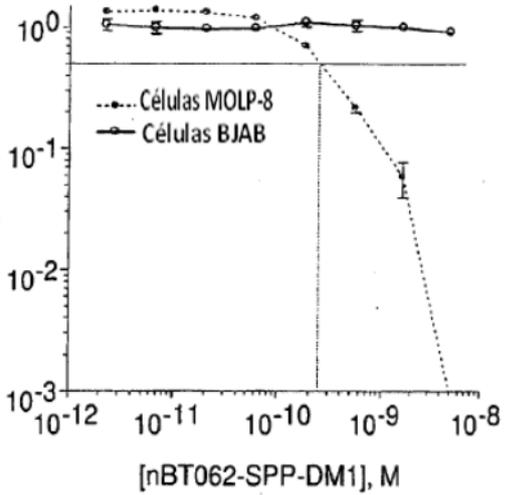


FIG. 7B

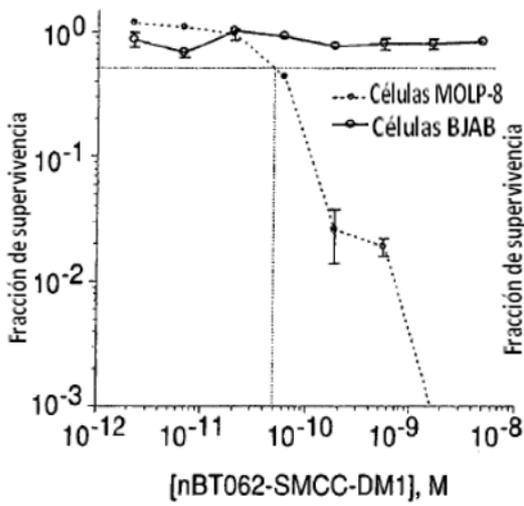


FIG. 7C

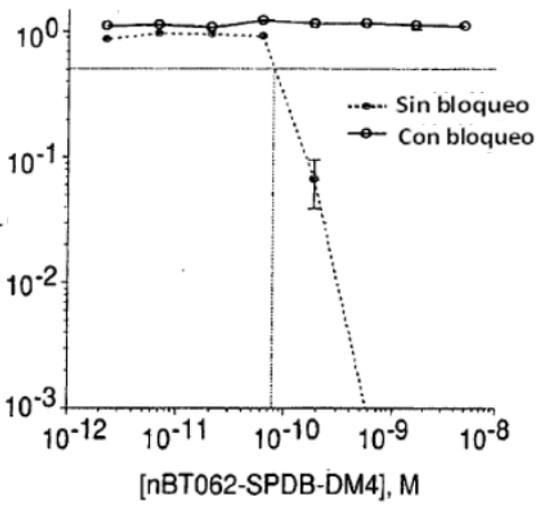


FIG. 7D

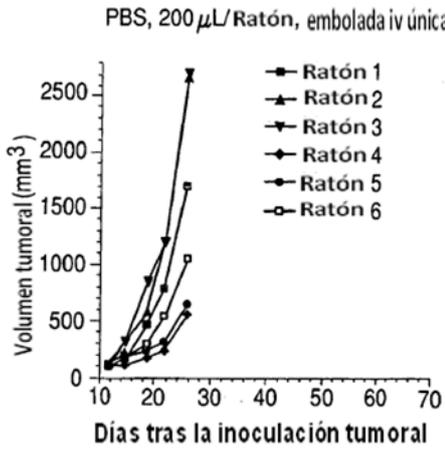


