

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 950**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/EP2012/074867**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12798723 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2788030**

54 Título: **Usos de inmunoconjugados dirigidos a CD138**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568640 P
05.11.2012 US 201261722367 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2018

73 Titular/es:

BIOTEST AG (50.0%)
Landsteinerstr. 5
63303 Dreieich, DE y
IMMUNOGEN, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHULZ, GREGOR;
OSTERROTH, FRANK;
HAEDER, THOMAS;
BRUECHER, CHRISTOPH;
NIEMANN, GABRIELE;
ENGLING, ANDRE;
UHEREK, CHRISTOPH;
DAELKEN, BENJAMIN;
WARTENBERG-DEMAND, ANDREA;
ZUBER, CHANTAL;
GUTSCHER, MARCUS;
BERNOESTER, KATRIN y
KOENIG, MARTIN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 684 950 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

Usos de inmunoconjugados dirigidos a CD138

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a regímenes de tratamiento, en particular para sujetos humanos, que incluyen la administración de inmunoconjugados que se diseñan para marcar como diana células que expresan CD138 como se define en las reivindicaciones. La presente invención también se dirige a combinaciones anticáncer, a composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas y a sus usos en el tratamiento de cánceres que tienen células diana que expresan CD138 como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

15 CD138, que actúa como un receptor para la matriz extracelular, se sobre-expresa en células de mieloma múltiple (MM) y se ha mostrado que influencia el desarrollo y/o proliferación de células MM. CD138 también se expresa en células de carcinoma de ovarios, cáncer cervical (Numa et al., 2002), cáncer endometrial (Choi et al., 2007), carcinoma renal o de riñón, vesicular biliar, carcinoma de vesícula-células de transición, cáncer gástrico (Wiksten et al. 2008), adenocarcinoma de próstata (Zellweger et al., 2003), carcinoma mamario (Loussouarn et al., 2008) carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Shah et al., 2004), carcinoma pulmonar de células escamosas (Toyoshima et al., 2001), células de carcinoma de colon y células de linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin, carcinoma colorectal (Hashimoto et al, 2008), hepato-carcinoma (Li et al., 2005), leucemia linfocítica crónica (CLL = Chronic Lymphocytic Leukemia), carcinoma pancreático (Conejo et al., 2000), y carcinoma de cabeza y cuello (Anttonen et al., 1999) por nombrar solo unos cuantos.

25 Las publicaciones y otros materiales, incluyendo patentes, usados en el presente documento para ilustrar la invención y en particular, para proporcionar detalles adicionales respecto a la práctica, se incorporan por referencia en el presente documento. Por conveniencia, las publicaciones se hacen referencia en el siguiente texto por autor y fecha y/o se citan alfabéticamente por autor en la bibliografía adjunta.

30 Tassone et al. (2004) informó excelente unión del anticuerpo B-B4 IgG1 murino al antígeno CD138 expresado en la superficie de células MM. Tassone también informó alta actividad citotóxica del inmunoconjugado B-B4-DM1, que comprende el maitansinoide DM1 como una molécula efectora, contra células de mieloma múltiple (véase también la publicación de patente de EE.UU. 20070183971).

35 Ikeda et al. (2008 y 2009) informó resultados prometedores *in vitro* y resultados en modelos de xenoinjerto con el inmunoconjugado BT062, que se basa en B-B4.

40 Mientras que Tassone et al., e Ikeda et al. representan contribuciones para proporcionar un tratamiento eficaz de MM y una composición de materia que puede emplearse en ese tratamiento, queda una cantidad de necesidades por satisfacer en la técnica.

45 Mientras que el uso de inmunoconjugados, en particular aquellos que tienen moléculas efectoras altamente tóxicas que se fijan funcionalmente a un agente dirigido que se une a, por ejemplo antígenos que no sólo se expresan en células diana, tales como células tumorales, sino también en células no diana que realizan funciones vitales en el organismo, se ha mostrado que es eficaz destruyendo las células diana, muchos fallan debido a su toxicidad hacia células no diana. De hecho, muchos inmunoconjugados deben ser interrumpidos durante pruebas clínicas debido a que no se encuentra un equilibrio entre eficacia y toxicidad (ventana terapéutica): a concentraciones en las cuales el inmunoconjugado puede conferir beneficios en términos de combatir enfermedad, su toxicidad se vuelve inaceptable. De esta manera, en especial con moléculas efectoras altamente tóxicas, la pregunta a menudo no es sólo si el agente dirigido del inmunoconjugado de hecho puede llevar al efector al diana y permitir que el efector se libere en el diana, sino también si, en su recorrido a las células diana, el mismo inmunoconjugado destruirá o atacará un número inaceptable de células u órganos que son fundamentales para la supervivencia del organismo.

