

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 502**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2005 E 05818169 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1814913**

54 Título: **Formación de heridas en la membrana celular inducida por anticuerpos**

30 Prioridad:

**05.11.2004 US 625398 P**

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

**19.11.2015**

73 Titular/es:

**IGM BIOSCIENCES, INC. (50.0%)  
2041 Mission College Blvd., Suite 210  
Santa Clara, CA 95054, US y  
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BHAT, NEELIMA, M.;  
BIEBER, MARCIA, M.;  
TENG, NELSON, N., H. y  
SANDERS, MARTIN, E.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 551 502 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

Formación de heridas en la membrana celular inducida por anticuerpos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a usos para permeabilizar células, tratar trastornos cancerosos y autoinmunitarios y similares.

### Antecedentes de la invención

10 La formación de heridas en la membrana celular es una alteración de la membrana plasmática de las células y en general es un acontecimiento al que se puede sobrevivir. La formación de heridas en la membrana celular es un acontecimiento frecuente en los tejidos de mamíferos mecánicamente activos, tales como el revestimiento endotelial de la aorta o en el tracto gastrointestinal, los epitelios de la piel o los miocitos del músculo cardíaco o esquelético, y también se ha demostrado durante la invasión de las células por los tripanosomas. En el entorno de laboratorio, las heridas celulares se inducen típicamente usando medios mecánicos para desgarrar la membrana celular, tal como usando una microaguja para penetrar en la membrana plasmática o raspando una placa de cultivo para cortar una porción de una célula.

15 Para las roturas grandes, tales como desgarros > 1 µm en la membrana, se requiere una respuesta rápida de resellado para reparar la membrana y mantener la viabilidad celular. Inicialmente pensado como un proceso pasivo, ahora se reconoce que el resellado es un proceso dependiente de calcio y de energía, lo que tiene como resultado fusiones de vesícula exocitótica dependiente de calcio-vesícula y vesícula-membrana plasmática y que forman un parche en el desgarrado de la membrana. Las vesículas sacrificadas para proporcionar el parche de membrana ahora se conoce que son lisosomas. Por tanto, se añade membrana lisosomal interna es a la superficie de la célula para sellar el sitio de la rotura. Véase McNeil, P.L. (2002) J. Cell Sci. 115(5):873; Togo, T., et al. (1999) J. Cell Sci. 112:719; McNeil, P.L., y R. A. Steinhardt (2003) Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 19:697.

20 El proceso de reparación parece requerir despolimerización de la actina con el fin de permitir el acceso de los lisosomas a la membrana plasmática. Además, se piensa que los procesos contráctiles mediados por miosina y/o kinesina participan en el transporte de los lisosomas a la proximidad del desgarrado. Además, se sabe que los acontecimientos posteriores de resellado se producen más rápidamente que la respuesta inicial a la herida, probablemente por el aumento de la producción de los lisosomas en el aparato de Golgi. Por lo tanto el resellado de roturas grandes es dependiente de actina funcional y el complejo de Golgi para facilitar la evaluación de los lisosomas en el sitio de la herida, y restablecer reservas de lisosomas para participar en el proceso de reparación.

30 Así pues, aunque la herida de la membrana celular y la reparación posterior se conocen en la técnica, no hay ninguna enseñanza o sugerencia de inducción de formación de heridas en la membrana celular como herramienta de investigación o un enfoque terapéutico, por ejemplo, para permeabilizar las células a los agentes activos, o para matar las células malignas. Además, la posibilidad de utilizar un agente que se une a un antígeno de superficie celular para inducir formación de heridas en la membrana celular no se ha sugerido. Por último, no hay ninguna sugerencia de inducción de la membrana celular utilizando un anticuerpo para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente humano o animal. El documento WO 95/03770 A1, Twist Clare et al. (2003) Blood 102(11):380a y Bhat N. M. et al. (1996) Clinical and experimental Immunology 105(1):183 divulgan la muerte de células B utilizando el anticuerpo MAb 216 codificado por VH4-34. Bhat et al. (2001) Critical reviews in Oncology/Hematology 39(1-2):59 divulgan la toxicidad de los anticuerpos MAb 216 y Z2D2. El documento WO 2005/044998 divulga también la toxicidad de MAb216 para las células B. Ishigami T. et al. (1992) J. Immunol. 148(2):360 divulga la inducción de muerte celular por reticulación de la IgM asociada a la membrana celular. El anticuerpo MAb 216 está disponible en la ATCC como depósito HB11659, como se indica en el documento WO95/03770 A1.

### Sumario de la invención

45 De acuerdo con lo anterior, es un objeto principal de la invención abordar la necesidad mencionada anteriormente en la técnica proporcionando usos que utilizan la formación de heridas en la membrana celular inducidas por anticuerpos para tratar enfermedades o trastornos en pacientes humanos o animales.

Es otro objeto de la invención proporcionar composiciones para la inducción de formación de heridas en la membrana celular, utilizando agentes polivalentes para permeabilizar y / o matar a las células.

50 Es otro objeto de la invención proporcionar usos para la reticulación de un anticuerpo u otro agente polivalente para proporcionar formación potenciada de heridas en la membrana celular y/o muerte de las células.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar usos para el tratamiento de enfermedades y trastornos en pacientes humanos o animales mediadas por la hiperproliferación o hiperactividad celular.

La composición para inducir la formación de heridas en la membrana celular comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula.

Preferentemente, el antígeno de superficie celular se asocia con el citoesqueleto de la célula.

5 Una composición para permeabilizar una célula comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula. En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para permeabilizar una célula, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula.

En otra realización, la herida en la membrana celular no permite la supervivencia, al menos en parte, proporcionando el agente polivalente en una cantidad suficiente para continuar hiriendo a la célula de tal manera que la célula no consiga o ya no pueda reparar la herida.

10 De acuerdo con lo anterior, la composición para inducir formación de heridas en la membrana celular también puede funcionar como una composición para matar una célula. Además, la composición para matar una célula también es útil en un procedimiento para matar una célula. Preferentemente, la célula es maligna y está asociada con una neoplasia de un tejido corporal, tal como, por ejemplo, nervioso, linfóide, de ovarios, cervical, endometrial, testicular, de próstata, renal, de colon, de páncreas, de estómago, de intestino, de esófago, de pulmón, de tiroides, de glándula suprarrenal, de hígado, de hueso, de piel, de boca, de garganta, y similares. En una realización adicional, la célula es hiperactiva y la hiperactividad de la célula participa en una enfermedad o trastorno que se puede tratar mediante las composiciones divulgadas en el presente documento para matar la célula hiperactiva.

20 En una realización particular, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente humano que sufre una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación de células, que comprende administrar un agente polivalente que se une a un receptor de superficie celular altamente expresado en la superficie de las células hiperproliferativas, en el que dicho agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar preferentemente las células hiperproliferativas en relación con las células normales. Preferentemente, las células hiperproliferativas son células cancerosas. En otra realización, las células hiperproliferativas son estimuladas en un estado hiperproliferativo por factores de crecimiento, citocinas, infección viral, y similares.

25 En una realización preferida, la cantidad de agente polivalente eficaz para destruir preferentemente las células hiperproliferativas es una cantidad que es al menos suficiente para saturar los receptores de la superficie celular de las células hiperproliferativas. En una realización más preferida, la cantidad de agente polivalente eficaz para destruir preferentemente las células hiperproliferativas es suficiente para saturar los receptores de la superficie celular de las células normales que poseen el antígeno de superficie celular altamente expresado al tiempo que se mantiene la viabilidad de las células normales dentro de intervalos aceptables para la salud del paciente. La destrucción preferencial de las células hiperproliferativas en relación con las células normales generalmente se consigue proporcionando una cantidad de agente polivalente suficiente para reducir la viabilidad de las células hiperproliferativas pero que no es suficiente para reducir la viabilidad de las células normales en la misma medida. Por ejemplo, la utilización de un anticuerpo de formación de heridas en la membrana celular, la viabilidad de las células neoplásicas se puede reducir en una cantidad que es al menos diez por ciento mayor, más preferentemente veinte por ciento mayor, e incluso más preferentemente, el treinta por ciento mayor o más, en relación a la viabilidad de las células normales, incluso cuando tanto las células neoplásicas como las células normales expresan el mismo antígeno de superficie celular en sus superficies respectivas.

40 De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un procedimiento para matar las células cancerosas, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad citotóxica de un anticuerpo que induce la formación de heridas en la membrana celular en las células cancerosas. La citotoxicidad por heridas en la membrana celular es distinta de la citotoxicidad mediada por complemento o de la citotoxicidad mediada celular. En una realización adicional, el anticuerpo que induce la formación de heridas en la membrana celular es citotóxico para las células del cáncer por un mecanismo de formación de heridas en la membrana celular, así como un mecanismo de citotoxicidad mediada por el complemento y/o células.

El agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar células B neoplásicas rápidamente, pero no mata las células normales. En otra realización, el agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar las células hiperproliferativas, pero no para matar células que muestran la motilidad normal o las propiedades normales de adhesión.

50 En ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento comprende además administrar un agente citotóxico en combinación con el agente polivalente que se une a un receptor de superficie celular altamente expresado en la superficie de las células hiperproliferativas. El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico, un isótopo radiactivo, un anticuerpo citotóxico, un inmunocombinado, un conjugado de ligando, un inmunosupresor, un regulador y / o inhibidor del crecimiento celular, una toxina, o sus mezclas.

55 En una realización adicional, el procedimiento comprende además administrar un agente de reticulación que proporciona la reticulación del anticuerpo inductor de heridas en la membrana celular. Preferentemente, el agente de reticulación es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-kappa, un anticuerpo anti-lambda, un anticuerpo anti-mu, o similares.

En una realización particular, la célula cancerosa es una célula B neoplásica y el anticuerpo inductor de heridas en la membrana celular es un anticuerpo VH4-34. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inductor de heridas en la membrana celular es un anticuerpo VH4-34 y el agente de reticulación es un anticuerpo anti-VH4-34 que no impide la unión del anticuerpo VH4-34 al antígeno de la superficie celular sobre la célula B.

5 Se proporciona un procedimiento para inducir la formación de heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula, en el que la célula es una célula linfocítica. El agente polivalente es un anticuerpo y la célula linfocítica es una célula B que expresan el epítipo CDIM. El anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inducir heridas preferentemente en las células B hiperproliferativas en relación con las células B normales. En una realización adicional, el anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inducir heridas en células B hiperproliferativas, pero no para matarlas.

15 En una realización particular, el procedimiento comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas y las células B normales para inducir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para inducir heridas y / o matar preferentemente a las células B hiperproliferativas en el paciente. El procedimiento puede comprender además la titulación en cantidades adicionales de anticuerpo al paciente para lograr la cantidad deseada de producción de heridas y / o muerte celulares.

20 En una realización adicional, el procedimiento comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas para inducir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para inducir heridas en las células B hiperproliferativas en el paciente. El procedimiento puede comprender además la administración de una cantidad eficaz de un agente citotóxico al paciente para lograr una reducción deseada en el número de células B hiperproliferativas en el paciente.

25 En otras realizaciones se proporcionan procedimientos para inducir heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula, en el que la célula puede ser cualquier célula que expresa un antígeno de superficie celular altamente expresado. Por lo tanto, la célula puede ser un tipo de célula diferente de una célula linfocítica, o puede ser un tipo de célula distinta de una célula B. En otra realización el antígeno de superficie celular altamente expresado no es el epítipo CDIM.

30 En una realización adicional se proporciona una composición para inducir heridas en la membrana celular, que comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado, en el que la composición para inducir heridas en la membrana celular puede comprender además un agente de reticulación que aumenta la citotoxicidad del agente relativo polivalente con respecto a la citotoxicidad del agente polivalente en ausencia del agente de reticulación.

35 En una realización concreta, el agente polivalente es un anticuerpo, preferentemente una IgM. En otra realización particular, el agente de reticulación es un anticuerpo que une IgM, proporcionando reticulación de la IgM unida a la superficie de la célula.

40 En otra realización se proporciona un procedimiento para inducir heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula. El procedimiento puede comprender además poner en contacto la célula con un agente de reticulación que aumenta la citotoxicidad del agente polivalente con respecto a la citotoxicidad del agente polivalente en ausencia del agente de reticulación. En una realización preferida, el agente polivalente es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo IgM, y el agente de reticulación es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo que une IgM, proporcionando reticulación del anticuerpo unido a la superficie de la célula. Preferentemente, la célula es una célula B y el anticuerpo es una IgM con especificidad de unión por un epítipo CDIM en la superficie de la célula B. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CDIM y el agente de reticulación se une al anticuerpo anti-CDIM, proporcionando la reticulación del anticuerpo anti-CDIM unido a la superficie de la célula B. El agente de reticulación es preferentemente un anticuerpo anti-kappa o anti-lambda o un anticuerpo anti-VH4-34.

45 En otra realización, se proporciona una composición matar células hiperproliferativas, que comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie de la célula altamente expresado presente en la superficie de una célula, en el que dicho agente polivalente comprende medios de reticulación que proporciona un agente polivalente reticulado unido a la superficie de la célula. El agente polivalente reticulado proporciona una mayor destrucción de las células hiperproliferativas en comparación con el agente polivalente en ausencia de dichos medios de reticulación.

55 En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para tratar un mamífero que sufre una afección caracterizada por la hiperproliferación de células, comprendiendo dicha composición farmacéutica un agente

5 polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula. La composición farmacéutica puede comprender además un agente citotóxico. Preferentemente, la composición comprende además medios de reticulación que aumentan la citotoxicidad del agente polivalente. Preferentemente, el agente polivalente mata las células hiperproliferativas mediante la inducción de heridas en la membrana celular que la célula no puede reparar.

10 En una realización particular, los medios de reticulación pueden ser un agente de reticulación monofuncional covalentemente unido al agente polivalente que se une al antígeno de superficie celular altamente expresado en la célula. El agente de reticulación puede comprender una funcionalidad de reticulación tal como una succinimida, maleimida o tiol o similar en el extremo distal del agente de reticulación para reticular con un agente polivalente adyacente unido al antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula. Preferentemente, el agente polivalente es un anticuerpo, tal como un anticuerpo natural, incluyendo IgM, IgG, IgA, IgD, IgE; un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, tal como un anticuerpo tetravalente o proteína de fusión que comprende un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo tal como Fab2, scFv, y similares. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es una IgM.

15 En una realización adicional, los medios de reticulación pueden ser un agente de reticulación que se une a un anticuerpo. En una realización preferida, el medio de reticulación significa es un agente anti-kappa o anti-lambda que reticula anticuerpos adyacentes unidos al antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula.

20 En aún otra realización, el medio de reticulación puede un polímero hidrófilo o una red de polímeros, que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 daltons, que portan una pluralidad de agentes polivalentes con unión específica para el antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula, tales como anticuerpos, o porciones de anticuerpos, por ejemplo, Fab, scFv.

25 El agente polivalente que se une al antígeno de superficie celular altamente expresado se une preferentemente con alta afinidad. Típicamente, la unión de alta afinidad es al menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , y preferentemente está entre aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

30 En una realización adicional, se proporciona una composición farmacéutica para tratar a un mamífero que sufre una afección caracterizada por la hiperproliferación de células, que comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula, en el que dicho agente polivalente comprende una pluralidad de sitios de unión para el antígeno de superficie celular en la superficie de la célula. Preferentemente, la pluralidad de los sitios de unión es al menos cinco, y más preferentemente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100. En realizaciones particulares, la pluralidad de los sitios de unión puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50.

35 Preferentemente, el agente polivalente que comprende una pluralidad de sitios de unión para el antígeno de superficie celular proporciona una citotoxicidad aumentada de las células hiperproliferativas que se asocia con un mayor número de sitios de unión.

Los objetos adicionales, ventajas y nuevas características de la invención se expondrán en parte en la descripción siguiente y en parte serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de lo siguiente, o pueden aprenderse por la práctica de la invención.

#### 40 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 ilustra que los anticuerpos codificados por VH 4-34 se unen linfomas primarios y leucemias de células B.

La FIG. 2 ilustra que los anticuerpos monoclonales codificados por VH 4-34 se unen y matan líneas de células B humanas.

45 La FIG. 3 ilustra la variabilidad de la citotoxicidad de mAb 216 por las células de linfoma folicular.

La FIG. 4 ilustra que la muerte de las células B por el mAb 216 y vincristina es sinérgica.

La FIG. 5A ilustra el curso temporal de la aparición de Lamp-1 en la superficie de las células B tratadas con mAb 216 en comparación con el curso temporal de la pérdida de la viabilidad celular.

50 La FIG. 5B ilustra el curso temporal de la liberación de ATP de las células dañadas en comparación con el número de células viables.

La FIG. 6A ilustra la viabilidad de las células tratadas con dos anticuerpos VH4-34 en medio con y sin calcio.

La FIG. 6B ilustra la viabilidad de las células tratadas con agentes citotóxicos.

La FIG. 7 ilustra la citotoxicidad adicional de mAb cuando el anticuerpo está reticulado.

La FIG. 8 ilustra la citotoxicidad dependiente de la dosis de un anticuerpo que induce heridas en la membrana celular.

Las FIG. 9 A y B ilustran la eficacia del tratamiento con mAb216 y vincristina en pacientes humanos.

## 5 **Descripción detallada de la invención**

### I. Definiciones y visión general

Antes de describir la presente invención con detalle, se debe entender que a menos que se indique otra cosa, esta invención no se limita a tampones particulares, excipientes, agentes quimioterapéuticos, o similares concretos, como tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria descriptiva es para el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención.

Cabe destacar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "uno", "una" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente quimioterapéutico" incluye dos o más agentes quimioterapéuticos; referencia a "un excipiente farmacéutico" incluye dos o más excipientes farmacéuticos, etcétera.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de una unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado, entra dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también entran dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o los dos límites incluidos también están incluidos en la invención.

Las expresiones "anticuerpo anti-CDBVI" y "anticuerpo de unión a CDIM" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene unión específica por los epítomos CDIM en una célula B. Estos términos se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento.

La expresión "anticuerpo anti-VH4-34" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo presente en la región variable de un anticuerpo codificado por el gen VH4-34, un anticuerpo VH4-34 y, como tal, puede incluir la secuencia de la línea germinal de las denominadas regiones hipervariables o "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR") del anticuerpo VH4-34. Sin embargo, el epítipo no es un marcador de una inmunoglobulina única formado por hipermutación somática, tal como una CDR de línea no germinal. En una realización preferida, el epítipo está presente en la región marco del anticuerpo, y preferentemente no incluye la CDR del anticuerpo. En una realización preferida adicional, el anticuerpo anti-VH4-34 no interfiere con la unión específica del anticuerpo VH4-34 a su antígeno.

El término "9G4" se refiere al anticuerpo monoclonal de rata que se ha demostrado que reconoce el Ab VH4-34 (Stevenson, et al. Blood 68: 430 (1986)). El epítipo VH4-34 identificado por el mAb 9G4 está restringido en la conformación y depende de una secuencia única cerca de los aminoácidos 23-25 en la región marco 1 ("FR1") de la cadena pesada variable. 9G4 es una especie de anticuerpo anti-VH4-34.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos intactos naturales, los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos sintéticos, tales como anticuerpos tetravalentes, y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos humanos incluyen anticuerpos producidos en especies no humanas. El término anticuerpo también abarca moléculas de Ig formadas solo de cadenas pesadas, tales como los obtenidos a partir de Camélidos, y descritos en las patentes de EE.UU. N° 6.765.087 y 6.015.695 de Casterman, por ejemplo. El término anticuerpo también abarca la fusión o acoplamiento químico (es decir, conjugación) de anticuerpos con agentes citotóxicos o de regulación celular.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o una región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de dichos fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata, et al. (1995) Protein Eng. 8(10),1057-1062) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio

antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que se sintetizan mediante cultivo de hibridoma, no contaminados con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler, y col., (Nature 256:495, 1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) Nature, 352, 624-628 y Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222, 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) En los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison, y col. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, camelo, bovino, cabra o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias estructurales. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar y optimizar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al, (1986) Nature 321, 522-525.; Reichmann et al, (1988) Nature 332, 323-329; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593 a 596. El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™ en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido mediante inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo determinado mediante el procedimiento de Lowry y, lo más preferentemente, más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos internos o en el extremo N de la secuencia de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. No obstante, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará en al menos una etapa de purificación.