FIG. 8A

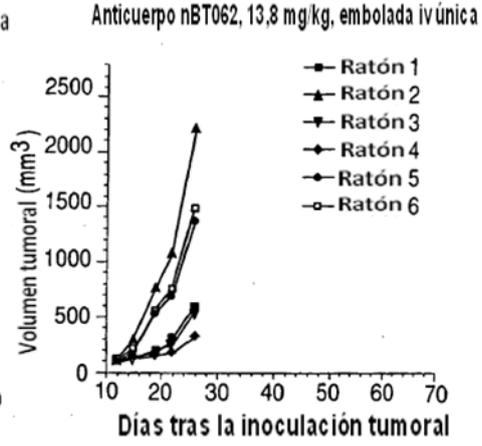


FIG. 8B

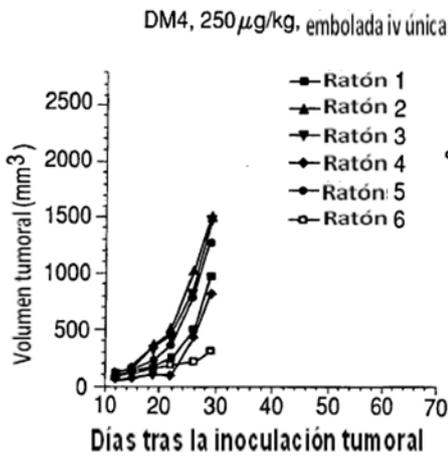


FIG. 8C

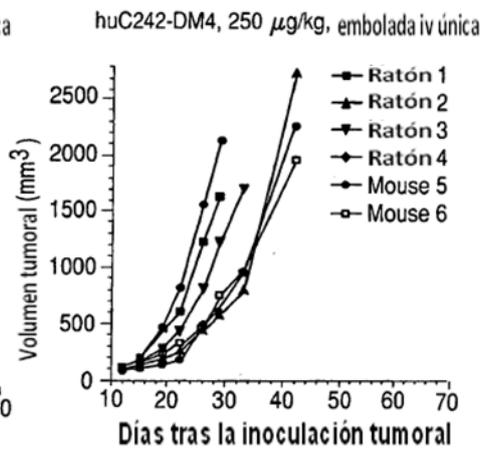


FIG. 8D