55 La Publicación de Patente de EE.UU. 20110123554 describe métodos y regímenes de tratamiento que incluyen la administración de inmunoconjugados que hacen diana en CD138 para combatir enfermedades, en particular en cantidades tolerables. Sin embargo, mientras que estos resultados muestran que el inmunoconjugado puede ser eficaz, mientras que es tolerable, hay necesidad por adicionales regímenes de tratamiento mejorados.

60 Permanece en particular una necesidad de proporcionar regímenes de tratamiento adecuados para enfermedades asociadas a la expresión de CD138, incluyendo trastornos plasma-proliferativos asociados a la expresión de CD138, tales como MM. Aún más en particular permanece una necesidad de regímenes de tratamiento que aseguran que las toxicidades hacia células no tumorales, que también expresan CD138, se mantienen a un nivel clínicamente aceptable, ya sea al emplear solo ciertas cantidades tolerables de inmunoconjugado a niveles que compensan las toxicidades con efectividad para combatir enfermedades y/o por combinar el inmunoconjugado con agentes citotóxicos conocidos como efectivos contra el trastorno en cuestión. También hay necesidad de regímenes de

tratamiento que reducen la necesidad de medicamentos que se emplean para aliviar otros síntomas de la enfermedad y para terapia de mantenimiento para mantener la salud de un paciente en un estado libre de enfermedad o de enfermedad limitada después de haberse logrado un cierto grado de control de la enfermedad con el tratamiento previo más reciente.

5 Esta invención cumple, en ciertas realizaciones, una o más de estas necesidades así como otras necesidades en la técnica que serán más evidentes para el experto en la materia una vez dada la siguiente descripción.

Sumario de la invención

10 La invención se dirige a un inmunoc conjugado para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto humano, donde el inmunoc conjugado comprende al menos un anticuerpo dirigido a diana de ingeniería que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, donde dicho anticuerpo dirigido a diana de ingeniería se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado, donde preferentemente al menos parte del anticuerpo dirigido a diana de ingeniería confiere propiedades de isotipo IgG4, donde la molécula efectora es al menos un maitansinoide, donde el anticuerpo dirigido a diana de ingeniería comprende: (i) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 51 a 68 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1 y (ii) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 2, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 50 a 56 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2; donde el inmunoc conjugado ha de administrarse en un régimen de múltiples dosis, donde la dosis de agregado a administrarse dentro de un ciclo de tratamiento activo es una dosis tolerable máxima agregada (AMTD, por sus siglas en inglés de *Aggregate Maximum Tolerable Dose*) o una fracción de AMTD y donde dicha AMTD y/o dicha fracción excede la dosis que resulta en toxicidad limitante de dosis (DLT, por sus siglas en inglés de *Dose Limiting Toxicity*) cuando el inmunoc conjugado se administra como una dosis única, incluyendo como parte de un régimen de dosis única múltiple dentro de dicho ciclo de tratamiento activo y/o excede la dosis tolerable máxima (MTD, por sus siglas en inglés de *Maximum Tolerable Dose*) cuando el inmunoc conjugado se administra como una sola dosis, incluyendo como parte de un régimen de dosis única múltiple dentro de dicho ciclo de tratamiento activo, donde la dosis tolerable máxima agregada es al menos 240 mg/m², preferentemente 300 mg/m², preferentemente 360 mg/m², preferentemente 420 mg/m², donde la dosis que resulta en dicha toxicidad limitante de dosis es 200 mg/m² y/o la dosis tolerable máxima al menos 160 mg/m² o al menos 180 mg/m², donde el inmunoc conjugado ha de administrarse en un ciclo de tratamiento activo de 21 días, al menos tres veces dentro de dichos 21 días, donde el ciclo de tratamiento activo incluye la administración del inmunoc conjugado realizándose al menos una vez a la semana, donde la enfermedad asociada a las células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato-carcinoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de timo, carcinoma de útero, carcinoma urinario o carcinoma de ovario. La invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto humano, donde la composición farmacéutica comprende un inmunoc conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el inmunoc conjugado comprende al menos un anticuerpo dirigido a diana que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, donde dicho anticuerpo dirigido a diana está funcionalmente fijado a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado, donde la molécula efectora es al menos un maitansinoide, donde el anticuerpo dirigido a diana comprende: (i) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 51 a 68 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1 y (ii) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 2, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 50 a 56 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2, donde la composición farmacéutica ha de administrarse en un ciclo de tratamiento activo que ha de seguirse opcionalmente de un periodo de reposo, donde la composición farmacéutica ha de administrarse durante al menos tres semanas sola o en combinación con un agente citotóxico, donde el ciclo de tratamiento activo ha de durar al menos 21 días y la composición farmacéutica ha de administrarse una vez a la semana a una dosis del inmunoc conjugado de aproximadamente 80 mg/m² a aproximadamente 140 mg/m² y donde la enfermedad asociada a las células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato-carcinoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de timo, carcinoma de útero, carcinoma urinario o carcinoma de ovario, preferentemente donde la enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple. La AMTD puede exceder la dosis de dicha DLT en al menos un 20 % y dicha MTD en al menos 30 %. La AMTD puede ser al menos 240 mg/m², preferentemente 300 mg/m², más preferentemente 360 mg/m² o 420 mg/m² y la dosis que resulta en dicha DLT puede ser 180 mg/m² o 200 mg/m². La AMTD puede ser al menos 240 mg/m², preferentemente 300 mg/m², más preferentemente 360 mg/m² o 420 mg/m² y la MTD puede ser al menos 160 mg/m²