Un agente que "detiene el crecimiento de" o un "agente inhibidor del crecimiento" como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento o proliferación de una célula, especialmente un tipo de célula neoplásica que expresa un antígeno de células B tal como el antígeno CD20 según se requiera. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que, por ejemplo, reduce significativamente el porcentaje de células neoplásicas en fase S.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado.

El antígeno "CD20" es una fosfoproteína no glicosilada de 35 kD que se encuentra en la superficie de más de 90 % de las células B de sangre periférica o de órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. El CD20 está presente tanto en células B normales así como células B malignas. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen "antígeno restringido a los linfocitos "" y "Bp35." El antígeno CD20 se describe en Clark et al. PNAS (USA) 82:1766 (1985), por ejemplo.

El término "herida celular" se refiere a un evento de rotura de la membrana plasmática al que se puede sobrevivir marcada por la absorción en el citosol de un trazador normalmente impermeable a la membrana. Las roturas de heridas celulares normalmente están en el intervalo de entre aproximadamente 1 y 1.000  $\mu\text{m}^2$  y, por lo tanto, son mucho más grandes que las roturas en la membrana que acompaña a la citotoxicidad mediada por el complemento o la perforina o incluso grandes poros formados por toxinas o agentes formadores de poros tales como gramicidina o alfa toxina de *Staphylococcus aureus*. Las heridas en las células se detectan mediante el mecanismo de reparación celular que se manifiesta como resultado de la herida, es decir, la expresión de Lamp-1 en la superficie celular como resultado de la fusión lisosomal para reparar la herida.

El término "anticuerpo de formación de herida celular" o "anticuerpo de formación de herida en la membrana celular" se refiere a un anticuerpo, que, tras la unión a un antígeno de superficie celular altamente expresado, provoca un suceso de rotura en la membrana plasmática al que se puede sobrevivir marcado por la absorción en el citosol de un trazador normalmente impermeable a la membrana. Los anticuerpos de formación de heridas provocan que el mecanismo de reparación celular se manifieste como resultado de la herida, es decir, la expresión de Lamp-1 en la superficie celular como resultado de la fusión lisosomal para reparar la herida.

La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer u otra afección que se caracteriza por una hiperproliferación de las células.

Los términos "agente citotóxico" y "citotóxica" tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una sustancia que inhibe o detiene el crecimiento de, inhibe o previene la función de las células y / o causa la muerte de las células. Se pretende que el término incluya uno o más isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos, inmunosupresores, reguladores del crecimiento celular y / o inhibidores, que pueden ser terapéuticos moleculares, anticuerpos citotóxicos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos. El término también incluye inmunoconjugados que comprenden anticuerpos marcados con toxinas o isótopos radiactivos para la unión a una célula diana específica, así como otros conjugados de ligando, tales como ligandos radiomarcados, y ligandos marcados con toxina. Además, pueden usarse uno o más agentes citotóxicos en combinación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la terapia de combinación descrita en el presente documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen cáncer, neoplasias malignas hematológicas, leucemias y neoplasias malignas linfoides y enfermedades autoinmunes, tales como trastornos inflamatorios e inmunológicos.

La expresión "antígeno de superficie celular altamente expresado" se refiere a un antígeno de superficie accesible en la superficie de la célula (es decir, que no requiere la permeabilización celular para exhibir unión) que está presente en al menos  $10^4$  copias por célula, o que está presente en al menos una parte de la célula a una densidad de por lo menos 25 copias/ $\mu\text{m}^2$ . Los antígenos de superficie celular incluyen moléculas expresadas en la superficie celular, tales como receptores, inmunoglobulinas, citocinas, glicoproteínas, etc.

Los términos "hiperproliferación" y "hiperproliferativo" se refieren al crecimiento anormal de un tipo de célula, que puede ser cancerosa o benigna. Generalmente, las células hiperproliferativas exhiben una tasa de división celular que es al menos aproximadamente un diez por ciento mayor que la tasa de división celular exhibida por las células normales de ese tipo celular. Hiperproliferación incluye la expansión policlonal de las células B secretoras de anticuerpos que median en las enfermedades autoinmunes.

El término "inmunconjugados" se refiere a anticuerpos conjugados con agentes citotóxicos, que pueden estar asociados covalente o no covalentemente.

La expresión "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un agente en la vena de un animal o paciente humano durante un período de tiempo, generalmente mayor que aproximadamente 15 minutos, y más generalmente entre aproximadamente 30 a 90 minutos.

La expresión "bolo intravenoso" o "impulso intravenoso" se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o ser humano de tal manera que el cuerpo reciba el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, generalmente 5 minutos o menos.

5 El término "mamífero" a los efectos del tratamiento se refiere a cualquier especie de mamíferos, incluidos seres humanos, animales domésticos y de granja y zoológico, de deportes, mascotas o animales salvajes. Cuando el antígeno de superficie celular es el antígeno CDIM, la expresión del antígeno CDIM no debe expresarse en los eritrocitos de las especies de mamíferos si debe evitarse la hemaglutinación. Preferentemente, el antígeno CDIM está restringido predominantemente a las células de linaje de células B después del nacimiento.

10 El anticuerpo anti-CD20 humanizado referido como anticuerpo anti-CD20 "marca RITUXAN<sup>®</sup>" es un anticuerpo monoclonal quimérico murino / humano modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la patente de EE.UU. 5.736.137 presentado el 7 de abril de 1998. La marca RITUXAN<sup>®</sup> del anticuerpo C2B8 está indicado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin DE CÉLULAS b POSITIVO PARA CD20, folicular o de bajo grado recidivante o resistente.

15 La expresión "unión específica" se refiere la propiedad de tener una alta afinidad de unión de al menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , y normalmente entre aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un agente bajo la piel de un animal o paciente humano, preferible dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante liberación sostenida relativamente lenta de un receptáculo de fármacos. El bolsillo se puede crear mediante punción o estirado de la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente.

20 La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración del fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, donde la administración de fármacos en bolo es preferentemente menor que aproximadamente 15 minutos, más preferentemente menor de 5 minutos, y lo más preferentemente menor de 60 segundos. La administración es preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente.

25 La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante liberación sostenida y relativamente lenta, desde un receptáculo de fármaco durante un período de tiempo incluyendo, pero no limitado a, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede realizarse mediante implantación subcutánea de una bomba de liberación de fármacos implantada bajo la piel del animal o paciente humano, en el que la bomba libera una cantidad predeterminada de fármaco durante un período predeterminado de tiempo, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

30 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza para hacer referencia a una cantidad de un agente activo que tiene un efecto de detención del crecimiento o provoca la muerte de la célula. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz tiene la propiedad de permeabilizar las células, inhibir la señalización de la proliferación, inhibir el metabolismo celular, estimular la actividad apoptótica o inducir la muerte celular. En aspectos particulares, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una concentración en suero de la diana que ha demostrado ser eficaz en , por ejemplo, frenar la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir de formas convencionales, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, en los cánceres linfoides, la eficacia se puede medir mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y / o la determinación de la tasa de respuesta (RR).

40 Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" y similares tal como se utilizan en el contexto de la presente invención, se entiende que incluyen medidas terapéuticas, así como profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno que conducen a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, sin limitaciones, alivio de uno o más síntomas, regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, evitando de este modo o eliminando todos los signos de la enfermedad o trastorno. Como  
45 otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un agente después de la aparición y después de que los síntomas clínicos se han desarrollado, en la que la administración afecta a los parámetros clínicos de la enfermedad o trastorno, tales como el grado de lesión tisular o la cantidad o extensión de la metástasis, conduzca el tratamiento o no a la mejora de la enfermedad, comprende "tratamiento" o "terapia" en el  
50 contexto de la invención.

## II. Anticuerpos de formación de heridas en la membrana celular

Los anticuerpos VH4-34 (región variable pesada) son uno de los 53 anticuerpos de la línea germinal de anticuerpos funcionales humanos identificados, codificados por los genes de la línea germinal (VH4.21). Cook, G.P., et al.,  
55 (1994) Nat. Genet. 7, 162-168. El gen para los anticuerpos VH4-34 está presente en todos los haplotipos y no se ha comunicado una variación de la secuencia en el ADN de la línea germinal aislado de individuos no relacionados. Weng, N.P., et al., (1992) Eur. J. Immunol. 22,1075-1082; van der Maarel, S., et al., (1993) J. Immunol. 150, 2858-2868. Los anticuerpos codificados por el gen VH4-34 han demostrado poseer propiedades únicas. Todos los

anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos "I" o "i" de los glóbulos rojos (GR) están codificados por el gen VH4-34, son generalmente de la clase IgM, y clásicamente se describen como aglutininas frías (CA) ya que aglutinan los glóbulos rojos a 4 °C. Pascual, V., et al., (1991) J. Immunol. 146,4385-4391; Pascual, V., (1992) J. Immunol. 149, 2337-2344; Silberstein, L.E., et al., (1991) Blood 78,2372-2386. Los ligandos reconocidos por las CA son glicoconjugados lineales o ramificados presentes en proteínas y / o lípidos de los GR. Los GR de recién nacidos y de la sangre del cordón poseen el antígeno i lineal. La cadena I ramificada se genera después del nacimiento. Pruzanski, W. et al., (1984) Clin. Immunol. Rev. 3,131-168; Roelcke, D. (1989) Transfusion Med. Rev. 2,140-166. El antígeno "i" reconocido en las células B humanas es un determinante lactosamina lineal que es sensible a la enzima endo-beta-galactosidasa. El análisis de secuencias de las células VH4-34 anti-B /mAb anti-i derivadas de forma independiente ha mostrado que están en la configuración de la línea germinal. Bhat N.M., et al., (1997) Clin. Exp. Immunol. 108, 151-159.

In vivo, la expresión de anticuerpos derivados del gen VH4-34 está estrictamente regulada. Aunque el 4-8 % de las células B humanas expresan el anticuerpo codificado por VH4-34, los niveles séricos de los anticuerpos derivados VH4-34 son insignificantes en adultos normales Stevenson F.K., et al., (1989) Br. J. Haematol.72, 9-15; Kraj P, et al., (1995) J. Immunol. 154,6406-6420. El aumento de los anticuerpos circulantes derivados de VH4-34 solo se ve en afecciones patológicas selectivas, incluyendo infecciones virales (virus de Epstein Barr (mononucleosis), virus de la inmunodeficiencia humana y virus de la hepatitis C), *Mycoplasma pneumoniae* y ciertas enfermedades autoinmunes. Véase también Bhat, N. M., et al. (2005) Human Antibodies 13, 63-68.

Los presentes inventores han estudiado extensamente los anticuerpos codificados por VH4-34 y su papel en los trastornos autoinmunes. En estudios anteriores demostraron que algunos anticuerpos de VH4-34 anti-células B son citotóxicos para las células B y dan lugar a una disminución de la proliferación de células B Bhat, N. et al (1997) Clin. Exp. Immunol. 108:151; Bhat, N., et al., (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39, 59. La citotoxicidad se demostró que es independiente del complemento y que es altamente dependiente de la temperatura, lo que tiene como resultado una mayor muerte celular y la formación de defectos en la membrana plasmática, tales como ampollas y poros en la superficie celular cuando se trata a 4 °C. Se mostró que los defectos en la membrana plasmática eran significativamente más grandes que los poros formados por otras proteínas formadoras de poros bien conocidas, tales como el componente C9 del complemento (~100 Å) y perforina (~160 Å). Se sugirió que la citotoxicidad puede estar mediada por un nuevo mecanismo.

Los presentes inventores han hecho el descubrimiento sorprendente e inesperado que estos anticuerpos derivados de los genes VH4-34 pueden inducir heridas en la membrana celular en las células B, que son distintas de los grandes defectos en la membrana plasmática observados en las células muertas por anticuerpos anti-CDIM notificados anteriormente (Bhat, N. et al. (1997) Clin. Exp. Immunol. 108:151; Bhat, N., et al., (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39, 59). Aunque el anticuerpo provoca poros y defectos en la membrana en las células en ciertas condiciones, cuando se tratan a concentraciones subletales, algunas de las células B son meramente dañadas y son capaces de reparar la herida en algunos casos. Aunque lesión en la membrana es una amenaza común a la que enfrentan las células de mamífero nucleadas, el hecho de que un anticuerpo podría ser la causa directa de la lesión de la membrana es novedoso.

Además, los presentes inventores han demostrado que la herida inducida por el anticuerpo en la membrana celular se repara de manera similar a cualquier otra herida en la membrana. Las células tratadas con estos anticuerpos citotóxicos independientes del complemento intentan reparar la herida en la membrana plasmática inducida por los anticuerpos utilizando la fusión lisosomal con la membrana plasmática para poner un parche en herida de la membrana, lo que resulta en la aparición de proteínas de la membrana lisosomal en la superficie celular. También se demuestra que cuando las células no son capaces de reparar el daño, en última instancia se produce la muerte.

Además, los presentes inventores han descubierto que las células heridas se permeabilizan, al menos transitoriamente, y se hacen más susceptibles a la acción de agentes citotóxicos adicionales, que proporcionan nuevas opciones de tratamiento que tienen una eficacia mejorada para el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos y animales. La herida en la membrana celular tiene como resultado la permeabilización de las células B y permite la entrada de agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos, de modo que aumenta la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, incluso en las células que son resistentes o impermeables a tales agentes, o en células que los transportan activamente fuera de la célula.

Debido a que el mecanismo de la muerte celular y la formación de heridas proporcionado por los anticuerpos que se unen a CDIM es diferente del mecanismo citotóxico utilizado por los anticuerpos citotóxicos convencionales (destrucción mediada por el complemento o las células), la combinación de los anticuerpos que se unen a CDIM con inmunoterapias convencionales puede proporcionar una mejora de la eficiencia de la destrucción por los anticuerpos citotóxicos de unión a antígenos de células B adicionales, especialmente en condiciones de inmunodeficiencias tales como depleción o deficiencia del complemento.

Además, la acción de los anticuerpos que producen heridas celulares puede mejorarse mediante la adición de un agente de reticulación que aumenta la citotoxicidad de los anticuerpos con respecto a la citotoxicidad de los anticuerpos en ausencia del agente de reticulación. Esta observación es distinguible de la apoptosis inducida por hiperreticulación, por ejemplo, notificado por Marches, R., et al. (1995) Ther. Immunol. 2, 125, lo que indica que la

reticulación de la IgM y la señalización resultante puede ser un factor importante en la inducción y mantenimiento de la latencia y la apoptosis después de la hiperreticulación.

En una forma de realización preferida, los anticuerpos de acuerdo con un aspecto de la invención son anticuerpos monoclonales codificados por VH4-34 que se unen al epítipo CDIM en las células B humanas, tal como se describe en Grillo-Courvalin, C., et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22, 1781-1788; Bhat, N.M., et al. (1993) J. Immunol. 151, 5011-5021; Silberstein, L.E., et al. (1996) Blood Cells, Molecules, and Diseases, 22, 126-138, y como se ilustra en las FIGS. 1 y 2. Estos anticuerpos son células B citotóxicas obtenidas de pacientes con linfoma folicular en recaída, como se ilustra en la FIG. 3. Además, los anticuerpos son citotóxicos para las líneas B celulares, como se muestra en la FIG. 4. En una realización preferida, estos mAb se producen mediante fusión de linfocitos humanos y una línea celular de heteromioma, que produce un hibridoma secretor de anticuerpo humano. Por ejemplo, mAb 216 es una IgM humana codificada por el gen VH4-34 y es una realización preferida de los anticuerpos VH4-34 de unión a CDIM descritos en el presente documento. MAb 216 se describe en las patentes de EE.UU. N° 5,593,676 y 5,417,972 y el documento EP 712 307 B1 d Bhat, et al.

Los anticuerpos adicionales derivados de VH4-34 que se unen al epítipo CDIM incluyen RT-2B, FS 12, A6 (H4C5), Cal-4G, S20A2, FS 3, Gee, HT, Z2D2, Y2K. Algunos de estos anticuerpos se caracterizan por una secuencia de CDR3 rica en residuos de aminoácidos básicos, y por unión particularmente fuerte cuando la carga neta de la CDR3 es +2. En consecuencia, cualquier anticuerpo que posea una CDR neta positiva, en particular CDR3, y que exhiba unión a epítipo CDIM, se incluye dentro del alcance de la invención y como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que cualquier anticuerpo que se une al epítipo CDIM y exhibe citotoxicidad para una célula B se incluye dentro del alcance de los anticuerpos que se unen a CDIM descritos en el presente documento.

### III. Procedimientos y composiciones para inducir la producción de heridas en la membrana celular

Una composición para inducir la producción de heridas en la membrana celular comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula. Preferentemente, el antígeno de superficie celular se asocia con el citoesqueleto de la célula. Por ejemplo, el antígeno de superficie celular permanece asociado con la célula después de la eliminación de los componentes solubles mediante extracción con detergente. La herida en la membrana celular es una lesión de la membrana a la que se puede sobrevivir reparado por fusión lisosomal, detectable por la aparición o la expresión de proteínas lisosomales en la superficie de la célula, y tiene como resultado una permeabilización de la célula al menos transitoria.

Una composición para permeabilizar una célula comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para permeabilizar una célula, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula.

En otras realizaciones se proporcionan procedimientos para inducir heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula, en el que la célula puede ser cualquier célula que expresa un antígeno de superficie celular altamente expresado. Por lo tanto, la célula puede ser un tipo de célula diferente de una célula linfocítica, o puede ser un tipo de célula distinta de una célula B. En otra realización el antígeno de superficie celular altamente expresado no es el epítipo CDIM.

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento también abarcan el uso de un agente polivalente de formación de heridas en la membrana celular, particularmente un anticuerpo formador de heridas en la membrana celular, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por una hiperproliferación de las células.

### IV. Procedimientos y composiciones para matar y / o inhibir el crecimiento de células

En otra realización, la herida en la membrana celular no permite la supervivencia, al menos en parte, proporcionando el agente polivalente en una cantidad suficiente para continuar hiriendo a la célula de tal manera que la célula no consiga o ya no pueda reparar la herida. La herida celular que es letal puede lograrse proporcionando el agente polivalente en una cantidad en exceso suficiente en relación con el número de antígenos de superficie celular altamente expresados presentes en la superficie de la célula, de tal manera que la reparación de la membrana no es eficaz o no se puede mantener. La herida en la célula que es letal también puede conseguirse proporcionando un agente que bloquea o interfiere con el mecanismo de reparación, tal como un agente anti-actina o un agente que afecta a la asociación del receptor de superficie celular con el citoesqueleto subyacente de la célula. La herida en la célula que es letal también puede conseguirse proporcionando un agente que afecta o interfiere con la adhesión y / o la motilidad celular.