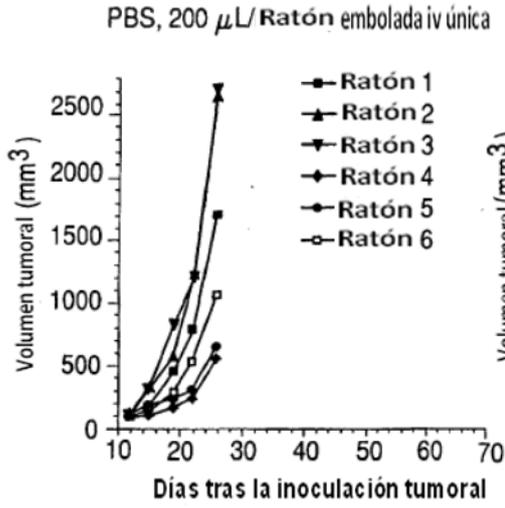


FIG. 9A

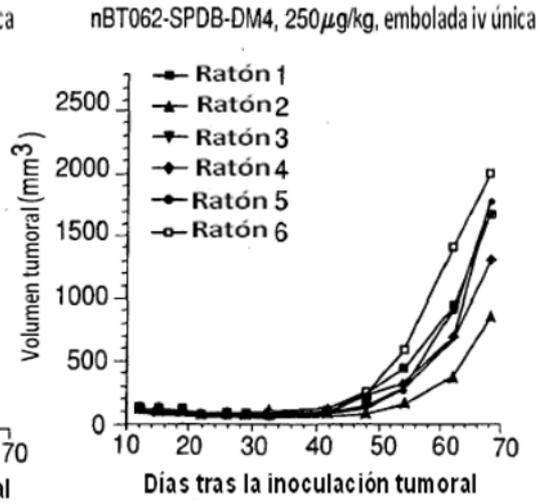


FIG. 9B

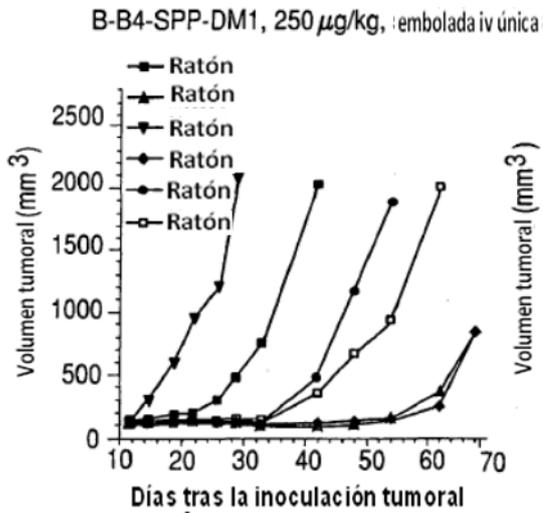


FIG. 9C

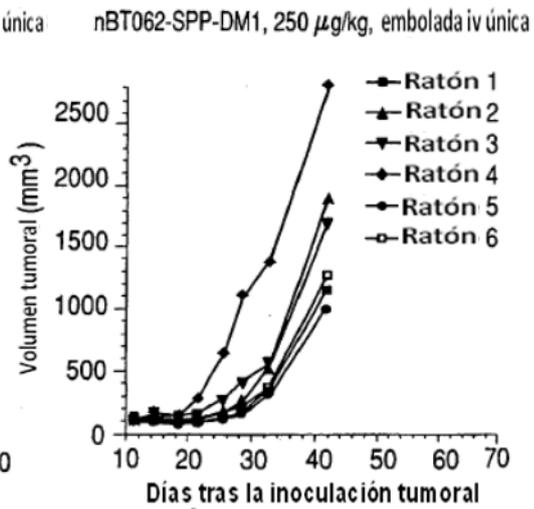