o al menos 180 mg/m².

El inmunoc conjugado puede administrarse al menos tres veces dentro de 21 días, preferentemente en dosis iguales.

5 Dicho régimen de múltiples dosis puede durar 3 semanas y puede estar seguido de un periodo de reposo.

Durante este periodo de reposo puede mantenerse supervivencia libre de progreso o enfermedad estable. Un nivel del inmunoc conjugado en un fluido corporal de un sujeto, durante dicho periodo de reposo puede ser al menos o hasta 0,5 µg/ml, 1 µg/ml o 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml o 6 µg/ml.

10 La "ocupación de receptor" de células diana que expresan CD138, en particular células diana aisladas que expresan CD138, preferentemente en células diana aisladas de tumores no sólidos, tales como células de mieloma en aspirados de médula ósea, por ejemplo dentro de 24 horas, preferentemente dentro de dieciocho, doce, ocho o cuatro horas después de completar la administración de un inmunoc conjugado de acuerdo con la presente invención, es, en una realización, más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más del 95 %. La "ocupación de receptor" de células diana que expresan CD138 antes de una administración subsecuente o respectivamente más de 48 horas, más de 72 horas, más de 96 horas (4 días), más de 120 horas (5 días) o más de 144 horas (6 días) después de completar la administración es menor del 70 %, menor del 60 %, menor del 55 %, menor del 50 %, menor del 45 % o menor del 40 %.

20 En una realización, la diferencia en "ocupación de receptor" de células diana que expresan CD138 veinticuatro, dieciocho, doce, ocho o cuatro horas después de completar la administración del inmunoc conjugado y la "ocupación de receptor" de las células diana más de 48 horas, más de 72 horas, más de 96 horas (4 días), más de 120 horas (5 días) o más de 144 horas (6 días) después de completar la administración, es al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 % o al menos un 50 %, preferentemente entre un 10 % y un 50 % o un 20 % y un 40 %.

30 En una realización adicional, la "ocupación de receptor" de células diana que expresan CD138 24 horas, preferentemente dentro de dieciocho, doce, ocho o cuatro horas después de completar la administración del inmunoc conjugado es elevada, esto es más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más del 95 %, aun cuando el inmunoc conjugado se administra a concentraciones relativamente bajas, por ejemplo a concentraciones que constituyen menos del 50 %, menos del 60 %, menos del 70 %, menos del 80 %, pero en general menos del 10 %, menos del 20 % o más del 30 % de DLT determinada del inmunoc conjugado cuando se administra una vez en un ciclo de tratamiento de 21 días. En una realización aun adicional, la "ocupación de receptor" de células diana que expresan CD138 antes de una administración subsecuente o respectivamente más de 48 horas, más de 72 horas, más de 96 horas (4 días), más de 120 horas (5 días) o más de 144 horas (6 días) después de completar la administración es menor que el 70 %, menor que el 60 %, menor que el 55 %, menor que el 50 %, menor que el 45 % o menor que el 40 %, aun cuando el inmunoc conjugado se administra a concentraciones relativamente elevadas, por ejemplo a concentraciones que constituyen más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 % de DLT determinado del inmunoc conjugado cuando se administra una vez en un ciclo de tratamiento de 21 días.