De acuerdo con lo anterior, una composición para inducir heridas en la membrana celular también puede funcionar como una composición para matar una célula. Además, una composición para matar una célula también es útil en un procedimiento para matar una célula. Preferentemente, la célula es maligna y está asociada con una neoplasia de un

tejido corporal, tal como, por ejemplo, nervioso, linfoide, de ovarios, cervical, endometrial, testicular, de próstata, renal, de colon, de páncreas, de estómago, de intestino, de esófago, de pulmón, de tiroides, de glándula suprarrenal, de hígado, de hueso, de piel, de boca, de garganta, y similares. En una realización adicional, la célula es hiperactiva y la hiperactividad de la célula participa en una enfermedad o trastorno que se puede tratar mediante los procedimientos divulgados en el presente documento para matar la célula hiperactiva.

V. Administración de agentes citotóxicos adicionales

Los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la toxicidad de estos anticuerpos de heridas en la membrana celular puede potenciarse notablemente e incluso sinérgicamente mediante la adición de un agente citotóxico, incluyendo agentes quimioterapéuticos, isótopos radiactivos, anticuerpos citotóxicos, inmunoconjugados, conjugados de ligando, inmunosupresores, reguladores y / o inhibidores del crecimiento celular, toxinas o mezclas de los mismos.

De acuerdo con lo anterior, en ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento comprende además administrar un agente citotóxico en combinación con el agente polivalente que se une a un receptor de superficie celular altamente expresado en la superficie de las células hiperproliferativas. El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico, un isótopo radiactivo, un anticuerpo citotóxico, un inmunoconjugado, un conjugado de ligando, un inmunosupresor, un regulador y / o inhibidor del crecimiento celular, una toxina, o sus mezclas.

Además, la herida en la membrana celular se puede utilizar para permeabilizar células para permitir el acceso al citosol para agentes normalmente no permeables, tales como fármacos cargados, proteínas y péptidos, ácidos nucleicos, agentes de terapia génica, o modificadores de la expresión génica. De esta manera, las heridas en la membrana celular se pueden utilizar para modificar las actividades celulares, la expresión de genes o las respuestas a señalización de proliferación, por ejemplo, en una célula, y proporciona un medio para tratar a un paciente que sufre una enfermedad o trastorno caracterizado por células hiperproliferativas o células hiperactivas, sin tener que matar realmente a las células.

VI. Destrucción preferente de las células neoplásicas

En realizaciones particulares, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente humano que sufre una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación de células, que comprende administrar un agente polivalente que se une a un receptor de superficie celular altamente expresado en la superficie de las células hiperproliferativas, en el que dicho agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar preferentemente las células hiperproliferativas en relación con las células normales. Preferentemente, las células hiperproliferativas son células cancerosas. En otra realización, las células hiperproliferativas son estimuladas en un estado hiperproliferativo por factores de crecimiento, citocinas, infección viral, y similares.

En una realización preferida, la cantidad de agente polivalente eficaz para destruir preferentemente las células hiperproliferativas es una cantidad que es al menos suficiente para saturar los receptores de la superficie celular de las células hiperproliferativas. En una realización más preferida, la cantidad de agente polivalente eficaz para destruir preferentemente las células hiperproliferativas es suficiente para saturar los receptores de la superficie celular de las células normales que poseen el antígeno de superficie celular altamente expresado al tiempo que se mantiene la viabilidad de las células normales dentro de intervalos aceptables para la salud del paciente. La destrucción preferencial de las células hiperproliferativas en relación con las células normales generalmente se consigue proporcionando una cantidad de agente polivalente suficiente para reducir la viabilidad de las células hiperproliferativas pero que no es suficiente para reducir la viabilidad de las células normales en la misma medida. Por ejemplo, la utilización de un anticuerpo de formación de herida en la membrana celular, la viabilidad de las células neoplásicas se puede reducir en una cantidad que es al menos diez por ciento mayor, más preferentemente veinte por ciento mayor, e incluso más preferentemente, el treinta por ciento mayor o más, en relación a la viabilidad de las células normales, incluso cuando tanto las células neoplásicas como las células normales expresan el mismo antígeno de superficie celular en sus superficies respectivas.

De acuerdo con lo anterior, en una realización se proporciona un procedimiento para matar las células cancerosas, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad citotóxica de un anticuerpo que induce heridas en la membrana celular en las células cancerosas. La citotoxicidad por heridas en la membrana celular es distinta de la citotoxicidad mediada por complemento o de la citotoxicidad mediada celular. En una realización adicional, el anticuerpo que induce heridas en la membrana celular es citotóxico para las células del cáncer por un mecanismo de heridas en la membrana celular, así como un mecanismo de citotoxicidad mediada por el complemento y/o células.

Preferentemente, el agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar células B hiperproliferativas, tales como células neoplásicas, pero no mata las células no neoplásicas. En otra realización, el agente polivalente se administra en una cantidad eficaz para matar las células hiperproliferativas, pero no para matar células que muestran la motilidad normal o las propiedades normales de adhesión.

Como se analiza en el Ejemplo 10, y se muestra en la FIG. 8, la dependencia de la viabilidad celular en la concentración del agente polivalente puede variar significativamente entre los tipos de células. Por ejemplo, en el

Ejemplo 10, a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml de anticuerpo, las células B esplénicas mostraron una viabilidad de aproximadamente un 65 %, mientras que las células Nalm-6 a la misma concentración de anticuerpo mostraron una viabilidad de sólo aproximadamente un 42 %. Esta cantidad de anticuerpo es suficiente para proporcionar al menos un exceso multiplicado por tres de la cantidad total de epítomos CDIM sobre las células Nalm-6, y está más cerca de un exceso de cinco veces para las células B esplénicas. A una concentración más alta de anticuerpo, de aproximadamente 10 µg/ml, las células B esplénicas mostraron una viabilidad de aproximadamente un 48 %, mientras que las células Nalm-6 mostraban una viabilidad de sólo aproximadamente un 30 %. Por lo tanto, las líneas de células B mostraron mayor susceptibilidad a la destrucción con el anticuerpo de unión a CDIM que los linfocitos B normales, lo que sugiere que las células B neoplásicas eran más susceptibles a la destrucción con mAb 216 que las células B normales.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha postulado la hipótesis de que el cese del tráfico en la membrana dentro de las células en división rápida interfiere o ralentiza el mecanismo de reparación requerido para mantener la viabilidad celular en las células heridas. Alternativamente, puede haber diferencias adicionales entre las células B neoplásicas y las células B maduras que causan el aumento de la susceptibilidad, especialmente en la asociación del epítomo CDIM con el citoesqueleto subyacente de la célula B, o la expresión diferencial o la actividad de las moléculas de adhesión, y / o la motilidad de las células.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para inducir heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula con un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de la célula, en el que la célula es una célula linfocítica. El agente polivalente es un anticuerpo y la célula linfocítica es una célula B que expresan el epítomo CDIM. El anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inducir heridas preferentemente en las células B hiperproliferativas en relación con las células B normales. En una realización particular, el procedimiento comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas las células B normales para inducir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para inducir heridas y / o matar preferentemente a las células B hiperproliferativas en el paciente. El procedimiento puede comprender además la titulación en cantidades adicionales de anticuerpo al paciente para lograr la cantidad deseada de heridas y / o muerte celulares. El procedimiento puede comprender además poner en contacto las células con un agente citotóxico.

En una realización adicional, el procedimiento comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas las células B normales para inducir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para inducir heridas en las células B hiperproliferativas en el paciente. El procedimiento puede comprender además la titulación en cantidades adicionales de anticuerpo al paciente para lograr la cantidad deseada de heridas y / o muerte celulares. El procedimiento puede comprender además poner en contacto las células con un agente citotóxico.

#### VII. Procedimientos y composiciones para aumentar la formación de heridas en la membrana celular

Una composición para inducir la formación de heridas en la membrana celular comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado, en el que la composición para inducir heridas en la membrana celular puede comprender además un agente de reticulación que aumenta la citotoxicidad del agente relativa polivalente con respecto a la citotoxicidad del agente polivalente en ausencia del agente de reticulación.

En particular, el agente polivalente es un anticuerpo, preferentemente una IgM. En otra realización particular, el agente de reticulación es un anticuerpo que une IgM, proporcionando reticulación de la IgM unida a la superficie de la célula y proporcionando adicionalmente más heridas en la membrana y citotoxicidad. En una realización preferida, la herida de la membrana celular se ve aumentada por el agente de reticulación. En ciertas realizaciones preferidas, el aumento es al menos aproximadamente 25 % y, más preferentemente, es de aproximadamente 50 % o más.

En otra realización se proporciona un procedimiento para a inducir heridas en la membrana celular, que comprende poner en contacto una célula un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado sobre la superficie de la célula y que comprende además poner en contacto la célula con un agente de reticulación que aumenta la citotoxicidad del agente relativa polivalente con respecto a la citotoxicidad del agente polivalente en ausencia del agente de reticulación. En una realización preferida, el agente polivalente es una IgM, y el agente de reticulación es un anticuerpo que une IgM, proporcionando reticulación de la IgM unida a la superficie de la célula. Preferentemente, la célula es una célula B y el anticuerpo es una IgM con especificidad de unión por un epítomo CDIM en la superficie de la célula B. una realización, el anticuerpo es un anticuerpo VH4-34 y el agente de reticulación es un anticuerpo antikappa, anticuerpo anti-lambda o anticuerpo anti-VH4-34.

Se proporciona una composición matar células hiperproliferativas, que comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie de la célula altamente expresado presente en la superficie de una célula, en el que dicho agente polivalente comprende medios de reticulación que proporciona un agente polivalente reticulado unido a la superficie de la célula. El agente polivalente reticulado proporciona una mayor destrucción de las células

hiperproliferativas en comparación con el agente polivalente en ausencia de dichos medios de reticulación.

Se proporciona una composición farmacéutica para tratar un mamífero que sufre una afección caracterizada por la hiperproliferación de células comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula. Preferentemente, la composición comprende además medios de reticulación que aumentan la citotoxicidad del agente polivalente. Preferentemente, el agente polivalente mata las células hiperproliferativas mediante la inducción de heridas en la membrana celular que la célula no puede reparar.

En una realización particular, los medios de reticulación pueden ser un agente funcionalizado unido covalentemente unido al agente polivalente que se une al antígeno de superficie celular altamente expresado en la célula y capaz de reticular con un agente polivalente adyacente unido a la célula. Por ejemplo, un agente de reticulación mono, di o trifuncional se puede unir covalentemente al agente polivalente. El agente de reticulación puede comprender una funcionalidad de reticulación tal como una maleimida, succinimida, carbodiimida o tiol etc. en el extremo distal del agente de reticulación para reticular con un agente polivalente adyacente unido al antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0121951 describe numerosos ejemplos de agentes de reticulación que se pueden utilizar en las composiciones descritas en el presente documento. Un experto en la técnica reconocerá que no hay ninguna limitación particular a los medios de reticulación que se pueden emplear en la composición. Se puede usar cualquier medio de reticulación siempre y cuando el agente de reticulación tenga una longitud suficiente para ponerse en contacto con un agente polivalente adyacente y suficiente reactividad para enlazarse con el agente polivalente adyacente.

Preferentemente, el agente polivalente es un anticuerpo, tal como un anticuerpo natural, incluyendo IgM, IgG, IgA, IgD, IgE; un anticuerpo recombinante o anticuerpo quimérico; un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, tal como un anticuerpo tetravalente, por ejemplo como se describe en el documento WO 02/096948, o proteína de fusión que comprende un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo tal como Fab2, scFv, y similares. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es una IgM.

En una realización adicional, los medios de reticulación pueden ser un agente de reticulación que se une a un anticuerpo. En una realización preferida, el medio de reticulación significa es un agente anti-kappa o anti-lambda o anti-mu que reticula anticuerpos adyacentes unidos al antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula. En una realización preferida adicional, el agente polivalente es un anticuerpo IgM de la clase VH4-34 de anticuerpos, tales como mAb 216, RT-2B, FS 12, A6 (H4C5), Cal-4G, S20A2, FS 3, Gee, HT, Z2D2, o Y2K, y el agente de reticulación es un anticuerpo de unión a anticuerpo anti-VH4-34. Preferentemente, el anticuerpo anti-VH4-34 no impide la unión del anticuerpo VH4-34 al antígeno de superficie celular. En una realización particular, el anticuerpo anti-VH4-34 es 9G4.

En aún otra realización, el medio de reticulación puede un polímero hidrófilo o una red de polímeros, que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000.000 daltons, o, más preferentemente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250.000 daltons, que portan una pluralidad de agentes polivalentes con unión específica para el antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula. El polímero hidrófilo puede ser un polipéptido o un hidrato de carbono. Los polipéptidos pueden comprender aminoácidos básicos que llevan grupos amino libres para facilitar la unión covalente del agente polivalente a la estructura polipeptídica, tal como ((Ala)<sub>n</sub>Lys, donde n puede ser de 2 a 20, por ejemplo. El agente polivalente unido covalentemente puede incluir fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', Fab<sub>2</sub>' o IgM, intacta, por ejemplo. La unión covalente se puede proporcionar convenientemente usando agentes de reticulación difuncionales, tales como agentes de reticulación de disuccinimada o de dimaleimida, aunque se puede usar cualquier medio adecuado de unión.

El agente polivalente que se une al antígeno de superficie celular altamente expresado exhibe preferentemente unión específica, es decir, se une con alta afinidad. Típicamente, la unión de alta afinidad es al menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , y típicamente está entre aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  y aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

En una realización adicional, se proporciona una composición farmacéutica para tratar a un mamífero que sufre una afección caracterizada por la hiperproliferación de células, que comprende un agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado presente en la superficie de una célula, en el que dicho agente polivalente comprende una pluralidad de sitios de unión para el antígeno de superficie celular en la superficie de la célula. Preferentemente, la pluralidad de los sitios de unión es al menos cinco, y más preferentemente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100. En realizaciones particulares, la pluralidad de los sitios de unión puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 o más.

Preferentemente, el agente polivalente que comprende una pluralidad de sitios de unión para el antígeno de superficie celular proporciona una citotoxicidad aumentada de las células hiperproliferativas que se asocia con un mayor número de sitios de unión.

VIII. Usos terapéuticos in vivo

El anticuerpo mAb 216 formador de heridas celulares se analizó *in vivo* en pacientes humanos, como se describe en detalle en el Ejemplo 12. Los pacientes (adultos diagnosticados con LLA) eran resistentes al tratamiento con el régimen estándar de fármacos quimioterapéuticos (VCR / DNR / ASPR / prednisona), es decir, los recuentos de blastos ya no disminuyeron en respuesta al tratamiento quimioterapéutico, y los pacientes estaban terminales. El anticuerpo se administra en una dosis de 1,25 mg / kg a dos pacientes los días 0 y 7, como indican las flechas en las FIGS. 9A y 9B. Las concentraciones aproximadas de los anticuerpos en suero fueron 26  $\mu\text{g/ml}$  and 25  $\mu\text{g/ml}$  de suero, respectivamente, en base al peso del paciente, la dosis y el volumen de suero aproximada (suponiendo un hematocrito del 30 %). Los recuentos de blastos en cada paciente (paciente 1 y paciente 2) fueron de aproximadamente  $125 \times 10^6/\text{ml}$  y  $65 \times 10^6/\text{ml}$ , respectivamente, en el momento del tratamiento con mAb 216 + VCR. En relación con los estudios *in vitro* realizados a concentraciones de aproximadamente  $10^6$  células / ml, estas concentraciones de mAb corresponden aproximadamente a 0,2  $\mu\text{g}/10^6$  células y 0,38  $\mu\text{g}/10^6$  células, respectivamente, las concentraciones que están muy por debajo de las concentraciones umbrales letales demostraron *in vitro* que el mAb 216 mata las células B.

En ausencia de VCR, los recuentos de blastos disminuyeron transitoriamente, un resultado debido probablemente más a la muerte celular mediada por el anticuerpo que a las heridas en las células mediadas por Ab 216 a la baja concentración de anticuerpos analizada. Sin embargo, en combinación con VCR, se observó una disminución espectacular en los recuentos de células blásticas, como se demuestra en las FIG. 9A Y 9B, dio lugar a la prolongación de la vida de estos pacientes. Estos datos demuestran la espectacularmente mejorada muerte celular de blastos leucémicos debido a la combinación sinérgica de mAb 216 y VCR *in vivo*. Incluso a concentraciones muy bajas (subletales) las concentraciones de mAb 216, en las que los blastos estaban simplemente heridos o permeabilizados por el tratamiento con mAb 216, la susceptibilidad a la toxicidad por VCR mejoró marcadamente y eficacia se potenció con el tratamiento. Por consiguiente, estos resultados representan un avance significativo en la eficacia terapéutica del cáncer.

IX. Kits

Los agentes polivalentes descritos en el presente documento, en particular, los anticuerpos formadores de heridas en la membrana celular, se pueden utilizar en kits para la determinación del umbral de dosis de un agente polivalente necesario en un paciente en necesidad de tratamiento. La dosis del agente polivalente que induce la herida en la membrana celular en un mamífero puede determinarse proporcionando un kit que comprende una cantidad suficiente del agente polivalente que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado para llevar a cabo ensayos de unión o para determinar la cantidad de heridas y / o destrucción celulares inducida por el agente polivalente. En una realización adicional, se proporciona un kit para la determinación del umbral de dosis a un anticuerpo formador de herida en la membrana celular en un mamífero, que comprende una cantidad suficiente de un anticuerpo formador de herida celular que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado para llevar a cabo ensayos de unión o para determinar la cantidad de heridas y / o destrucción celulares inducida por el agente polivalente. Los kits también pueden comprender un agente de reticulación o un agente citotóxico, o combinaciones de los mismos, para la determinación del umbral de dosis para el agente polivalente en presencia de agentes citotóxicos y / o un agente de reticulación que aumenta la formación de heridas en la membrana celular. Típicamente se obtienen las propias células del paciente (por ejemplo, células sanguíneas, células tumorales, etc.) y se analizan utilizando los reactivos contenidos en los kits para determinar el número de antígenos de superficie celular expresados en las células, así como para determinar la cantidad de heridas y / o destrucción celular proporcionada por una cantidad predeterminada de agente polivalente.

X. Células hiperproliferativas

Las afecciones caracterizadas por la hiperproliferación de células incluyen cánceres, enfermedades autoinmunes, infección viral e inmunodeficiencias. Los cánceres pueden incluir cánceres de cualquier tipo celular o tejido. Los cánceres preferidos incluyen los cánceres de origen de células B, tales como linfomas y leucemias. Otra realización se divulga en la reivindicación dependiente 20.

Las enfermedades autoinmunes incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad linfoproliferativa autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, y miastenia gravis, pero también pueden incluir tiroiditis de Hashimoto, nefritis lúpica, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Alzheimer, corea de Sydenham, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide bulloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis postestreptocócica, eritema nodoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, enfermedad de Crohn, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterante, cirrosis biliar primaria, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, polimiositis / dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arteritis de células gigantes / polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis de progresión rápida, alveolitis fibrosa, enfermedades autoinmunes de clase III tales como trombocitopenias mediadas por el sistema inmunitario, tales como púrpura trombocitopénica aguda idiopática y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, y similares.

La infección viral también puede causar afecciones y trastornos hiperproliferativos en numerosos tipos celulares y tejidos. Ejemplos de infecciones víricas que inducen la hiperproliferación incluyen la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), incluyendo la infección por HTLV-I, HTLV-2, infección por el virus de Epstein Barr (EBV), por el virus del papiloma humano (HPV), y similares.

5 XI. Combinaciones con agentes citotóxicos adicionales

Los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la toxicidad de los anticuerpos de heridas celulares puede potenciarse notablemente e incluso sinérgicamente mediante la adición de un agente citotóxico, incluyendo agentes quimioterapéuticos, isótopos radiactivos, anticuerpos citotóxicos, inmunoconjugados, conjugados de ligando, inmunosupresores, reguladores y / o inhibidores del crecimiento celular, toxinas o mezclas de los mismos.