FIG. 9D

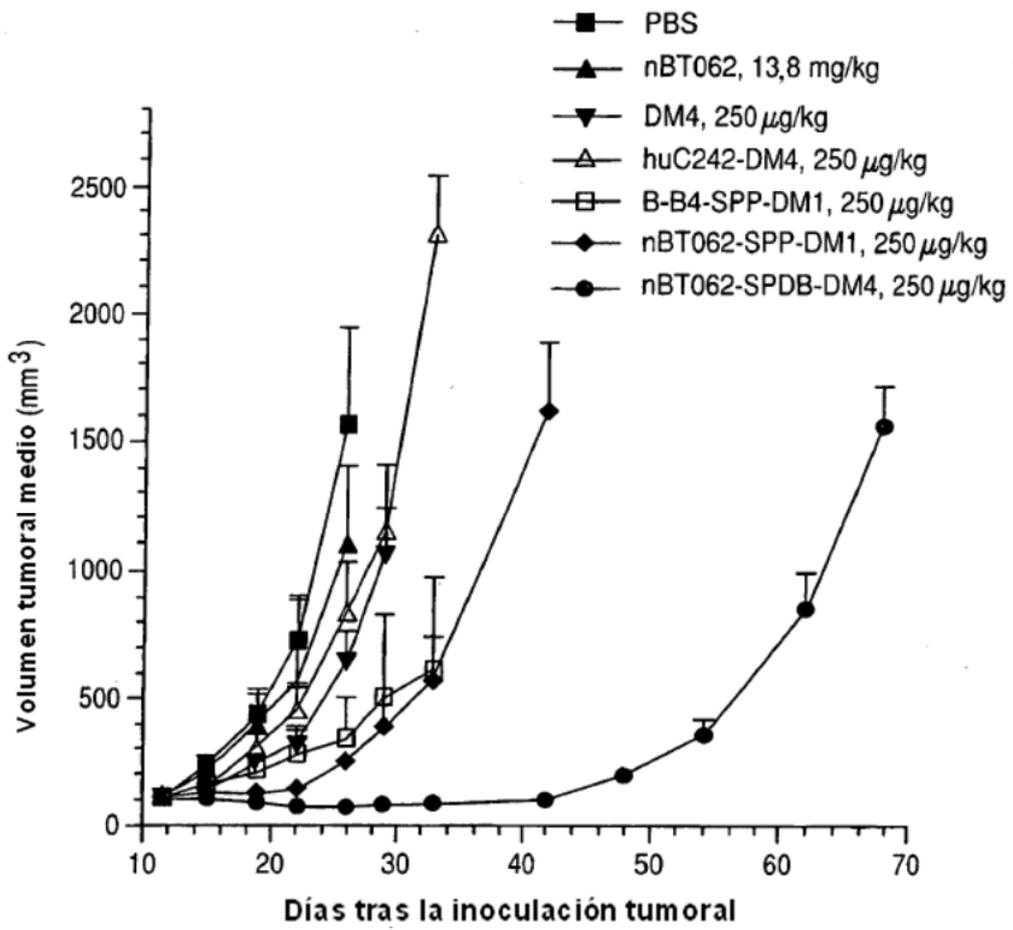


FIG. 10

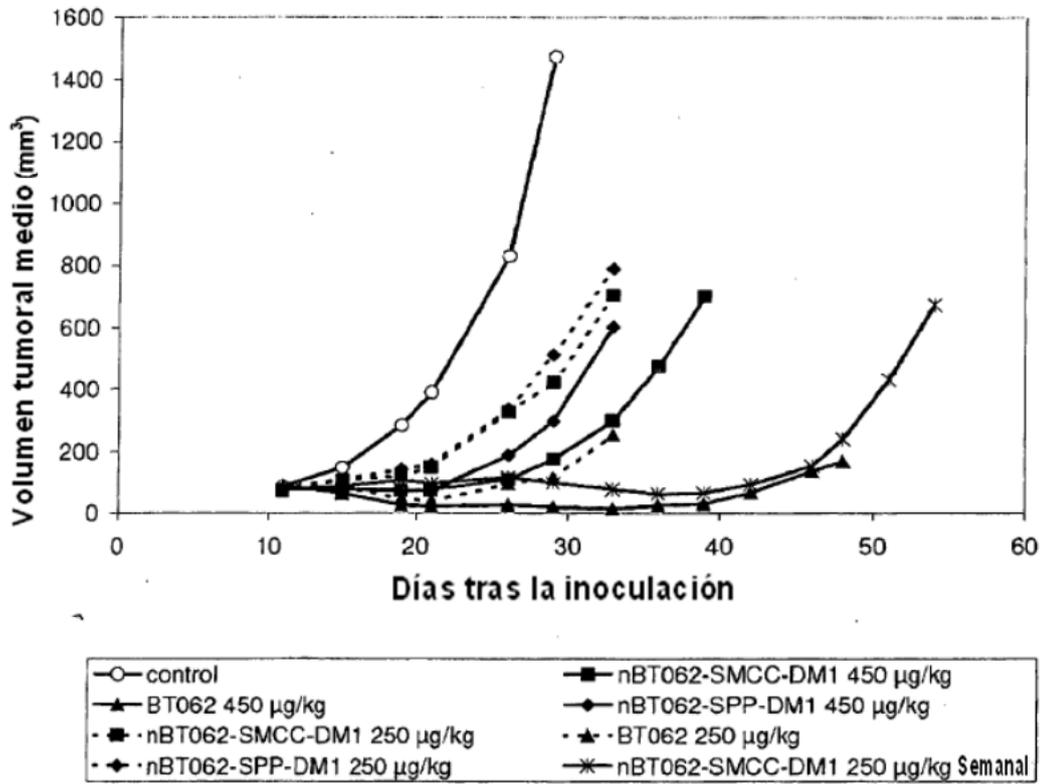


FIG. 11A

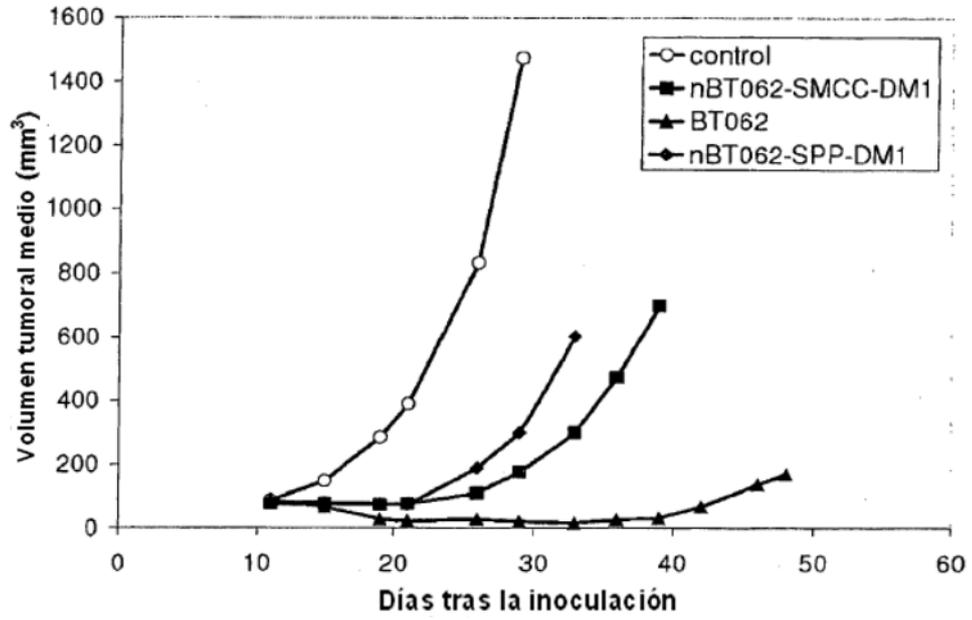


FIG. 11B

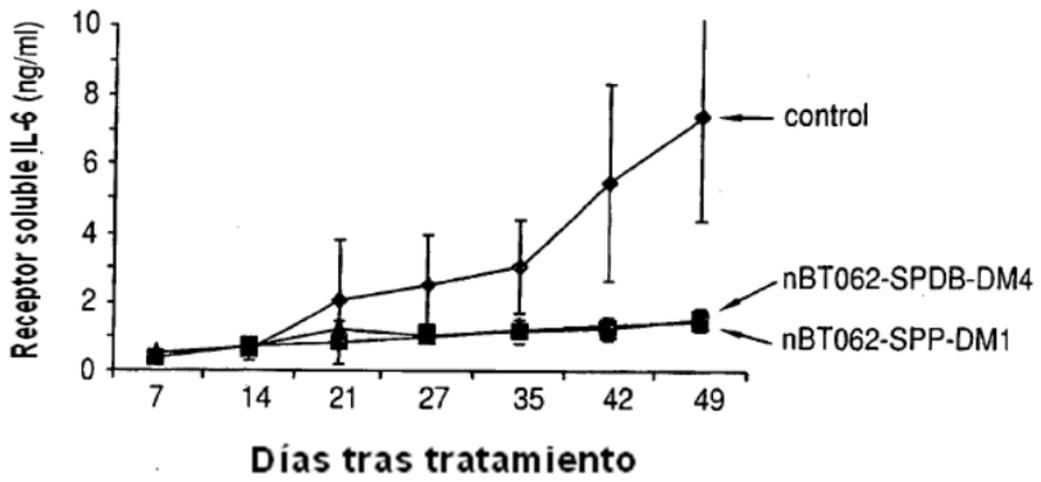


FIG. 12

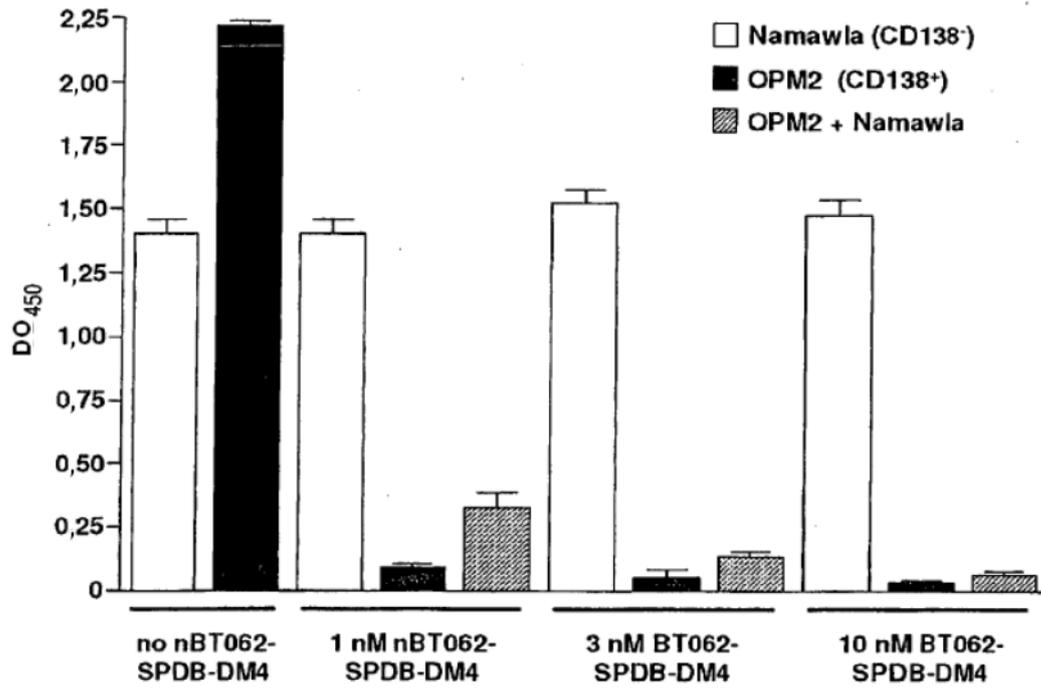


FIG. 13

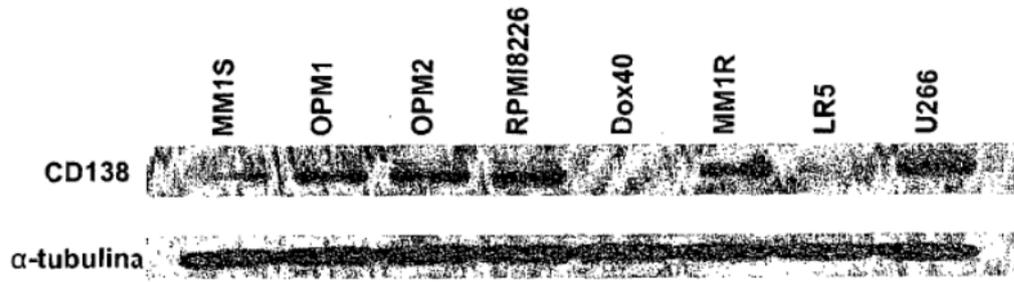


Fig. 14A

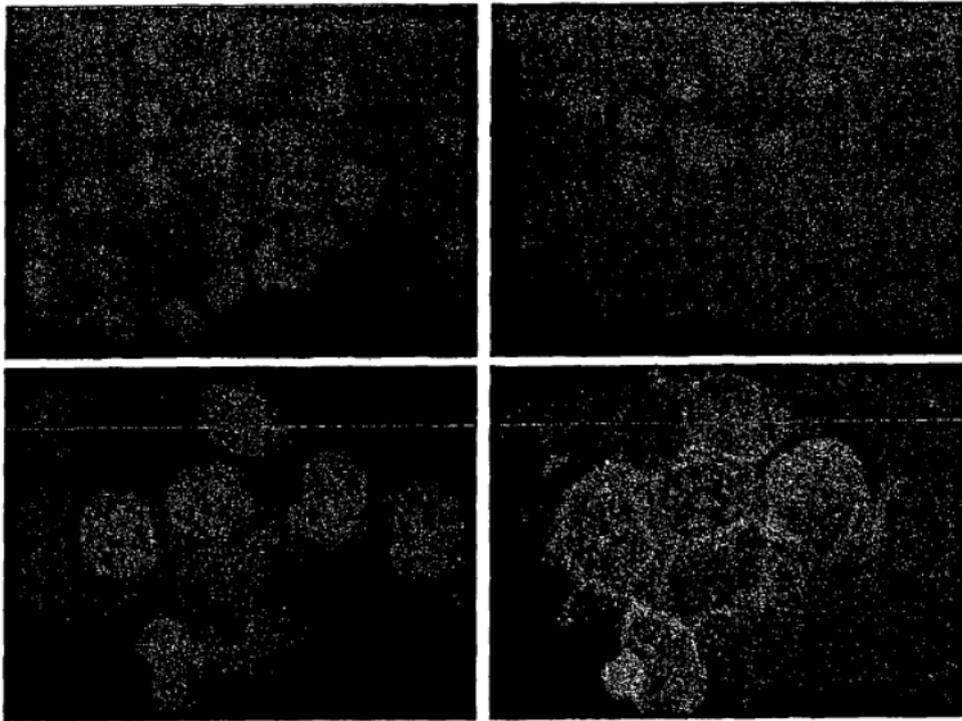


Fig. 14B