Los agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar en las formulaciones y procedimientos de la invención incluyen taxanos, colchicina, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, camptotecinas, antibióticos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina o inhibidores de la topoisomerasa. Un inhibidor de la topoisomerasa preferido es una epipodofilotoxina. Análogos de pirimidina preferidos incluyen capecitabina, 5-fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, monofosfato 5-fluorodesoxiuridina, arabinósido de citosina, 5-azacitidina o 2',2'-difluorodesoxicidina. Análogos de purina preferidos incluyen mercaptopurina, azatiopreno, tioguanina, pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, cladribina, vidarabina, y fosfato de fludarabina. Análogos de ácido fólico incluyen metotrexato, raltitrexed, lometrexol, permefrexed, edatrexato, y pemetrexed. Una epipodofilotoxina preferida es etopósido o tenipósido. Un camptotecina preferido es irinotecán, topotecán, o camptotecina. Preferentemente, el antibiótico es dactinomicina, daunorubicina (daunomicina, Daunoxome), doxorubicina, idarubicina, epirubicina, valrubicina, mitoxantrona, bleomicina, o mitomicina. Un complejo de coordinación de platino preferido es cisplatino, carboplatino, u oxaliplatino. Preferentemente, el agente alquilante es mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, dacarbazina, temozolomida, tiotepa, hexametilmelamina, estreptozocina, carmustina, busulfán, altretamina o clorambucilo.

Los ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™);

sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán;

aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa.

etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina;

acetogeninas (especialmente bullatacina y Bullatacinone);

camptotecinas (incluyendo el análogo sintético topotecán);

briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina análogos);

criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8);

dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI);

eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongiostatina;

mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo;

nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina;

antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina y caliqueamicina gamma 1I phill, véase, por ejemplo, Agnew (1994) Chem. Intl. Ed. Engl., 33, 183-186; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina™) (incluyendo morfolino doxorubicina, cianomorfolino doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina;

anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU);

análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina , trimetrexato;

rellenador de ácido fólico tales como el ácido folínico;

análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina;

5 análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina;

andrógenos como calusterona, propionato dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona;

anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;

10 aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK ®; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilarnina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano;

15 vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; citosina, arabinósido ("Ara - C");

ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL® , Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato;

análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino;

20 vinblastina, vincristina; vinorelbina (Navelbine™);

etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-II;

inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO);

25 retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Particularmente preferidos son los agentes que interfieren con la polimerización o despolimerización de los microtúbulos. Agentes de ejemplo incluyen colchicina, los alcaloides de la vinca, tales como vincristina, vinblastina, vindesina, o vinorelbina, y taxanos, tales como taxol, paclitaxel y docetaxel. Se pueden usar mezclas de cualquiera de los agentes anteriores.

30 Los agentes preferidos adicionales son agentes anti-actina. En una forma de realización preferida, el agente anti-actina es jasplakinolida o citocalasina, y se utiliza en un tratamiento *ex vivo*, por ejemplo , para purgar la médula ósea de células neoplásicas.

35 Las toxinas pueden ser administrados como inmunoconjugados, conjugados de ligando, o se coadministran con un anticuerpo. Las toxinas incluyen, sin limitaciones; la exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de la difteria, momordina, proteína antiviral de fitolaca , enterotoxina A de *Staphylococcus*, *gelonina*, *maitansinoides* (por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. (6.441.163)) o similares.

## XII. Anticuerpos

40 Los anticuerpos que producen heridas celulares útiles en la presente invención puede incluir anticuerpos frente a cualquier antígeno de superficie celular altamente expresado. Los antígenos de superficie celular incluyen moléculas expresadas en la superficie celular, tales como receptores, inmunoglobulinas, citocinas, glicoproteínas, etc. Antígenos de superficie celular preferidos se disocian con el citoesqueleto.

45 Los anticuerpos de formación de heridas celulares preferidos frente a anticuerpos de superficie celular que están asociadas con el citoesqueleto, ya que esta característica parece potenciar la formación de heridas celulares. Los anticuerpos de formación de heridas celulares de la presente invención son anticuerpos de superficie celular codificados por el gen CH4-34 Y anticuerpos anti-CDIM. Como se ha mencionado anteriormente, el término "anticuerpos" se utiliza en su sentido más amplio e incluye fragmentos de anticuerpos que no portan una porción Fc (por ejemplo, anticuerpos no portadores de Fc). Ejemplos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata, et al. (1995) Protein Eng. 8(10)1057-1062) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpos" y "fragmentos de anticuerpos" incluye en adelante agentes desarrollados que

50 presentan características de unión a anticuerpo tales como los descritas. Preferentemente, los anticuerpos y

fragmentos de anticuerpo pueden reticularse adicionalmente con un agente de reticulación, tal como un anticuerpo que tiene unión específica por una porción de los anticuerpos que inducen heridas celulares o fragmentos de anticuerpos que inducen heridas celulares, siempre y cuando la unión del anticuerpo de reticulación no interfiera con la unión de anticuerpos que inducen heridas celulares o fragmentos de anticuerpos que inducen heridas celulares al antígeno de superficie celular. En una realización preferida, el agente de reticulación es un anticuerpo de reticulación que se une al anticuerpo inductor de heridas celulares unido a la célula. Preferentemente, el anticuerpo de reticulación no interfiere con la unión del anticuerpo inductor de herida celular. En una forma de realización, el anticuerpo inductor de heridas celulares comprende una porción Fc, y el agente de reticulación se une a la porción Fc del anticuerpo del anticuerpo inductor de heridas celulares. En una forma de realización preferida, el agente de reticulación se une a una porción del anticuerpo distinta a la porción Fc, si está presente.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo inductor de heridas celulares es un anticuerpo VH4-34, preferentemente un anticuerpo anti-CDIM. El anticuerpo anti-CDIM se puede utilizar para herir, permeabilizar o matar a las células. En una realización particular, el anticuerpo anti-CDIM es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, Fab<sub>2</sub>' y puede estar reticulado por un anticuerpo que tiene unión específica para el anticuerpo anti-CDIM (por ejemplo, 9G4). Preferentemente, el anticuerpo de reticulación no impide la unión del anticuerpo anti-CDIM al epítipo CDIM en la celda y proporciona la reticulación del anticuerpo anti-CDIM unido al epítipo CDIM en la célula.

Los anticuerpos anti-CDIM se pueden utilizar junto con anticuerpos citotóxicos adicionales que tienen unión específica para moléculas de superficie celular en las células, por ejemplo, células B. Los anticuerpos anti-CDIM y los anticuerpos citotóxicos adicionales pueden usarse en un régimen de tratamiento de combinación. En una realización preferida, el anticuerpo citotóxico puede tener unión específica para cualquier molécula de superficie celular sobre una célula B. Por ejemplo, el anticuerpo citotóxico puede exhibir unión específica por las moléculas de la superficie celular en las células B, tales como CD11a, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD34, CD37, CD38, CD40, CD45, CD52, CD80, CD 86, IL-4R, IL-6R, IL-8R, IL-13, IL-13R,  $\alpha$ -4/ $\beta$ -1 integrina (VLA4), receptor BLYS, Ig de idiotipo de superficie celular, factor de necrosis tumoral (TNF), o mezclas de los mismos, sin limitaciones. Por ejemplo, el anticuerpo citotóxico que tiene unión específica por C11a puede ser, por ejemplo, efalizumab (RAPTIVA). El anticuerpo citotóxico que tiene unión específica para CD20 puede ser rituximab (RITUXAN). El anticuerpo citotóxico que tiene unión específica para CD22 puede ser, por ejemplo, epratuzumab. El anticuerpo citotóxico que tiene unión específica para CD25 puede ser, por ejemplo, daclizumab (ZENAPAX) o basiliximab (SIMULECT). Los anticuerpos frente a CD52 incluyen, por ejemplo, CAMPATH. Los anticuerpos frente a  $\alpha$ -4/ $\beta$ -1 integrina (VLA4) incluyen, por ejemplo, natalizumab. Los anticuerpos frente a TNF incluyen, por ejemplo, infliximab (REMICADE).

Por tanto, en realizaciones preferidas, el anticuerpo que tiene unión específica para los epítopos CDIM sobre una célula B se puede utilizar en un régimen de inmunoterapia combinada con RITUXAN, ZENAPAX, REMICADE o RAPTIVA, por ejemplo, o en combinaciones de los mismos. El anticuerpo citotóxico también se puede utilizar como un inmunocombinado que comprende un isótopo radiactivo o una toxina, por ejemplo. Además, en realizaciones adicionales, puede usarse una terapia combinada que comprende el anticuerpo que tiene unión específica para epítopos CDIM sobre una célula B, un anticuerpo citotóxico adicional que tiene unión específica para moléculas de superficie celular en una célula B, y uno o más agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, mAb216 podría usarse en combinación con un anticuerpo anti-CD20, tal como rituximab, tosutimab, o ibritumomab, con un anticuerpo anti-CD22, tales como epratuzumab, o en combinación con un anticuerpo anti-CD52, tales como CAMPATH. La terapia de combinación puede incluir, además, quimioterapia, tal como un agente que interrumpe el citoesqueleto de la célula, por ejemplo, vincristina, en un régimen de quimioterapia e inmunoterapia combinado.

### XIII. Isótopos radiactivos

Los isótopos utilizados para producir conjugados, inmuno o ligandos, terapéuticamente útiles típicamente producen partículas  $\alpha$ -,  $\gamma$ - o  $\beta$  de alta energía que tienen una longitud de la trayectoria terapéuticamente eficaz. Dichos radionúclidos matan las células que están muy cercanas, por ejemplo células neoplásicas a las que se ha unido el conjugado. La ventaja de la administración dirigida es que el anticuerpo o ligando marcado radiactivamente generalmente tiene poco o ningún efecto sobre las células que no están en la proximidad inmediata de la célula diana.

Con respecto a la utilización de isótopos radiactivos como agentes citotóxicos, los anticuerpos o ligandos modificados pueden marcarse directamente (tal como a través de yodación) o puede ser etiquetado usando un agente quelante. En cualquier procedimiento, el anticuerpo o ligando está marcado con al menos un radionúclido. Agentes quelantes particularmente preferidos comprenden derivados de ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildioleniltriaminapentacético ("MX-DTPA") y ácido ciclohexildietiltriaminapentaacético ("CHX-DTPA"). Otros agentes quelantes comprenden derivados P-DOTA y EDTA. Radionúclidos particularmente preferidos para el marcaje indirecto incluyen <sup>111</sup>In y <sup>90</sup>Y.

El isótopo radiactivo se puede unir a sitios específicos en el anticuerpo o ligando, tales como el azúcar ligado a N reside presente sólo en la porción Fc del anticuerpo. Los anticuerpos o ligandos marcados con Tecnecio-99m se pueden preparar mediante procesos de intercambio de ligando o por procesos de marcaje por lotes. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse mediante la reducción de pertechnetato (TCO<sub>4</sub>) con una solución de ion estannoso, quelando el tecnecio reducido en una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna. Las técnicas de

marcaje por lotes incluyen, por ejemplo, incubar pertecnato, un agente reductor tal como  $\text{SnCl}_2$ , una solución tampón tal como una solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo. Radionúclidos preferidos para marcaje son bien conocidos en la técnica. Un radionúclido de ejemplo para marcar es  $^{131}\text{I}$  covalentemente unido a través de residuos de tirosina. Los anticuerpos marcados radiactivamente de acuerdo con la invención se pueden preparar con yoduro de sodio o de potasio radiactivo y un agente oxidante químico, tal como hipoclorito sódico, cloramina T o similares, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa, glucosa oxidasa y glucosa.

Las patentes relacionadas con quelantes y conjugados quelantes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.831.175 de Gansow está dirigida a quelato de ácido dietilentriaminopentaacético polisustituido y a conjugados de proteína que contienen los mismos y procedimientos para su preparación. Las patentes de EE.UU. N° 5,099,069, 5,246,692, 5,286,850, 5,434,287 y 5,124,471, todas de Gansow, también se refieren a quelatos de DTPA polisustituídos. Estas patentes se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Otros ejemplos de quelantes de metales compatibles son ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 1,4,8,11-tetraazatetradecano, ácido 1,4,8,11-tetraazatetradecano-1,4,8,11-tetraacético, 1 oxa-4,7,12,15-tetraazaheptadecano, ácido 4,7,12,15-tetraacético, o similares. Ciclohexil-DTPA o CHX-DTPA son particularmente preferidos. Todavía otros quelantes compatibles, incluyendo aquellos aún por descubrir, los pueden discernir fácilmente un experto en la materia y están claramente dentro del ámbito de la presente invención. Quelantes adicionales incluyen los quelantes bifuncionales específicos descritos en las patente N° 6,682,734, 6,399,061 Y 5,843,439, y se seleccionan preferentemente para proporcionar una alta afinidad por metales trivalentes, presentan un aumento de las proporciones tumor-no tumor y disminución de la captación ósea, así como una mayor retención *in vivo* de radionúclido en los sitios diana, es decir, sitios de tumor de linfoma de células B. Sin embargo, otros quelantes bifuncionales que pueden o no poseer todas estas características son conocidos en la técnica y también pueden ser beneficiosos en la terapia tumoral.

Los anticuerpos modificados también pueden conjugarse con marcadores radiactivos con fines diagnósticos, así como terapéuticos. Los conjugados terapéuticos radiomarcados para "estudios de imagen" de diagnóstico de tumores también se pueden utilizar antes de la administración del anticuerpo y el agente citotóxico a un paciente. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal que se une al antígeno CD20 humano conocido como C2B8 puede radiomarcarse con  $^{111}\text{In}$  usando un quelante bifuncional, tales como MX-DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), que comprende una mezcla 1:1 de 1-isotiocianatobencil-3-metil-DTPA y 1-metil-3-isotiocianatobencil-DTPA.  $^{111}\text{In}$  es un isótopo radioactivo de diagnóstico preferido ya que se pueden administrar de forma segura entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mCi sin toxicidad detectable, y los datos de imagen son indicadores de la distribución posterior del anticuerpo marcado con  $^{90}\text{Y}$ . Se usa una dosis típica de anticuerpo marcado con  $^{111}\text{In}$  de 5 mCi para estudios de formación de imágenes y la imagen óptima se puede determinar en diversos momentos después de la administración del anticuerpo o ligando marcado, típicamente de tres a seis días después de la administración. Véase, por ejemplo, Murray, J. (1985) Nuc. Med. 26, 3328 and Carraguillo et al., (1985) J. Nuc. Med. 26, 67.

Se pueden usar una variedad de isótopos radiactivos y un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué isótopo radiactivo es el más apropiado en diversas condiciones. Por ejemplo,  $^{131}\text{I}$  se utiliza con frecuencia para la inmunoterapia específica. Sin embargo, la utilidad clínica de  $^{131}\text{I}$  puede estar limitado por su corta semivida (8 días), el potencial de deshalogenación del anticuerpo yodado tanto en la sangre como en el tumor o los sitios, y su alta energía de emisión y que no puede proporcionar suficiente depósito de dosis localizada en el tumor, dependiendo del tamaño del tumor, según se desee. Con la llegada de agentes quelantes adicionales se proporcionan oportunidades adicionales para unir grupos quelantes metálicos a proteínas y utilizar otros radionúclidos tales como  $^{111}\text{In}$  y  $^{90}\text{Y}$ .  $^{90}\text{Y}$  proporciona varios beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas. Por ejemplo, la semivida útil más larga de 64 horas para  $^{90}\text{Y}$  es suficientemente larga como para permitir la acumulación de anticuerpo por las células tumorales y, a diferencia de  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$  es un emisor beta puro de alta energía sin radiación gamma acompañante en su deterioro, que tiene un intervalo en el tejido de 100 a 1000 diámetros celulares. Además, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con  $^{90}\text{Y}$ . Además, la internalización del anticuerpo marcado no es necesaria para la muerte celular, y la radiación ionizante debe ser letal para células tumorales adyacentes que carecen del antígeno diana.

Las dosis terapéuticas únicas eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos marcados con  $^{90}\text{Y}$  varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis terapéuticas únicas eficaces no ablativas de la médula ósea de anticuerpos marcados con  $^{131}\text{I}$  varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis terapéuticas únicas eficaces ablativas (es decir, que pueden requerir trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con  $^{131}\text{I}$  varían de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferentemente y entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 mCi. Cuando el anticuerpo o ligando tiene una semivida en circulación más larga en relación con una proteína extraña tal como un anticuerpo murino, una dosis no ablativa de la médula ósea como tratamiento único eficaz de anticuerpo marcado con  $^{131}\text{I}$  varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferentemente menos de aproximadamente 30 mCi. Las dosis de imagen para un marcador isótopo radiactivo, por ejemplo, el marcador  $^{111}\text{In}$ , normalmente son inferiores a aproximadamente 5 mCi.

Si bien  $^{131}\text{I}$  y  $^{90}\text{Y}$  se han utilizado ampliamente en la clínica, otros isótopos radiactivos son conocidos en la técnica y

pueden usarse para fines similares. Otros radioisótopos más se usan para la obtención de imágenes. Por ejemplo, radioisótopos adicionales que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , and  $^{188}\text{Re}$  y  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{Ga}$ ,  $^{81}\text{Rb}$ ,  $^{81}\text{Kr}$ ,  $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{127}\text{Cs}$ ,  $^{129}\text{Cs}$ ,  $^{132}\text{I}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{213}\text{Pb}$ ,  $^{216}\text{Bi}$ ,  $^{117}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{211}\text{At}$ , y  $^{213}\text{Bi}$ . A este respecto, los emisores de alfa, gamma y beta son todos ellos contemplados como aspectos de la presente invención. Adicionalmente, se presenta que un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué radionúclidos son compatibles con un curso seleccionado de tratamiento sin experimentación indebida. Con este fin, radionúclidos adicionales que ya se han usado en diagnóstico clínico incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , así como  $^{111}\text{In}$ . Los anticuerpos también se han marcado con varios radionúclidos para su uso potencial en inmunoterapia dirigida, por ejemplo, como se describe en Peitersz et al. (1987) Immunol. Cell Biol. 65, 111-125. Estos isótopos radiactivos incluyen  $^{188}\text{Re}$  y  $^{186}\text{Re}$  así como  $^{199}\text{Au}$  y  $^{67}\text{Cu}$ . La patente de Estados Unidos No. 5.460.785 proporciona información con respecto a este tipo de radioisótopos.

#### XIV. Reguladores y / o inhibidores del crecimiento celular

Los reguladores y / o inhibidores del crecimiento celular incluyen terapias de moléculas pequeñas tales como hormonas o agentes antihormonales, inhibidores de quinasa, inhibidores de proteasoma, agentes de terapia génica o modificadores de la expresión génica.

Los agentes antihormonales pueden ser útiles en particular en la terapia de enfermedades autoinmunes, donde está implicada la exacerbación hormonal, en particular la acción estrogénica en mujeres. Los agentes antihormonales actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LYL 17018, onapristona y toremifeno (Fareston™); inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), y anastrozol (Arimidex™); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Las hormonas androgénicas pueden ser especialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad autoinmune, y una hormona androgénica representativa es dihidroepiandrosterona (DHEA). Los moduladores selectivos del receptor de andrógenos (SARM) incluyen, por ejemplo, los compuestos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.645.974 de Hutchinson, tales como androstano y androsteno carboxamidas.

Los inhibidores de la quinasa son ampliamente conocidos y los inhibidores de quinasa particularmente preferidos incluyen los inhibidores de la bcr / abl tirosina quinasa, tales como imatinib (Gleevec) y sus compuestos relacionados, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.521.184 de Zimmermann. Inhibidores de tirosina quinasa adicionales pueden incluir agentes que bloquean los complejos de señalización implicados en la activación de la transcripción de Lyn quinasa, incluyendo, por ejemplo, ARNip, que bloquea la actividad de la quinasa Lyn. Otros inhibidores de la quinasa adicionales incluyen compuestos tales como AGL 2592 descritos en Ben-Bassat, H. et al. (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 163 que se ha demostrado que inducen apoptosis en los linfomas no Hodgkin; herbimicina A como han descrito Mahon, TM y O'Neill, LA (1995) J. Biol. Chem. 270, 28557 ha demostrado que bloquean la unión al ADN y la expresión génica dirigida por NF-kappa B; compuestos de indolinona tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.680.335 a Tang; derivados de pirazolopirimidina tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.660.744 a Hirst, y similares. Los inhibidores del proteasoma incluyen los ésteres borónicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.083.903 para Adams. Un inhibidor de proteasoma preferido es bortezomib (Velcade).

Agentes de terapia y modificadores de la expresión génica incluyen secuencias de ácidos nucleicos antisentido, secuencias de ácidos nucleicos de interferencia y similares. Los agentes modificadores de la terapia génica y los modificadores de la expresión génica se pueden utilizar como un inmunoconjugado o como un agente citotóxico administrado por separado. Agentes de terapia génica y modificadores de la expresión génica particularmente útiles incluyen los que codifican proteínas implicadas en las vías proapoptóticas, así como aquellos que bloquean los inhibidores de las vías proapoptóticas o aquellos que bloquean la señalización proliferativa, todos lo cuales pueden contribuir al crecimiento incontrolado e hiperproliferación. Por ejemplo, los modificadores de la expresión génica pueden incluir antisentido o ARNip que actúan para inhibir la ruta de NF-kB, inhibiendo de este modo la proliferación anormal presente cuando esta vía está anormalmente activada.

Los oligonucleótidos de ADN antisentido se componen típicamente de secuencias complementarias a la secuencia diana, generalmente un ARN mensajero (ARNm) o un precursor de ARNm. El ARNm contiene información genética en la orientación funcional, o sentido, y la unión del oligonucleótido antisentido inactiva el ARNm deseado y previene su traducción a proteína. Tales moléculas antisentido se determinan en base a experimentos bioquímicos que muestran que las proteínas se traducen a partir de ARN específicas y una vez que la secuencia del RNA se conoce, se puede diseñar una molécula antisentido que se unirá a él a través de pares de bases complementarias de Watson-Crick. Tales moléculas antisentido contienen típicamente de 10 a 30 pares de bases, más preferentemente entre 10 y 25, y lo más preferentemente entre 15 y 20. El oligonucleótido antisentido se puede modificar para mejorar la resistencia a la hidrólisis por nucleasa, y tales análogos incluyen oligonucleótidos fosforotioato,

metilfosfonato, fosforoselenoato, fosfodiéster y p-etoxi como se describe en el documento WO 97/07784.

5 El agente de terapia génica también puede ser una ribozima, ADNzima, ARN catalítico, o un ARN de interferencia pequeño (ARNip). El ARN de interferencia utiliza ARN cortos, típicamente menos de aproximadamente 30 pares de bases, que actúan a través de apareamiento de bases complementarias, como se ha descrito anteriormente. Los ARNip pueden ser lineales o circulares.

10 Como se ha mencionado anteriormente, los agentes y modificadores que bloquean los complejos de señalización implicados en la activación de y la transcripción de la Lyn quinasa, sería ventajosos. En una realización concreta, un ARNip que bloquea la actividad de la Lyn quinasa, tal como el ARNip notificado por Ptaszniak, A et al., (2004) Nat. Med. 10, 1187, se puede administrar con el anticuerpo de unión anti-CDIM ya sea como un inmunoc conjugado o como un agente citotóxico administrado por separado.

#### XV. Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

15 Los anticuerpos Y agentes citotóxicos SE pueden formularse usando cualquiera de los procedimientos y excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se proporcionan en solución salina, con excipientes y estabilizadores opcionales. Los agentes quimioterapéuticos pueden variar ampliamente en los procedimientos de formulación y los excipientes, y esta información está disponible por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Arthur Osol, Editor).

Se contempla que los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse *in vivo*, *ex vivo* y en aplicaciones *in vitro*.

20 Las composiciones de la invención pueden administrarse al paciente a través de diversos medios diferentes. Los medios de administración variarán dependiendo de la aplicación prevista. Como un experto en la técnica reconocería, la administración de las composiciones puede llevarse a cabo de diversas maneras, por ejemplo, a través de administración tópica, incluyendo, pero sin limitaciones, dérmica, ocular y rectal; transdérmica, a través de medios pasivos o activos, por ejemplo, usando un parche, un vehículo, o iontoforesis; transmucosa, por ejemplo, sublingual, bucal, rectal, vaginal, transuretral o; oral, por ejemplo, gástrica o duodenal; inyección parenteral en la cavidad o recipiente del cuerpo, por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, intralinfática, intratumoral, intramuscular, intersticial, intraarterial, subcutánea, intralesional, intraocular, intrasinovial, intraarticular; por inhalación, por ejemplo, inhalación pulmonar o nasal, usando, por ejemplo, un nebulizador. Las composiciones y procedimientos en los que el agente polivalente es un anticuerpo se administran generalmente por vía parenteral.

30 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, con las realizaciones específicas preferidas de la misma, que la descripción anterior, así como los ejemplos se pretende ilustrar, y no limitar, el ámbito de la invención. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, química de polímeros, bioquímica y similares, que están dentro de la experiencia de la técnica. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del ámbito de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura.

35 En los ejemplos siguientes se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se permiten algunos errores y desviaciones del experimento. A menos que se indique lo contrario, la temperatura es en grados °C y la presión es la atmosférica o próxima.

#### Abreviaturas:

|    |      |                               |
|----|------|-------------------------------|
| 40 | LLA  | Leucemia linfoblástica aguda  |
|    | ASPR | Asparaginasa                  |
|    | BCR  | receptor de células B         |
|    | BFA  | Brefeldina A                  |
|    | DNR  | Daunorrubicina                |
| 45 | FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
|    | IM   | mononucleosis infecciosa      |
|    | mAb  | Anticuerpo monoclonal         |
|    | PI   | Yoduro de propidio            |
|    | GR   | Glóbulos rojos                |

LES      Lupus eritematoso sistémico

VCR      Vincristina

GB      Glóbulos blancos

### Ejemplo 1

#### 5      **mAb 216 hiere las membranas de las células y provoca una respuesta de resellado por los lisosomas**

La respuesta natural a los daños en la membrana es el resellado rápido mediante la adición de membrana lisosomal interna en el sitio de la herida. Lamp-1 es una glicoproteína de membrana lisosomal abundante que normalmente no está presente en la membrana plasmática (Granger, B. L., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 12036; McNeil, P. L. (2002) *J. Cell Sci.* 115, 873). Cuando los lisosomas son inducidos a fusionarse con la membrana plasmática, el dominio NH2 terminal intralisosomal de Lamp-1 queda expuesta en la superficie celular. Este evento de fusión puede controlarse por tinción de la superficie de células vivas con mAb dirigidos al epítipo luminal de Lamp-1 (Reddy, A., et al. (2001) *Cell* 106, 157; Rodríguez, A., et al. (1997) *J. Cell. Biol.* 137, 93; Martínez, I., et al. (2000) *J. Cell. Biol.* 148, 1141). Por lo tanto, la presencia de Lamp-1 en la superficie celular es una indicación de resellado de la membrana después de una rotura de la membrana (McNeil, P. L., and R. A. Steinhardt (2003) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 697).

Para probar si mAb 216 codificado por VH4-34 hiere a las células y, por lo tanto, provoca una reparación rápida y respuesta de resellado, las líneas de células B humanas tratadas con mAb 216 se analizaron para determinar la aparición rápida en la superficie celular de la proteína específica del lisosoma Lamp-1.

#### Células y reactivos

La línea de células Pre-B humanas Nalm-6 (Hurwitz, R., et al. (1979) *Int. J. Cancer* 23, 174), Reh (Rosenfield, C., A. et al. (1977) *Nature* 267, 841), y la línea de células B maduras OCI-Ly8 Tweeddale, M. E., et al. (1987) *Blood* 69,1307) se mantuvieron en fase logarítmica en medio de Iscove con 10 % de FCS inactivado con calor. Las líneas de células B se obtuvieron de la ATCC Los mAb codificados por VH4-34, mAb 216 (Bhat, NM, et al. (1993) *J. Immunol.* 151, 5011), Z2D2 (Bhat, N. M., et al. (2000) *Scand. J. Immunol.* 51, 134), y Y2K así como el mAb control de isotipo equivalente MS2B6, derivado de un miembro de la familia VH3 (Glasky, M. S., et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3, 114), se produjeron en el laboratorio y se purificaron a partir de sobrenadante de hibridoma libre de suero por precipitación 2X con agua. Los mAb se concentraron cuando sea necesario en un concentrador Centriprep (Amnicon, Dancers, MA). La pureza de los mAb IgM, comprobado por electroforesis en gel de poliacrilamida, fue del 90-95 % puro. La concentración de IgM purificadas se determinó mediante ELISA de tipo sándwich utilizando IgM humana como patrón (catálogo # 31146, Pierce Biochemicals, Rockford, IL). Además de MS2B6, la IgM de Pierce también se usó como un control de isotipo. Todos los mAb se esterilizaron por filtración y liberaron de azida de sodio.

#### Ensayo de viabilidad celular mediante tinción con PI y dispersión hacia adelante

La integridad de la membrana plasmática se evaluó mediante la capacidad de las células para excluir el yoduro de propidio (PI, Sigma, St. Louis, MO). El nivel de incorporación de PI se cuantificó por citometría de flujo en FACScan (Becton-Dickinson, San Jose CA) interconectado con software VersatormPro y FlowJo en la instalación FACS de Stanford. Las células negativas para PI con tamaño normal, según lo determinado por las señales de dispersión frontal se consideraron células vivas.

En resumen, se trataron las células como se especifica en cada experimento y se resuspendieron en PBS con 3 % de FCS y 10 µgs / ml de PI. En experimentos en los que se evaluó la toxicidad en medio exento de Ca, las células se resuspendieron en medios adecuados, con o sin calcio a los que se añadieron 10 µgs / ml de PI. Dado que estudios previos han demostrado que la toxicidad mediada por mAb 216 es notablemente pronunciada a temperaturas más bajas (Bhat, NM, et al., (1996) *Clin. Exp. Immunol.* 105, 183), se tomaron las precauciones necesarias para mantener todos los medios y las células a 37 °C y la centrifuga a temperatura ambiente.

#### 45      **Ensayo de depleción y liberación de ATP**

El ATP intracelular y liberado se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante el kit de ensayo de bioluminiscencia (catálogo # A-22066, Molecular Probes). Las diluciones ATP estándar que varían desde 1nM a 1µM se analizaron como control positivo. Las células se expusieron a diversas concentraciones de mAb 216, en diferentes medios como se especifica en cada experimento. Se añadieron 10 µl de sobrenadante de reacción a 90 µl de la solución de reacción estándar que contenía TDT, luciferina y luciferasa. La generación de luz, en presencia de ATP como cosustrato, se midió inmediatamente mediante luminómetro (Lumimark Microplate Reader, Bio-Rad) interconectado con el software MicroWin 2000, versión 4.2 (Mikrotek Laborsysteme, GmbH). Este ensayo permite la detección de cantidades femtomolares de ATP. Para evaluar el contenido de ATP intracelular, las células se lisaron con 1 % de NP-40 a TA durante 10 minutos, y 10 µl del lisado se analizaron como se ha descrito anteriormente.

### Estudios de expresión de Lamp-1

La expresión de Lamp-1 en la superficie se estudió mediante epi-fluorescencia, citometría de flujo y microscopia confocal. Los anticuerpos contra el epítipo luminal de Lamp-1 humana (CD 107a, clon H4A3) y el control de isotipo para Lamp-1, una IgGk de ratón se obtuvieron de BD-PharMingen. Ambos anticuerpos se detectaron con una IgG secundaria F(ab)<sub>2</sub> de cabra anti-ratón conjugada con FITC (Pierce Biochemicals). Las células ( $5 \times 10^5$ ) se expusieron a diferentes concentraciones de mAb 216 o de la IgM humana control (mAb MS2B6 o Pierce IgM) durante el tiempo especificado en cada experimento a 37 °C. Las células se fijaron después con paraformaldehído al 2 % precalentado a TA durante 20 minutos, se lavaron dos veces con medios precalentados y se tiñeron con anti-Lamp-1 o isotipo de control durante 15 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con medio de tinción (PBS con 3 % de FCS y 0,2 % de azida de sodio) y se incubaron con anticuerpo secundario anti-Lamp-1 durante otros 15 minutos. Después de dos lavados, las células se resuspendieron en medio de tinción y se analizaron por citometría de flujo, inmunofluorescencia o microscopia confocal.

La formación de imágenes confocales se realizó en las instalaciones para estudios de imagen de Cell Sciences de Stanford en el microscopio confocal láser MultiProbe 2.010 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). El MultiProbe utiliza un láser de gas mixto de Ar / Kr con líneas de excitación de 488, 568 y 647 y se está integrado en un microscopio invertido Nikon Diaphot 200. Con una longitud de onda de excitación de 488 nm, la luz emitida se pasó a través de un divisor de haz 510LP y se recogió con un filtro de paso de 510 de largo. Se utilizó un objetivo Planazo Nikon 60X (NAL 0.4). La formación de imágenes de epi-fluorescencia se realizó en un microscopio Axioplan 2 )Carl Zeiss, Inc., GmbH) equipado con la cámara AxioCam HRc (Carl Zeiss) y fuente de alimentación Opti-Quip (Modelo 1200, Highland MillsNew York) en interfaz con el software Axiovision 3.1 (Carl Zeiss). La citometría de flujo se realizó en FACScan.

### Resultados y conclusiones

La expresión de Lamp-1 en las células no tratadas varió desde un mínimo de 5 % a 50 % de un experimento a otro. La variación se produce debido a una manipulación de laboratorio estándar de líneas de células B. En experimentos en los el nivel basal de la expresión de lamp-1 fue del 50 %, las células de control tratadas con control del isotipo permanecieron 50 % positivo y las células tratadas mAb 216 fueron un 100 % positivas para Lamp-1. La tinción de Lamp-1 sobre las líneas celulares se repitió 5 veces para asegurar la reproducibilidad. Se discuten los resultados de experimentos en los que la expresión basal de Lamp-1 es del 5 %.

Las células Nalm-6 expuestas a mAb 216 durante 1 minuto demostraron un aumento espectacular de la tinción de Lamp-1, pero las células expuestas al control de isotipo o las células sin tratamiento no aumentaron su expresión de Lamp-1. La exposición de Lamp-1 se observó también en otras líneas de células B, OCI-Ly8 (B maduras) y Reh por FACS y epi-fluorescencia (datos no mostrados). La integridad de la membrana de las células se evaluó simultáneamente para cada muestra mediante la captación de PI. Las células se mantuvieron negativas para PI en 1 minuto tras la exposición a 216.

También se midió la tinción de Lamp-1 y la captación de PI en diferentes puntos temporales tras la exposición a mAb 216 también se midió. La exposición de Lamp-1 fue un evento rápido con la tinción más brillante observada a los 30 segundos de exposición al Ab, disminuyendo poco a poco en los siguientes 5 minutos (FIG. 5A). Las células se mantuvieron negativas a PI durante este período de tiempo. La captación de PI se demostró después de aproximadamente 5 minutos de exposición al mAb 216, y en 20 minutos, 10-25 % de las células se convirtió en permeable a la membrana, como lo demuestra la captación de PI.

La rotura de la membrana medida por la liberación de ATP también mostró un curso de tiempo similar. Como se muestra en la FIG. 5B, el ATP no se detectó en el sobrenadante a 2 minutos, un punto de tiempo en el que se detecta Lamp-1 en la membrana celular. Pero a los 15 minutos y 1 hora, la liberación de ATP aumentó, lo que sugiere que se han producido daños en la membrana que no han podido resellarse. A las 2 y 24 h después del tratamiento con mAb 216, hubo una disminución de ATP que puede ser el resultado de la lisis y necrosis celular que degrada el ATP liberado. Cuando se evalúa el contenido de ATP en el sedimento celular, el ensayo bioluminiscente se convierte en una medida de la proliferación celular y la citotoxicidad. Los efectos citotóxicos de mAb 216 fueron evidentes en la hora posterior a la exposición.

Estos resultados demuestran que el daño en la membrana mediado por mAb 216 es reparado por el mismo mecanismo que restaura la viabilidad celular después de una lesión por heridas mecánicas o físicas, lo que indica que el tratamiento con mAb 216 tiene como resultado un evento de heridas celulares similar a cualquier otra rotura grande de la membrana. Hasta ahora no se han observado heridas celulares producidas por un anticuerpo. El daño en la membrana producido por mAb 216 se reselló inicialmente a medida que se añadió rápidamente membrana interna a la bicapa de lípidos, pero con un aumento del tiempo de exposición a mAb 216, los intentos de resellado fracasaron y la membrana se hizo permeable tanto a PI como a ATP- Además de mAb 216, otros mAb IgM anti-células B codificados por VH4-34 mediaron daños en la membrana similares y provocaron una respuesta similar de resellado por los lisosomas.

### Ejemplo 2

### La reparación daños en la membrana inducidos por mAb 216 es dependiente de actina funcional

Como se ha tratado en McNeil, P. ((2002) J. Cell Sci. 115, 873) y otros, la reparación de heridas en la membrana implica procesos dependientes de actina. Para probar si la reparación de las heridas en la membrana inducidas por mAb 216 utiliza mecanismos de reparación dependientes de actina, las células fueron tratadas con agentes que afectan a la polimerización de la actina y se evaluó el efecto sobre la reparación de la herida en la membrana inducida por mAb 216. Las células fueron tratadas con citocalasina o jasplaquinolida, dos agentes que tienen efectos opuestos sobre la polimerización de la actina. La citocalasina despolimeriza la actina en monómeros, mientras que jasplaquinolida, un péptido cíclico obtenido a partir de una esponja marina, inmoviliza la actina en su forma filamentosa. Ambos tratamientos dificultan las actividades del citoesqueleto basadas en la actina.

5

#### 10 Procedimientos:

La citocalasina se obtuvo de Sigma y la jasplaquinolida se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). Los inhibidores de caspasa, Ac-IETD-CHO y Ac-DEVD-CHO se obtuvieron de PharMingen (San Diego, CA). Las células Nalm-6 ( $1 \times 10^6$  células / ml) se trataron con Jasplakinolida (3  $\mu\text{g}$  / ml), citocalasina (5  $\mu\text{g}$  / ml), o inhibidores de caspasas (10  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas a 37 °C antes del tratamiento con mAb 216. Las muestras de control con cantidades equivalentes de DMSO se establecieron en paralelo. Las células fueron expuestas después a 25  $\mu\text{g}$  de mAb 216 o Ab control y se analizaron por citometría de flujo.

15

#### Resultados:

Las células tratadas con citocalasina o jasplaquinolida y mAb 216 mostraron una disminución de la viabilidad (células viables en porcentaje) y por lo tanto una mayor susceptibilidad a mAb 216, lo que demuestra un efecto sinérgico e indica un requisito de actina funcional en el proceso de reparación. Las células tratadas con citocalasina o jasplacinolida y anticuerpos de control no mostraron una disminución de la viabilidad. Los datos de un experimento representativo se muestran en la FIG. 6B. Se obtuvieron resultados similares de otros tres experimentos.