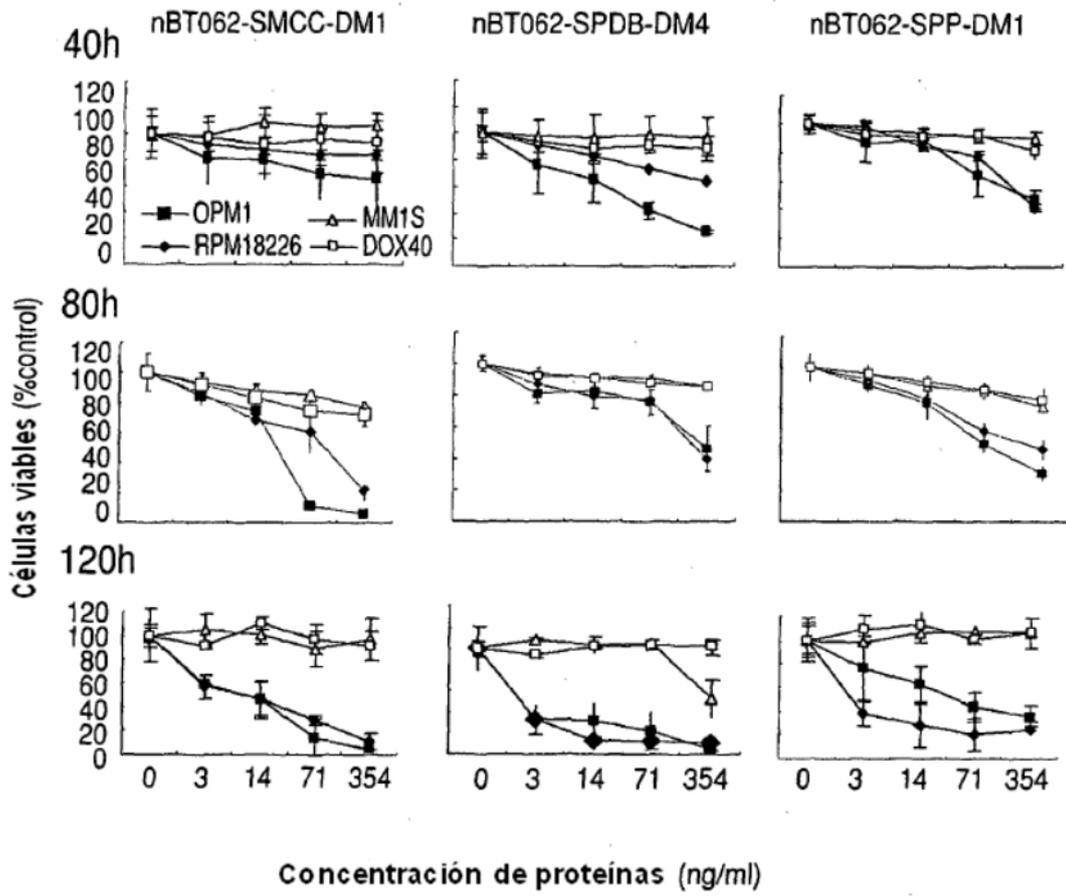


Fig. 15A

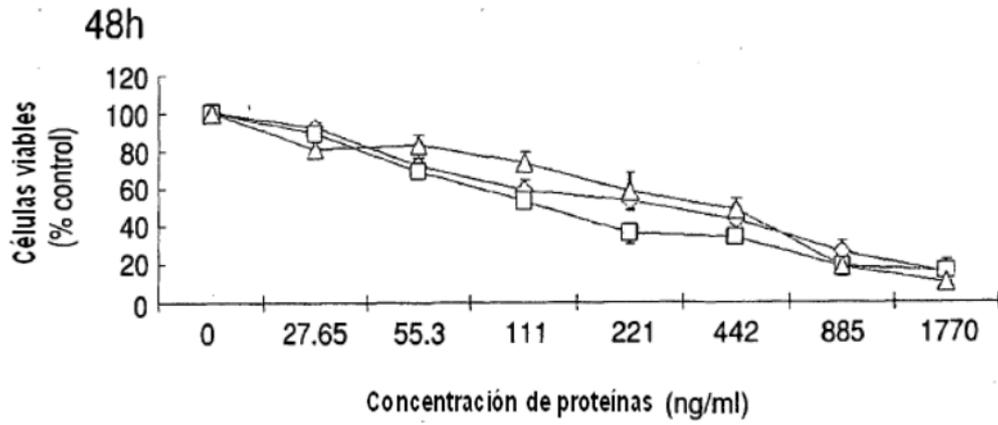


Fig. 15B

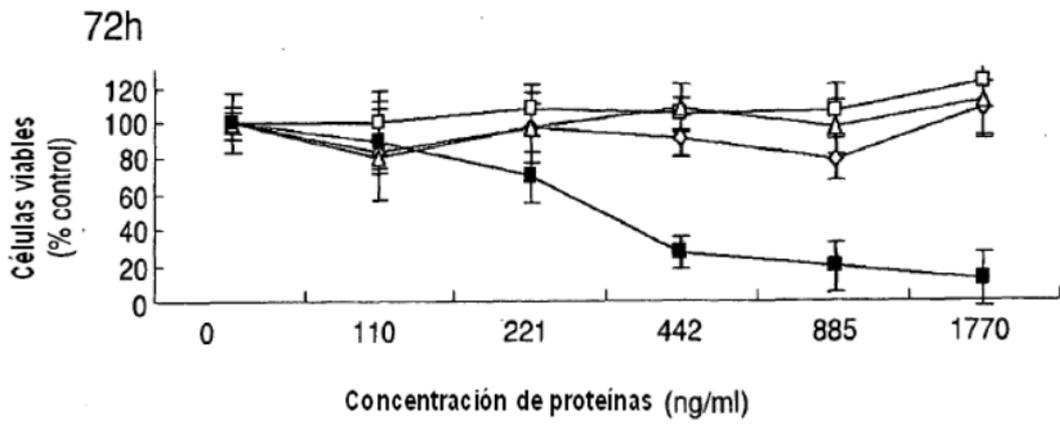
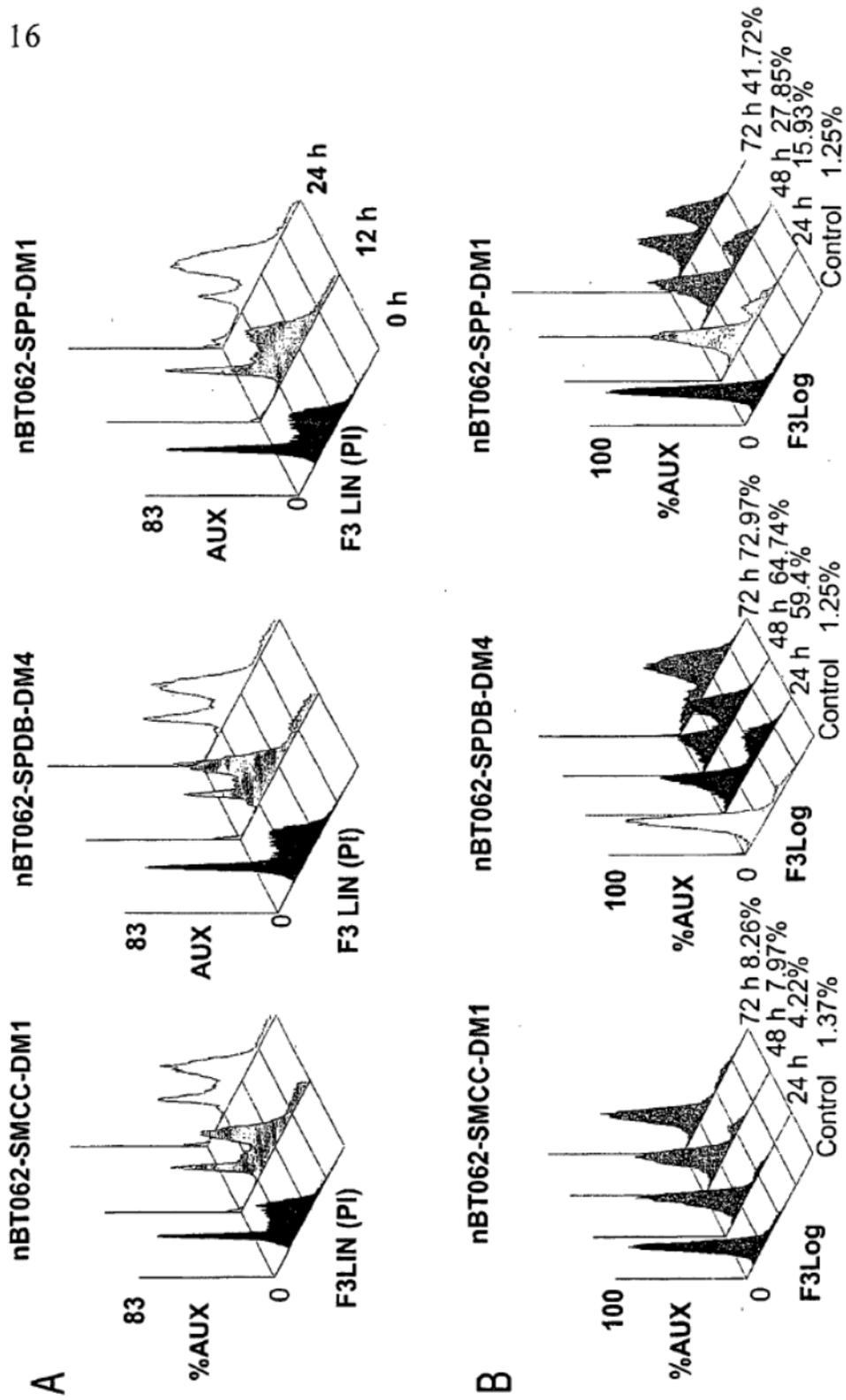