20

La incubación de las células con inhibidores de caspasa Ac-IETD-CHO y Ac-DEVD- CHO no alteró la viabilidad celular, lo que indica que el mecanismo de la muerte celular no se debe a apoptosis.

25

Estos resultados apoyan aún más el mecanismo de heridas en la membrana celular inducidas por anticuerpos a causa de la exposición a estos anticuerpos.

#### Ejemplo 3

### La reparación daños en la membrana inducidos por mAb 216 es dependiente de calcio

Puesto que se sabe que la exocitosis de los lisosomas es un fenómeno dependiente de calcio .(Miyake, K., and P. L. McNeil (1995) J. Cell Biol. 131, 1737; Bi, G. Q., et al. (1995) J. Cell Biol. 131, 1747), la formación de heridas en la causadas por mAb 216 y la reparación de la herida se analizó en condiciones sin calcio y normales con calcio. La viabilidad celular de las células Nalm-6 cuando se trata con dos mAb codificados por VH4-34, mAb 216 a concentraciones de 50, 25 y 12,5 ng/ml y Y2K a 50 ng / ml, se analizaron en presencia de medios con y sin calcio. Como se muestra en la FIG. 6A, la viabilidad celular disminuyó significativamente en ausencia de calcio, lo que indica que el calcio era necesario para la reparación de la herida. Las células tratadas con anticuerpos de control o sin anticuerpos no mostraron ningún cambio en la viabilidad celular en presencia o ausencia de calcio. Otras líneas de células B, OCI-Ly8 y Reh también mostraron un aumento similar en la citotoxicidad en condiciones libres de calcio (datos no mostrados).

30

35

#### Ejemplo 4

### 40 La reparación daños en la membrana inducidos por mAb 216 es dependiente de golgi funcional

Se sabe que el tratamiento con Brefeldina A (BFA) da lugar a la liberación de proteínas de la cubierta asociadas con el aparato de Golgi, la redistribución de la membrana de Golgi en el retículo endoplasmático y un bloqueo en la secreción desde el aparato de Golgi Klausner, R. D., (1992) J. Cell Biol. 116, 1071). Los lisosomas recién formados no se generan en las células tratadas con BFA, proporcionando así una condición para analizar su requisito en la reparación de heridas. Por lo tanto, la capacidad de los lisosomas recién formados para ayudar en la reparación de las heridas en la membrana inducidas por mAb 216 se analizó mediante el tratamiento de las células con BFA.

45

#### Procedimientos:

Brefeldina-A se obtuvo de Sigma. Las células Nalm-6 ( $1 \times 10^6$  células / ml) se trataron con BFA (25  $\mu\text{g}$  / ml) durante 2 horas a 37 °C antes del tratamiento con mAb 216. Las muestras de control con cantidades equivalentes de DMSO se establecieron en paralelo. Las células fueron expuestas después a 25  $\mu\text{g}$  de mAb 216 o Ab control y se analizaron por citometría de flujo.

50

#### Resultados:

Como se muestra en la FIG. 6B, la viabilidad celular (porcentaje de células viables) se redujo mediante la combinación de BFA y mAb 216, lo que demuestra un efecto sinérgico sobre la viabilidad. BFA no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células tratadas con anticuerpos de control. Este resultado demuestra que BFA bloqueaba la reparación de la membrana, lo que sugiere que los lisosomas recién generados son necesarios para la reparación de la membrana y la supervivencia continuada y la integridad de líneas de células B heridas por mAb 216. Por tanto, este resultado confirma adicionalmente que el mAb 216 genera heridas en la membrana de las células B, y que las células intentan parchear la herida utilizando fusión lisosomal con la membrana plasmática. Cuando la BFA inhibe la generación de lisosomas adicionales, el proceso de reparación puede no ser adecuado para mantener la viabilidad celular.

## 10 Ejemplo 5

### Destrucción sinérgica de células B con vincristina

La destrucción celular potenciada se demostró cuando el mAb 216 se combinó con agentes quimioterapéuticos, en particular con vincristina, en ensayos de citotoxicidad dirigidos contra líneas de células B. Tres líneas celulares que han derivado de blastos de LLA de diferente genotipo y fenotipo, Nalm 6, REH, y SUPB 15, se incubaron con mAb 216 solo o en combinación con vincristina (VCR), durante 48 horas a 37 °C.

Como se muestra en la FIG. 4 y en la Tabla 1 a continuación, estos resultados muestran que a concentraciones bajas de vincristina (0,2 ng / ml), no se produjo la muerte celular debido al tratamiento con vincristina sola. Sin embargo, cuando se combinó vincristina con mAb 216, el porcentaje de células B muertas fue más del doble, lo que demuestra una interacción sinérgica. La citotoxicidad de mAb 216 para los linfoblastos B progenitores, solo y en combinación con quimioterapia, hace que este anticuerpo sea un reactivo prometedor para estudios posteriores de inmunoterapia en la LLA infantil.

## Ejemplo 6

### Citotoxicidad mejorada de mAb 216 para las líneas celulares B mediante agentes quimioterapéuticos

Se analizó la citotoxicidad *in vitro* de mAb216 en combinación con agentes quimioterapéuticos individuales. Tres líneas celulares que han derivado de blastos de LLA de diferente genotipo y fenotipo, Nalm 6, REH, y SUPB 15, se incubaron con mAb 216 solo o en combinación con vincristina (VCR), daunorubicina (DNR), o L-asparaginasa (ASPR). Todos los agentes quimioterapéuticos cuando se utilizan en combinación con mAb 216 dieron como resultado un mayor grado de citotoxicidad que el observado cualquiera de los agentes de quimioterapia individuales o mAb 216 solo. Sin embargo, la combinación de vincristina con mAb 216 fue más eficaz, dando como resultado una magnitud de citotoxicidad que fue sinérgica en comparación con la cantidad de muerte celular inducida por cualquiera de vincristina o mAb 216 por separado. Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación. Estos resultados demuestran la citotoxicidad potenciada de mAb 216 en presencia de agentes quimioterapéuticos, en parte al menos porque el tratamiento con mAb 216 tiene como resultado la permeabilización de las células B y permite el acceso de los agentes quimioterapéuticos al interior celular, de otro modo impermeable.

**Tabla 1. Citotoxicidad *in vitro* de mAb216 en combinación con agentes quimioterapéuticos**

| línea celular / tiempo de incubación | Tratamiento     | Células vivas x 10 <sup>5</sup> | % cambio en las células vivas |
|--------------------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Nalm 6 48 h                          | control         | 13                              |                               |
|                                      | mAb 216 5 µg/ml | 10                              | 23                            |
|                                      | VCR 0,2 ng/ml   | 13                              | 0                             |
|                                      | mAb 216 + VCR   | 6                               | 53                            |
| Nalm 6 48 h                          | control         | 8,2                             |                               |
|                                      | mAb 216 5 µg/ml | 5,6                             | 31                            |
|                                      | DNR 5 ng/ml     | 4,3                             | 47                            |
|                                      | mAb 216 + DNR   | 1,5                             | 81                            |
| Nalm 6 48 h                          | control         | 11                              |                               |
|                                      | mAb 216 5 µg/ml | 7,1                             | 35                            |

## ES 2 551 502 T3

|              |                  |      |    |
|--------------|------------------|------|----|
|              | VCR 2 ng/ml      | 5    | 54 |
|              | mAb 216 + VCR    | 0,28 | 97 |
| Nalm 6 48 h  | control          | 12   |    |
|              | mAb 216 5 µg/ml  | 5,1  | 57 |
|              | ASPR 0,8 U/ml    | 9,2  | 23 |
|              | mAb 216 + ASPR   | 3,2  | 73 |
| REH 48 h     | control          | 8,6  |    |
|              | mAb 216 5 µg/ml  | 4,6  | 46 |
|              | VCR 2 ng/ml      | 4,2  | 86 |
|              | mAb216 + VCR     | 0,45 | 94 |
| REH 48h      | control          | 13   |    |
|              | mAb 216 5 µg/ml  | 11   | 15 |
|              | VCR 2 ng/ml      | 7,7  | 40 |
|              | mAb 216 + VCR    | 0,9  | 93 |
| REH 48h      | control          | 9,6  |    |
|              | mAb 216 5 µg/ml  | 3,4  | 65 |
|              | ASPR 0,8 U/ml    | 6,2  | 35 |
|              | mAb 216 + aspar. | 2,4  | 75 |
| SUP B 15 48h | control          | 5,1  |    |
|              | mAb 216 µg/ml    | 3,6  | 29 |
|              | VCR 2 ng/ml      | 2,8  | 45 |
|              | DNR 4 ng/ml      | 0,44 | 91 |
|              | mAb216+VCR       | 1,5  | 50 |
|              | mAb 216 + DNR    | 0,38 | 92 |
| SUP B15 48h  | control          | 5,7  |    |
|              | mAb 216 µg/ml    | 4,3  | 24 |
|              | ASPR 0,8 U/ml    | 3    | 47 |
|              | mAb 216 + ASPR   | 2,3  | 60 |

VCR; vincristina, DNR; Daunorubicina, ASPR; asparginasa

### Ejemplo 7

#### Densidad de receptores de mAb 216 en los linfocitos B

- 5 La densidad de los receptores de la superficie a los que se une mAb 216 sobre los linfocitos B se determinó usando procedimientos estándar, como se describe brevemente a continuación. Se usaron la línea de células pre-B Nalm-6 y linfocitos B esplénicos humanos. Brevemente, mAb 216 se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Molecular Probes, Inc.), y la absorbancia del anticuerpo conjugado puro se midió a 280 nm y 492 nm para determinar la relación entre el fluoróforo y la proteína (F/P). La cantidad de FITC por molécula de 216 se calculó utilizando la fórmula estándar.

Las células se incubaron con una concentración creciente de anticuerpo conjugado y las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo. La cantidad de anticuerpo requerida para alcanzar la saturación se registró. Usando la relación fluoresceína / proteína (F / P), se calcularon las moléculas de receptores en la superficie celular: Se encontró que las células Nalm-6 expresaban receptores a una densidad de aproximadamente  $2 \times 10^6$  receptores por célula y se encontró que las células B esplénicas expresaban receptores a una densidad de aproximadamente  $1,34 \times 10^6$  receptores por célula en la superficie celular. Estas densidades son similares a las observados para la expresión de CD8 en las células T. Las células de la línea celular Nalm-6 tienen un tamaño aproximadamente una vez y media mayor que las células B esplénicas.

#### Referencias

1. Siiman, O y Burshteyn, A. (2000) "Cell surface receptor-antibody association constants and enumeration of receptor sites for monoclonal antibodies," *Cytometry* 40(4), 316-26.
2. <http://www.drmr.com/abcon/FITC.html>. FITC conjugation of antibodies.
3. <http://www.cyto.purdue.edu/hmarchiv/1995/0979.htm>. Antigen density.
4. <http://iacf.bsd.uchicago.edu/FlowHome/Protocols/abconjugate.htm>. Antibody conjugation.

#### 15 Ejemplo 8

##### El epítipo para mAb216 se asocia con el citoesqueleto

Los receptores de la superficie celular pueden permanecer asociados con estructuras del citoesqueleto después de la unión del ligando específico, después de reticulación por lectinas, o en un estado desocupado. Una asociación entre el receptor y el citoesqueleto se puede investigar mediante la evaluación de la proporción de los receptores que no se solubiliza por acción del detergente no iónico NP-40 y permanece asociado a la matriz de citoesqueleto insoluble. Para determinar si el epítipo CDIM de las células B se asocia con el citoesqueleto, la c-localización de la unión de mAb 216 con la matriz insoluble del citoesqueleto de las células B se investigó usando anticuerpos fluorescentes y radiomarcados, tal como se describe a continuación.

##### Procedimientos:

Las células Nalm-6 se marcaron a  $4^\circ\text{C}$  con mAb 216biotinilado o con anti-CD71 conjugado con FITC o anti-CD19 conjugado con FITC. Las células marcadas con FITC se lavaron dos veces, y se resuspendieron en un tampón de extracción que contiene 0,5 % de NP-40. Las células marcadas con mAb216 biotinilado se lavaron dos veces y después se tiñeron con avidina-FITC, se lavaron de nuevo, y se resuspendieron en un tampón de extracción que contiene 0,5 % de NP-40. El tratamiento con NP-40 raspa las células de las proteínas de membrana solubles en detergente, y deja la matriz y el núcleo del citoesqueleto intactos. Las células raspadas intactas se analizaron mediante FACS o microscopia de fluorescencia.

MAB 216 directamente conjugado con radioisótopos  $^{125}\text{I}$  se incubó con la línea de células pre-B Nalm-6 ( $1 \times 10^6$  células) durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Tras múltiples lavados, las células se homogeneizaron mecánicamente o las proteínas de la membrana solubilizaron utilizando 0,5 % de NP-40. El material se centrifugó después a  $6000 \times g$  durante 15 minutos y la distribución de  $^{125}\text{I}$ -mAb 216 se determinó en el sedimento (que consistió principalmente en el núcleo y el citoesqueleto asociado) y el sobrenadante (que consistía principalmente en la membrana celular y el citoplasma).

##### Resultados:

La fluorescencia de anticuerpos que se unen a los antígenos asociados a la membrana CD71 and CD 19 y en las células Nalm-6 debido a los anticuerpos conjugados con FITC fue abolida después de esta exposición a tampón NP-40. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de mAb 216 unido al ligando de células B no cambió después del tratamiento con detergente.

Además, se encontró que la mayor parte de  $^{125}\text{I}$ -mAb 216 (80-85 %) estaba asociada con la fracción nuclear / citoesqueleto después de la sedimentación. Se encontró muy poco mAb 216 en la fracción citoplásmica, donde la mayoría de las proteínas unidas a la membrana se sabe que se fraccionan.

Estos datos demuestran que el anticuerpo anti-CDIM, mAb 216, se une a un epítipo que está asociado con el citoesqueleto de la célula B.

#### Ejemplo 9

##### La citotoxicidad de mAb 216 se potencia mediante reticulación

La citotoxicidad *in vitro* de mAb 216 para las células NALM-6 se evaluó usando tinción con PI y evaluación de la viabilidad (porcentaje de células vivas) como una función de la cantidad de mAb 216 presente. La cantidad de mAb

216 necesaria para lograr 50 % y 80 % de viabilidad en células Nalm- 6 con y sin un agente de reticulación (un mAb secundario, por ejemplo, lambda anti-humano) se muestra en la Tabla 1, expresada en nanogramos de anticuerpo requeridos para lograr el nivel indicado de la citotoxicidad, tal como se determina por la entrada de PI en las células.

5 Estos resultados demuestran que la viabilidad celular también se ve influida por la adición de un agente de reticulación, en el presente documento un anticuerpo secundario que se une a la IgM. Como se muestra más adelante, la adición de un agente de reticulación potencia la citotoxicidad de mAb 216 de tal manera que se requiere sólo la mitad de anticuerpo para lograr un 20 % de muerte celular (80 % de viabilidad), y se requiere sólo el 60 % de anticuerpos para alcanzar un 50 % de muerte celular (50 % de viabilidad) en presencia de anticuerpo de reticulación. El agente de reticulación parece proporcionar una rigidez adicional al complejo receptor de la superficie celular- anticuerpo para potenciar las heridas y / o la muerte celular.

**Tabla 1: Valores DE50 y DE80 de mAb 216 con y sin reticulación**

| Con Ab secundario | DE50     | DE80    |
|-------------------|----------|---------|
| Experimento 1     | 697,644  | 257,944 |
| Experimento 2     | 647,524  | 214,164 |
| Sin Ab secundario |          |         |
| Experimento 1     | 1036,346 | 576,345 |

#### Ejemplo 10

15 **La citotoxicidad de mAb 216 se potencia mediante reticulación pero la citotoxicidad de Rituxan no se potencia mediante reticulación**

La citotoxicidad *in vitro* de mAb 216 y C2B8 (RITUXAN<sup>®</sup>) para las células OCI-Ly8 se evaluó usando la tinción con PI y evaluación de la viabilidad (porcentaje de células vivas) de las células tratadas con mAb 216 y C2B8. Las células OCI-Ly8 ( $5 \times 10^5$  células / ml) se trataron durante la noche a 37 °C con 15  $\mu\text{g}$  de cada anticuerpo en ausencia de complemento y de células efectoras. Se añadió anticuerpo secundario (5  $\mu\text{g}$ ) a las muestras apropiadas (anti-IgG y anti-IgM). Las células se lavaron, se resuspendieron en medio de tinción que contiene PI, y se analizaron en FacsCan. Las células se mantuvieron a 37 °C en todo momento.

#### Resultados

25 Las células viables (negativas para PI) en cada muestra se muestran en la FIG. 7. Como se muestra en la FIG. 7, la viabilidad de las células tratadas con ningún anticuerpo (control), y con los anticuerpos C2B8, anti-IgG, anti-IgM, y C2B8 + anti-IgG, fue similar, lo que indica que ninguno de estos tratamientos causaba una citotoxicidad significativa en ausencia de complemento o de células efectoras. El tratamiento con MAb 216 sin anticuerpo secundario dio como resultado una viabilidad de alrededor del 65 %. En presencia de anticuerpo secundario, la combinación de mAb 216 + anti-IgM dio como resultado una viabilidad de sólo aproximadamente un 20 %.

30 Estos resultados demuestran una mejora significativa en la citotoxicidad de mAb 216 (una IgM, que posee la capacidad para reticular antígenos en virtud de su estructura pentamérica) que se debe a la reticulación adicional que se produjo en presencia del agente de hiperreticulación anti-IgM.

#### Ejemplo 11

**Citotoxicidad dependiente de la dosis de mAb 216 frente a células B esplénicas y un revestimiento de células B**

35 La titulación de anticuerpo en una suspensión de células Nalm-6 o de células B esplénicas ( $5 \times 10^5$  células por ml) demuestra la citotoxicidad dependiente de la dosis de mAb 216 para las células B. Como se muestra en la figura. 8, a medida que aumenta la cantidad de anticuerpo conjugado con FITC, la cantidad de fluorescencia detectada usando FACSscan aumenta rápidamente, hasta que todos los sitios del receptor celular se saturan con el anticuerpo. Las curvas de unión de ambos tipos de células parecen ser similares, exhibiendo saturación a aproximadamente la misma concentración de anticuerpo. Sin embargo, la dependencia de la viabilidad celular de la concentración de mAb varía significativamente entre los tipos de células. Por ejemplo, aproximadamente a 5  $\mu\text{g}$  /ml de anticuerpo, las

células B esplénicas exhiben una viabilidad de aproximadamente un 65 %. En contraste, las células Nalm-6 a la misma concentración de anticuerpo exhiben una viabilidad de sólo aproximadamente un 42 %. Esta cantidad de anticuerpo es suficiente para proporcionar al menos un exceso multiplicado por tres de la cantidad total de epítopos CDIM sobre las células Nalm-6, y está más cerca de un exceso de cinco veces para las células B esplénicas. A aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo, las células B esplénicas exhiben una viabilidad de aproximadamente un 48 %, mientras que las células Nalm-6 exhiben una viabilidad de sólo de aproximadamente un 30 %. Por lo tanto, las líneas de células B muestran mayor susceptibilidad a la destrucción con el anticuerpo de unión a CDIM que los linfocitos B maduros, lo que sugiere que las células B neoplásicas son más susceptibles a la destrucción con mAb 216 que las células B maduras.

## 10 Ejemplo 12

### Eficacia de mAb 216 en los pacientes con LLA en los ensayos clínicos

Este estudio de fase I de escalada de dosis de mAb 216 humano se llevó a cabo en adultos con LLA de células B-precursoras recidivante o resistente para definir preliminarmente la actividad anti-tumoral de mAb 216 dentro de los confines de un estudio de fase I; y para evaluar la actividad biológica de mAb 216 en pacientes con LLA recidivante o resistente. Los pacientes habían sido tratados previamente varias veces con vincristina como parte de un programa de tratamiento de múltiples fármacos, pero se habían vuelto refractarios al tratamiento con vincristina, es decir, el tratamiento con vincristina no fue eficaz para reducir los recuentos de blastos leucémicos.