Fig. 15C

Fig. 16



nBT062-SPDB-DM4

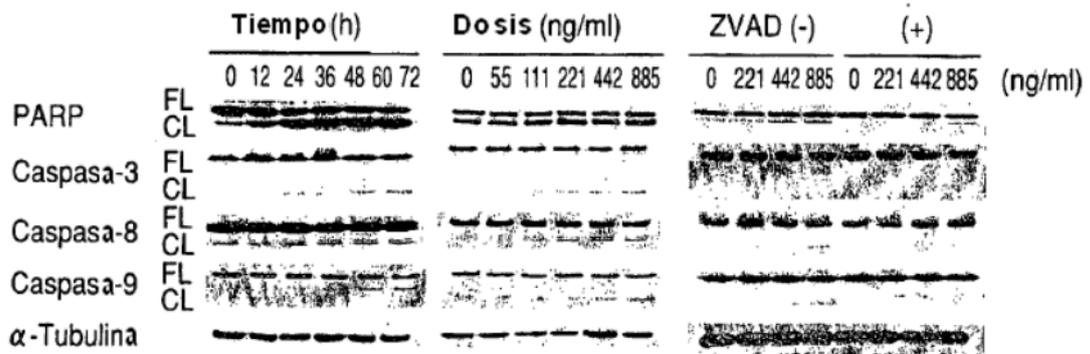
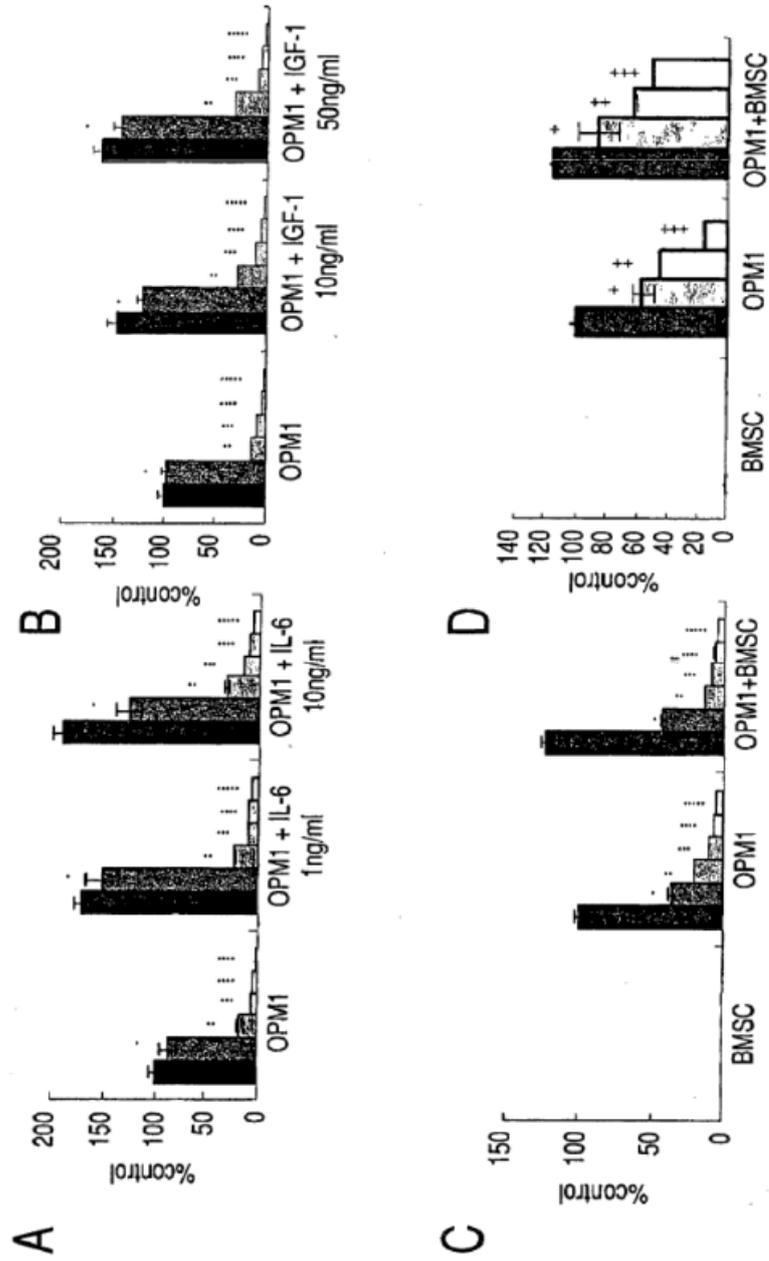


Fig. 16C

FIG. 17



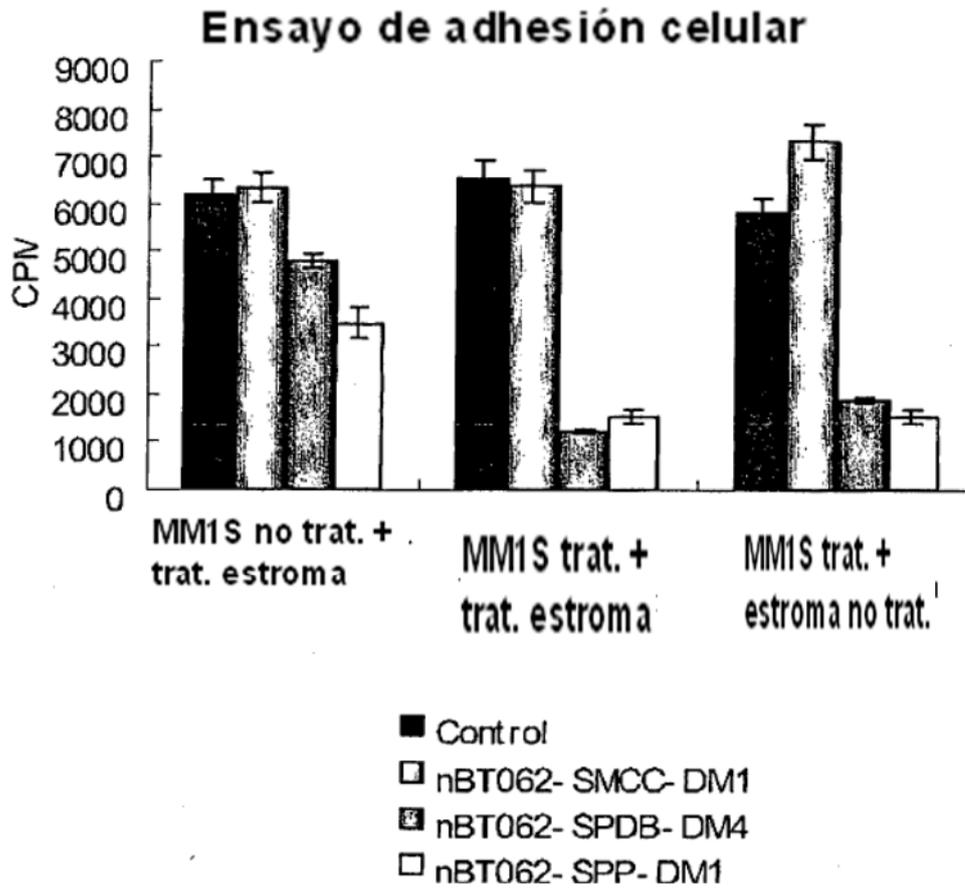


Fig. 17E

Fig. 18A

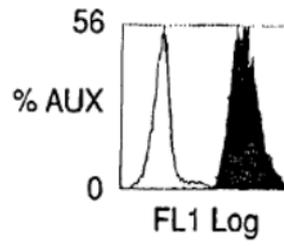


Fig. 18B

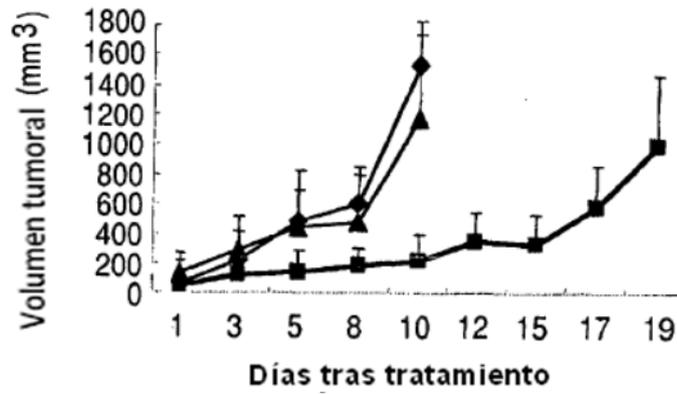


Fig. 18C

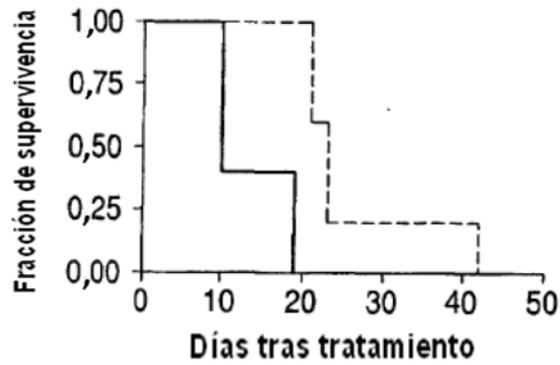


Fig. 18D