#### Administración de anticuerpo: Día 0 y Día 7

La tasa de dosis inicial en el momento de la primera infusión de mAb 216 fue de 25 mg / hora durante la primera media hora. Si se produjo ninguna toxicidad o acontecimiento relacionado con la infusión, la tasa de dosis se aumentó (incrementos de 25 mg / hora a intervalos de 30 minutos) hasta un máximo de 200 mg / hora, a una dosis total de 1,25 mg / kg.

#### Evaluación y Farmacocinética de la enfermedad

La respuesta temprana a la terapia se realizó el día 7, antes de proceder con la segunda infusión de anticuerpos. Los pacientes recibieron la segunda dosis de anticuerpo junto con vincristina.

#### Quimioterapia

La vincristina se le dio a una dosis de 1,5 mg /  $\text{m}^2$  / dosis de IVP el día 7 antes de iniciar la dosis nº 2 de anticuerpos.

#### Resultados

Los pacientes tratados con mAb 216 solo mostraron una disminución de los glóbulos blancos después de la infusión de anticuerpo. Los pacientes posteriormente tratados con la combinación de vincristina y mAb216 mostraron una disminución más espectacular de los GR. Estos datos se presentan gráficamente en las FIGS. 9A y 9B. Las flechas indican los días de la administración de mAb 216, con y sin vincristina.

El paciente 2 presentó 90-95% de blastos en sangre periférica y médula ósea periférica, y un recuento de leucocitos en aumento. El tratamiento con 1,25 mg / kg de mAb216 solo produjo un descenso transitorio del recuento de GB, y al día 7, los recuentos de GB se elevaron de nuevo a más de  $10^5$  GB por  $\mu\text{l}$ . El tratamiento con 1,25 mg / kg de mAb216 en combinación con vincristina a 1,5 mg /  $\text{m}^2$  / dosis de IVP resultó en una disminución espectacular de los GB. Los resultados se muestran en la figura 9A.

Paciente 3 presentó 90-98 % blastos en sangre periférica y médula ósea periférica, y un recuento de leucocitos de aproximadamente 40.000 leucocitos /  $\mu\text{l}$ . El tratamiento con 1,25 mg / kg de mAb216 solo dio lugar a una disminución transitoria en el recuento de leucocitos, y al día 7, los recuentos de glóbulos blancos se elevaron de nuevo. El tratamiento con 1,25 mg / kg de mAb 216 en combinación con vincristina a 1,5 mg /  $\text{m}^2$  / dosis IVP resultó de nuevo en una disminución espectacular de los GB. Los resultados se muestran en la figura 9B.

Estos datos demuestran que la combinación de tratamiento quimioterapéutico con mAb 216 tiene como resultado una eficacia sorprendente y sinérgica en pacientes humanos que sufren LLA. Se demuestra que los GB son más susceptibles al tratamiento con agentes quimioterapéuticos debido al tratamiento con mAb 216, incluso a concentraciones subletales del anticuerpo, lo que potencia la eficacia de los tratamientos con agentes quimioterapéuticos adicionales.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un anticuerpo codificado por VH4-34 que se une al epítipo CDIM, que es el epítipo reconocido por el mAb 216, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que padece una afección **caracterizada por** una hiperproliferación de las células B, en el que dicho anticuerpo VH4 -34 se une al epítipo CDIM en la superficie de las células B hiperproliferativas y en el que dicho anticuerpo VH4 -34 es administrado en una cantidad eficaz para matar preferentemente a las células B hiperproliferativas, en relación con las células B normales.
2. El uso de la reivindicación 1, en la que el mamífero es un ser humano.
3. El uso de la reivindicación 1, en la que el mamífero es un mamífero no humano.
- 10 4. El uso de la reivindicación 1, en el que las células B hiperproliferativas son células cancerosas.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que las células hiperproliferativas están estimuladas en una condición hiperproliferativa por factores de crecimiento, citocinas, o infecciones virales.
6. El uso de la reivindicación 4, en el que la viabilidad de las células cancerosas puede ser reducida en una cantidad que es al menos diez por ciento mayor que la viabilidad de las células normales.
- 15 7. Uso de un anticuerpo codificado por VH4-34 que se une al epítipo CDIM, que es el epítipo reconocido por el mAb 216, en la fabricación de un medicamento para matar una célula B neoplásica, en el que dicha destrucción comprende poner en contacto una célula B neoplásica con una cantidad citotóxica de un anticuerpo codificado por VH4-34 que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula B neoplásica e induce formación de heridas en la membrana celular en la célula B neoplásica, en el que la cantidad citotóxica del anticuerpo VH4-34 que produce heridas celulares es una cantidad eficaz para matar preferentemente a las células B neoplásicas, pero no para matar a las células normales.
- 20 8. El uso de la reivindicación 7, que comprende además la administración de un agente citotóxico en combinación con el anticuerpo codificado por VH4-34.
- 25 9. El uso de la reivindicación 8, en el que el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, un isótopo radiactivo, un anticuerpo citotóxico, un inmunoconjugado, un inmunosupresor, un regulador y / o inhibidor del crecimiento celular, una toxina, o mezclas de los mismos.
- 30 10. 11. El uso de la reivindicación 7, que comprende además la administración de un agente de reticulación que proporciona reticulación del anticuerpo codificado por VH4-34 que se une a un antígeno de superficie celular altamente expresado en la superficie de la célula cancerosa neoplásica, en el que el agente de reticulación que se une a al anticuerpo formador de heridas celulares es un anticuerpo anti-kappa, anti-lambda o un anticuerpo anti-VH4-34, que se une específicamente a un epítipo presente en la región variable de un anticuerpo codificado por el gen VH4-34.
- 35 11. Uso de un anticuerpo codificado por VH4-34 que tiene unión específica para un epítipo CDIM, que es el epítipo reconocido por el mAb 216, en la superficie de las células B para la fabricación de un medicamento para inducir formación de heridas en la membrana celular en una célula B en un paciente humano, en el que dicha inducción de formación de heridas en la membrana celular comprende poner en contacto las células B con un anticuerpo que se une al epítipo CDIM presente en la superficie de la célula B, en el que la cantidad de anticuerpo es eficaz para producir heridas preferentemente en células B hiperproliferativas, con respecto a las células B normales.
- 40 12. El uso de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es administrado al paciente en una cantidad eficaz para producir heridas en las células B hiperproliferativas, pero no es eficaz para matar las células B hiperproliferativas.
- 45 13. El uso de la reivindicación 11, en el que el uso comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas y de las células B normales para producir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para producir heridas y / o matar preferentemente a las células B hiperproliferativas en el paciente.
- 50 14. El uso de la reivindicación 13, que comprende además la titulación en cantidades adicionales de anticuerpo al paciente para lograr la cantidad deseada de formación de heridas y / o muerte celulares.
15. El uso de la reivindicación 11, en el que el uso comprende (1) la obtención de muestras de sangre de un paciente en necesidad de tratamiento para determinar el número de células B hiperproliferativas en la sangre del paciente, (2) determinar la susceptibilidad de las células B hiperproliferativas para producir heridas por el anticuerpo, y (3) administrar una cantidad del anticuerpo al paciente suficiente para producir heridas en las

células B hiperproliferativas en el paciente.

16. El uso de la reivindicación 11, que comprende además administrar una cantidad eficaz de un agente citotóxico al paciente.
- 5 17. El uso de la reivindicación 11, en el que la afección **caracterizada por** una hiperproliferación de las células B es cáncer linfoide, infección viral, inmunodeficiencia, o enfermedad autoinmune.
18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicha infección viral es el virus de la inmunodeficiencia humana o mononucleosis.
19. El uso de la reivindicación 17, en el que dicha inmunodeficiencia es enfermedad linfoproliferativa postrasplante, o síndrome de inmunodeficiencia.
- 10 20. El uso de la reivindicación 16, en el que el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, un isótopo radiactivo, un anticuerpo citotóxico, un inmunoconjugado, un inmunosupresor, un regulador y / o inhibidor del crecimiento celular, una toxina, o mezclas de los mismos.

**mAb codificados por V4-32 se unen a linfomas de células B primarios y leucemias de todas las categorías**

| nº de muestra # | Diagnóstico                             | FMC * |
|-----------------|---|-------|
| 1               | Linfoma difuso de células grandes       | +++   |
| 2               | Linfoma difuso de células grandes       | +++   |
| 3               | Linfoma folicular                       | ++    |
| 4               | Linfoma folicular                       | ++    |
| 5               | Linfoma folicular                       | ++    |
| 6               | leucemia de células B pre               | +++   |
| 7               | LLS: etaoa leucemia)                    | +++   |
| 9               | linfoma células T                       | -     |
| 10              | Linfoma difuso de células pequeñas      | +++   |
| 11              | Linfoma difuso de células grandes       | +++   |
| 12              | LLA linfoblástica (B); todas las etapas | +++   |
| 13              | Linfoma difuso de células grandes       | ++    |
| 14              | Linfoma difuso de células pequeñas      | +++   |
| 15              | Linfoma de las células del manto        | +++   |

\*FMC: fluorescencia media en el canal. Las células se tiñeron con 216-biotina (1 µg/ml) y avidina-FITC

FIG. 1

Los mAB codificados por VH4-34 se unen y matan líneas de células B humanas

| línea células B estadio células B |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Nalm-6<br>Pre-B                   | Arent<br>B maduras                | Daudi<br>de Burkitt               | VB5<br>linfoblastoide             |                                   |
| Reh<br>Pre-B                      | OCI-Ly8<br>B maduras              | Ramos<br>de Burkitt               | MF4<br>linfoblastoide             |                                   |
|                                   | Sup-B8<br>B maduras               |                                   | JB7<br>linfoblastoide             |                                   |

FIG. 2

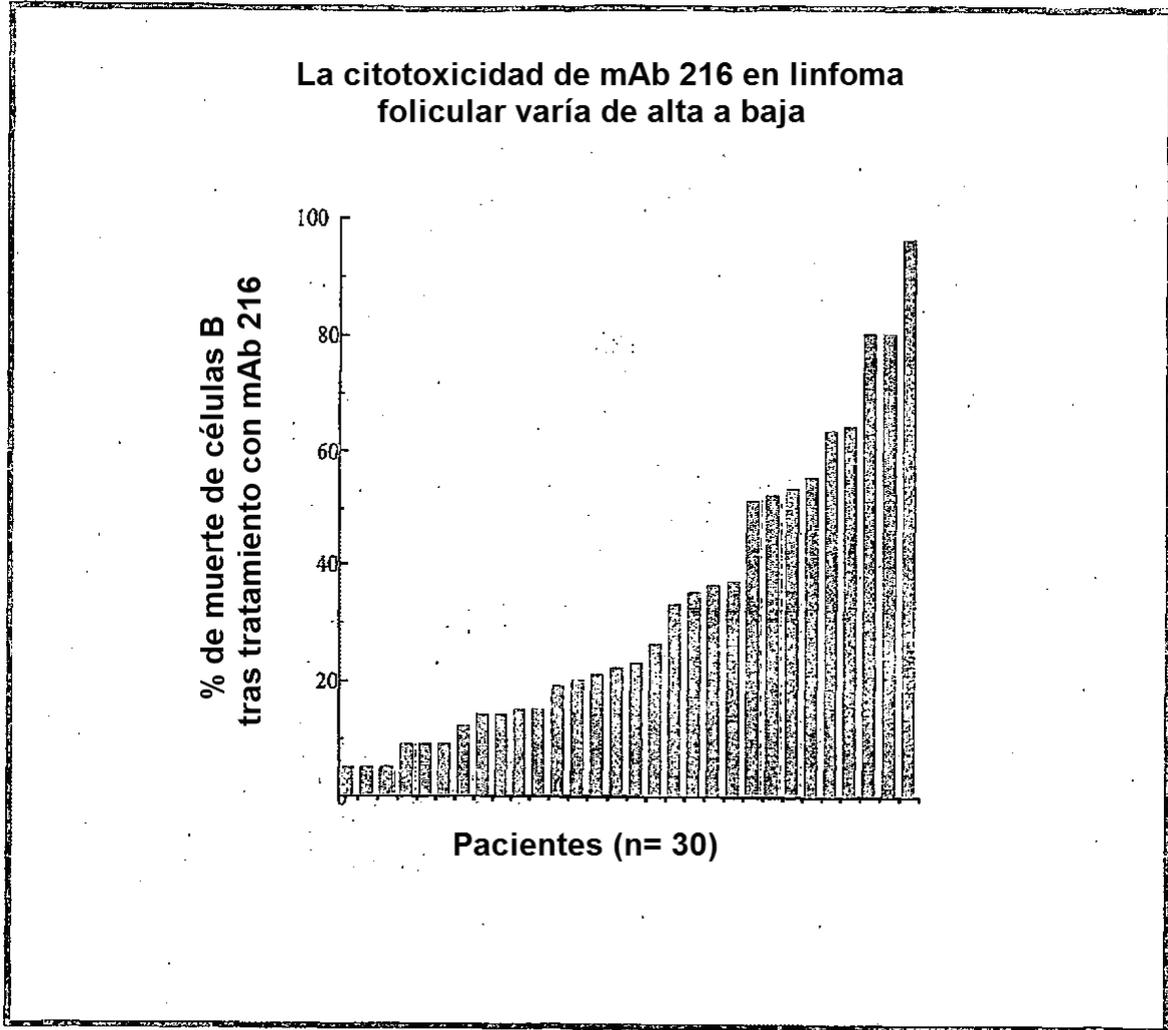


FIG. 3

**La citotoxicidad mediada por vincristina y mAb 216 es sinérgica**

|                |              | Células vivas<br>$10^5/ml$ | % muertas |
|----------------|--------------|----------------------------|-----------|
| <b>Nalm-6</b>  | control      | 11                         |           |
|                | 216          | 7.1                        | 35        |
|                | VCR 2ng/ml   | 5                          | 54        |
|                | 216 + VCR    | 0.28                       | 97        |
|                | control      | 13                         |           |
|                | 216          | 10                         | 23        |
|                | VCR 0.2ng/ml | 13                         | 0         |
|                | 216 + VCR    | 6                          | 53        |
| <b>REH</b>     | control      | 8.6                        |           |
|                | 216          | 4.6                        | 46        |
|                | VCR 2ng/ml   | 4.2                        | 51        |
|                | 216 + VCR    | 0.45                       | 94        |
|                | control      | 13                         |           |
|                | 216          | 11                         | 15        |
|                | VCR 2ng/ml   | 7.7                        | 40        |
|                | 216 + VCR    | 0.9                        | 93        |
| <b>SUP B15</b> | control      | 5.1                        |           |
|                | 216          | 3.6                        | 29        |
|                | VCR 2ng/ml   | 2.8                        | 45        |
|                | 216 + VCR    | 1.5                        | 70        |

Tres líneas celulares con diferentes genotipos y fenotipos:  
 Nalm-6: pre B, CD19+, 10+, HAL DR+, no sm o cy Ig, diploides, dobles en 30 h  
 REH: pre B, CD19+, 10+, 20+, DR+, no Ig gen de fusión TEL\_AML1, dobles en 45-50 h  
 SUPB15: pre B, CD19+, 10+, 13+, 34+, 37+, DR+, cito, IgM/k pos, gen BCR-ABL, dobles en 60-70 h  
 Las células se cuentan con un hemocitómetro usando azul tripán para determinar el recuento celular total.  
 Después las células se analizan en un citómetro de flujo usando tinción con yoduro de propidio (PI) para obtener un porcentaje preciso de células muertas.  
 Las células control se usan para acotar las células y esta acotación determina el porcentaje de vivas para cada muestra.  
 El recuento celular es necesario porque hay lisis/pérdida celular durante la incubación y ello no se refleja en el porcentaje de muertas cuando se analiza.

FIG. 4

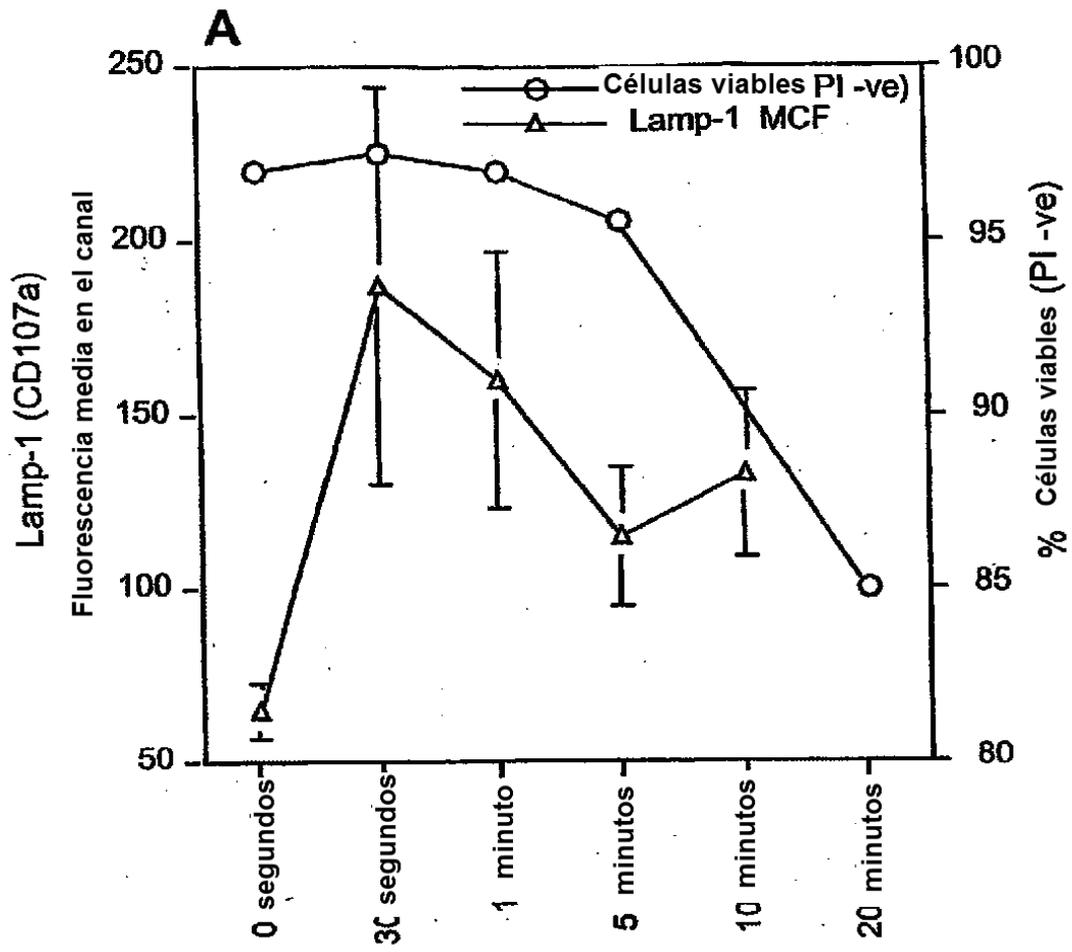


FIG. 5A

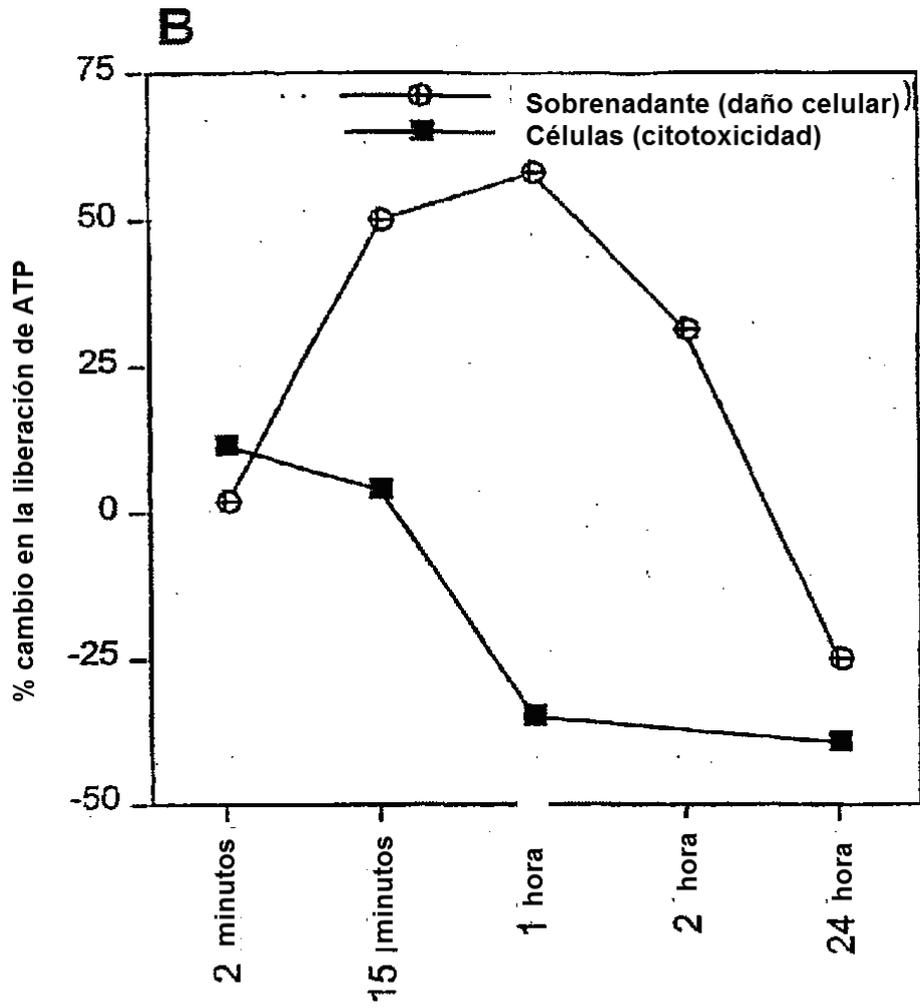


FIG. 5B

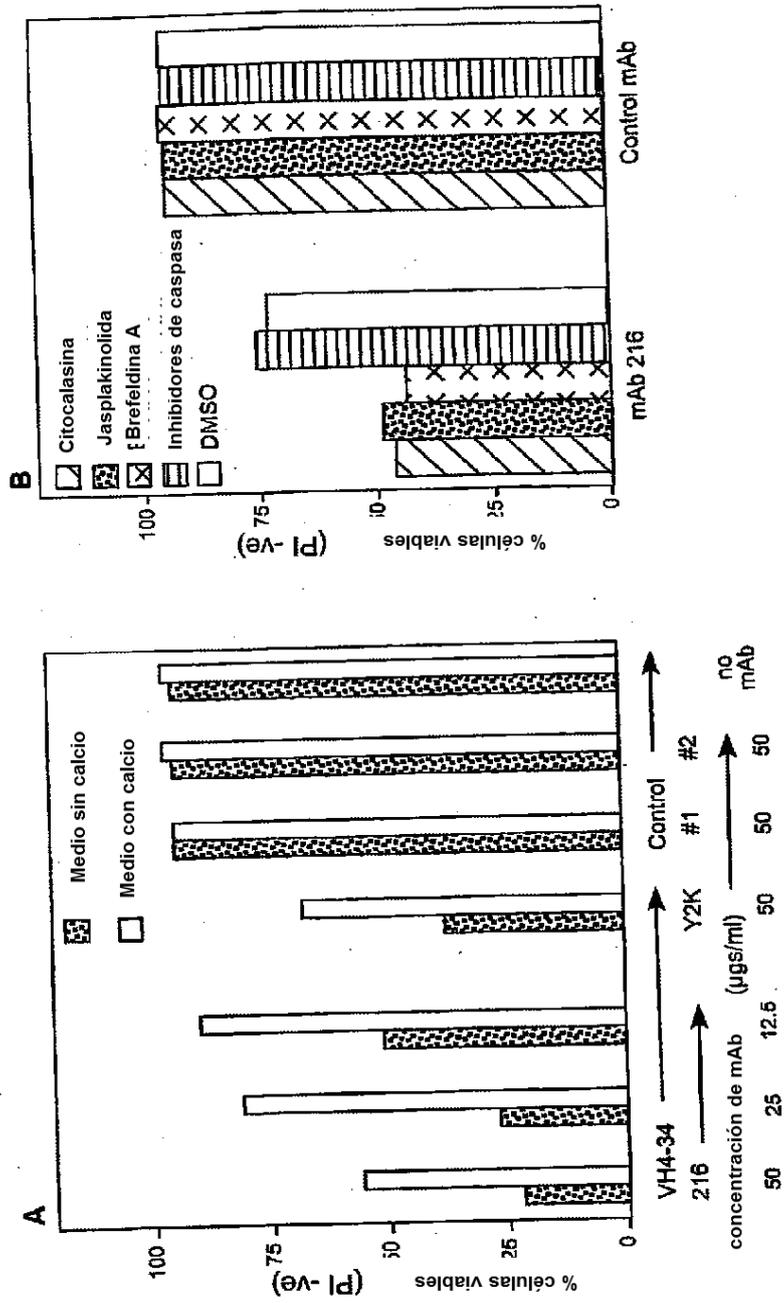


FIG. 6 A y B

Reticulación de mAb 216 conduce a un incremento de la toxicidad

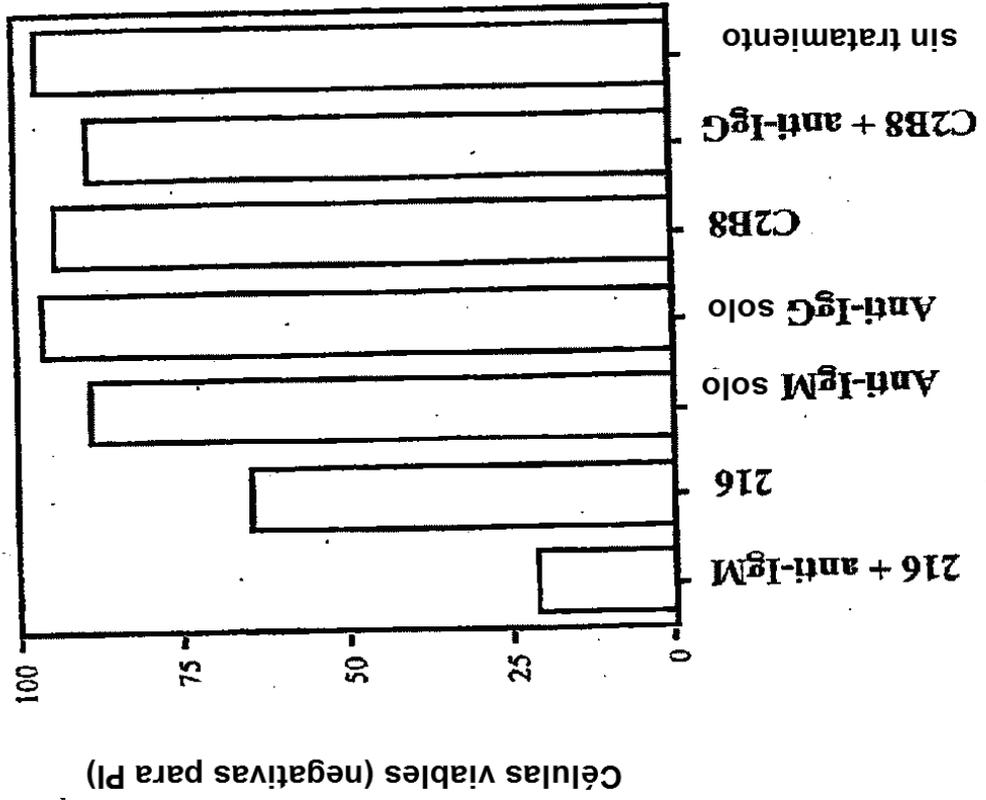


FIG. 7

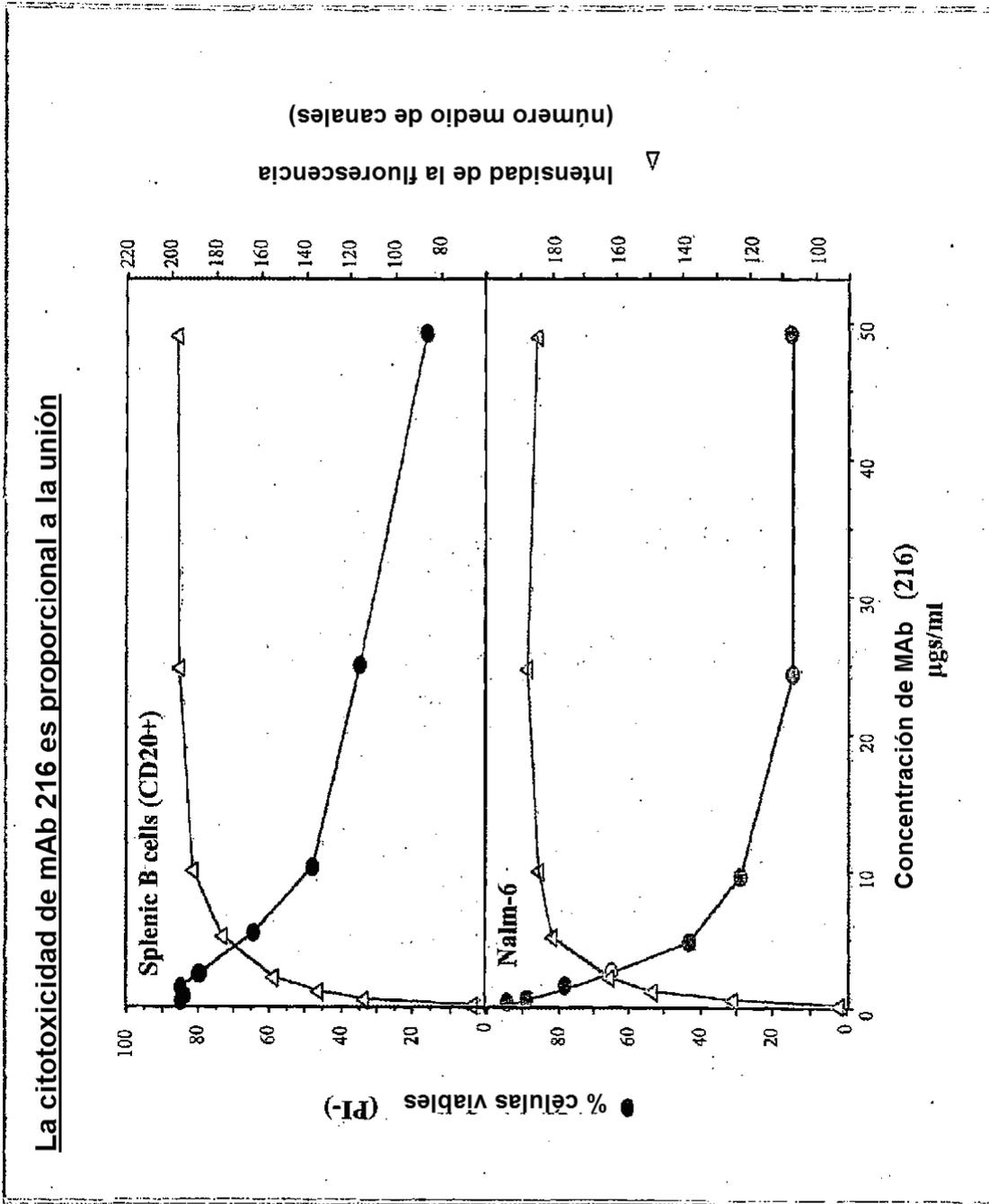


FIG. 8

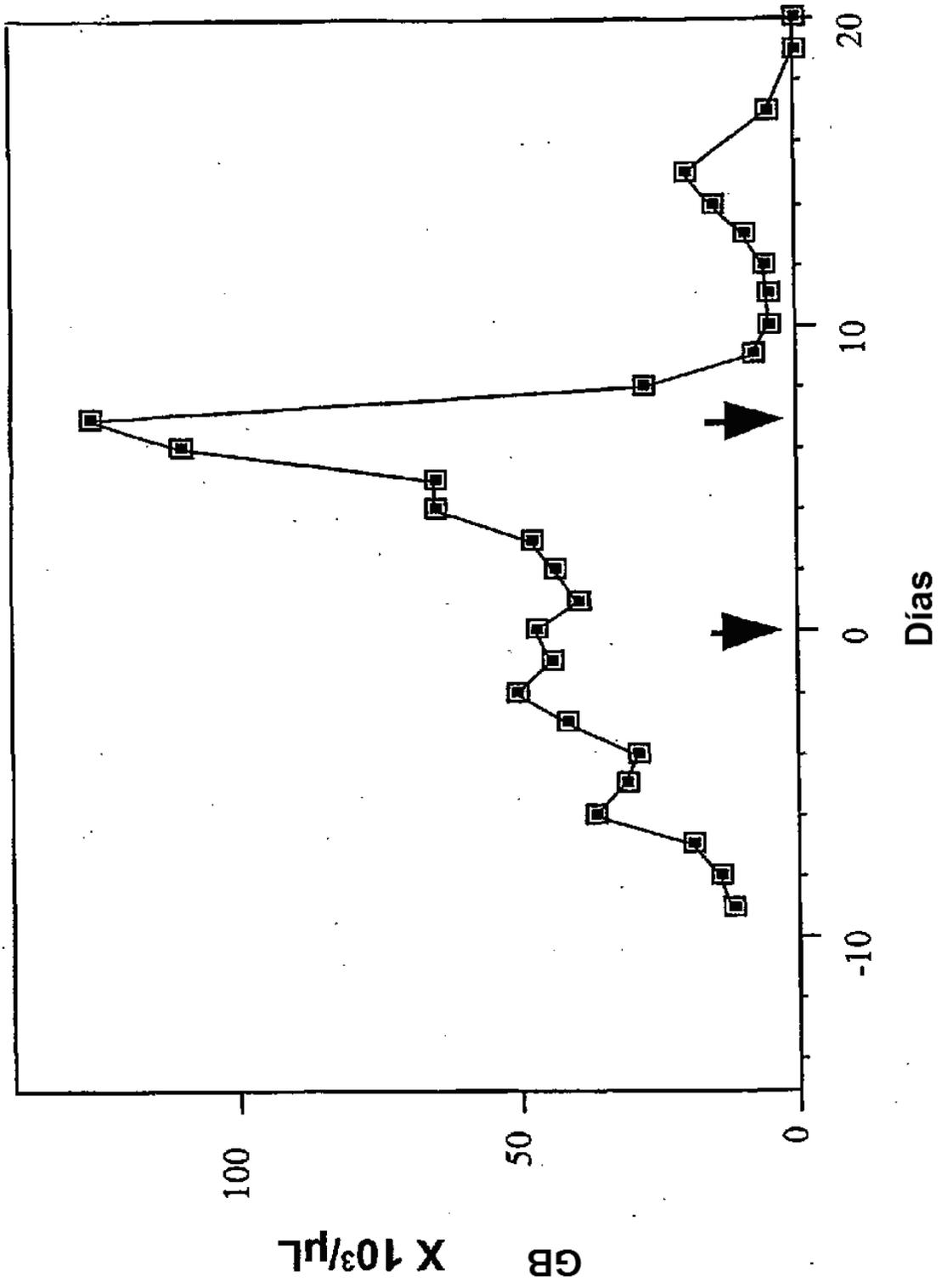


FIG. 9A

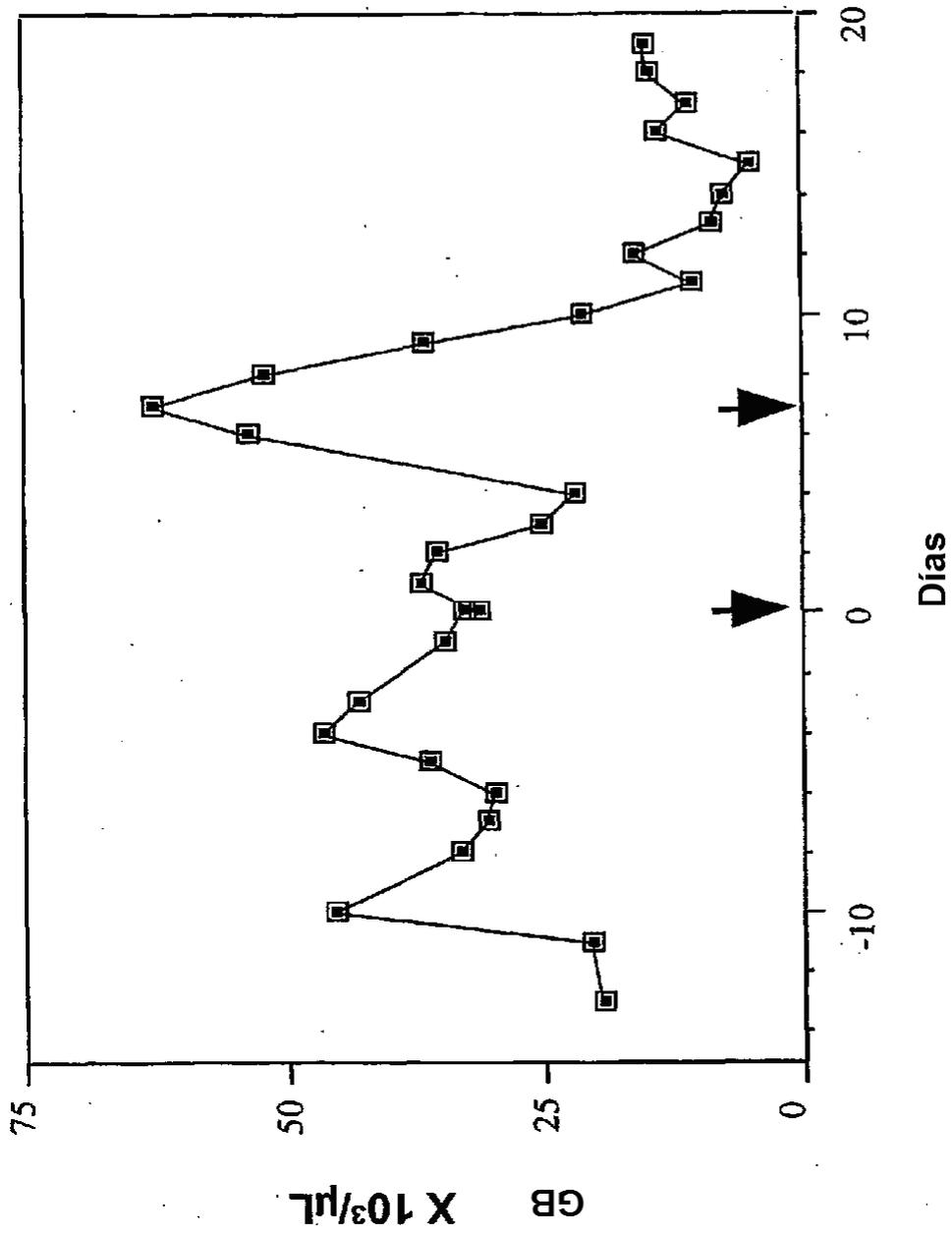


FIG. 9B