45 La invención también se dirige a administrar una cantidad total de maitansinoide, en particular DM4 a un paciente dentro de 21 días o más de 2 mg/m², más de 3 mg/m², más de 4 mg/m², más de 5 mg/m², más de 6 mg/m², más de 7 mg/m², más de 8 mg/m², más de 9 mg/m² o más de 10 mg/m² preferentemente de acuerdo con uno cualquiera de los métodos a los que se hace referencia en el presente documento.

50 La administración puede realizarse al menos una vez a la semana, preferentemente a dosis iguales durante al menos tres semanas seguidos preferentemente por un periodo de reposo, por ejemplo de una semana. "Periodo de reposo" significa en este contexto un periodo después de un punto en tiempo en el cual de acuerdo con el programa de tratamiento establecido para un paciente, la siguiente dosis deberá, pero no ser administrada. Por ejemplo, en un esquema de administración que involucra administraciones semanales los días 1, 8 y 15, el periodo de reposo define el tiempo después del día 22, cuando no hay administración. En este ejemplo, este periodo de reposo resulta en un intervalo libre de tratamiento de dos semanas. Las tres semanas como mínimo seguidas por el periodo de reposo pueden definir un ciclo de tratamiento de al menos 28 días, y en donde después de dos o más ciclos de tratamiento, puede lograrse al menos enfermedad estable. El inmunoc conjugado puede por ejemplo ser administrado cada tercer día, cada cuarto día, cada quinto día o cada sexto día durante el periodo de tres semanas. Al menos enfermedad estable puede mantenerse durante tres, cuatro, cinco, seis, siete ciclos de tratamiento. Después de alcanzar al menos enfermedad estable, el inmunoc conjugado puede ser administrado como una terapia de mantenimiento menos de tres veces o menos de dos veces dentro de los 21 días, preferentemente una vez en los 21 días, preferentemente como una sola dosis repetida de entre 60 mg/m² y 200 mg/m², incluyendo aproximadamente 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 110 mg/m², aproximadamente 120 mg/m², aproximadamente 130 mg/m², aproximadamente 140 mg/m², 150 mg/m², aproximadamente 160 mg/m², aproximadamente 170 mg/m², aproximadamente 180 mg/m², aproximadamente 190 mg/m² y aproximadamente 200 mg/m². Al menos supervivencia libre de progreso, enfermedad estable y/o una respuesta menor pueden obtenerse por más de 3 meses durante una terapia de mantenimiento.

La administración de dicho inmunocombinado como múltiples dosis repetidas en ciclos de tratamiento que duran al menos 21 días puede dar como resultado, después de la última administración en cada ciclo, en una cantidad eficaz agregada y un primer nivel del inmunocombinado en un fluido corporal del sujeto y donde, cuando una cantidad equivalente a la cantidad eficaz agregada se administra como una sola dosis o dosis sencilla repetida en el ciclo de

5 tratamiento, puede resultar en un segundo nivel del inmunocombinado en un fluido corporal del sujeto, en donde el primer nivel puede ser igual a o inferior al segundo nivel, por ejemplo más del 10 %, más del 20 % o más del 30 % inferior al segundo nivel.

El ciclo de tratamiento puede durar 21 días y/o múltiples dosis repetidas pueden consistir en 3 dosis iguales preferentemente equidistantes, más preferentemente administradas los días 1, 8 y 15. La cantidad eficaz agregada es al menos 240 mg/m², aproximadamente 260 mg/m², aproximadamente 280 mg/m², aproximadamente 300 mg/m², aproximadamente 360 mg/m² o aproximadamente 420 mg/m². El inmunocombinado o composición farmacéutica pueden administrarse durante al menos dos ciclos de tratamiento de 21 días con un periodo de reposo de una semana entre cada ciclo de tratamiento. Puede seguirse una administración, después de al menos dos ciclos de

10 tratamiento de 21 días, cada uno seguido opcionalmente por un periodo de reposo y/o por una adicional administración del inmunocombinado o composición farmacéutica como una terapia de mantenimiento. La terapia de mantenimiento puede comprender administrar el inmunocombinado o una composición farmacéutica que comprende el mismo (i) una vez cada tres a seis semanas o (ii) a múltiples dosis repetidas, en donde cada dosis individual de inmunocombinado es aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 110 mg/m² o aproximadamente 120 mg/m² menor que la dosis individual de una terapia primaria y/o en donde dosis individuales pueden administrarse en intervalos que exceden el intervalo de las dosis individuales, por ejemplo por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días. Cualquier administración de dicho inmunocombinado como un régimen de múltiples dosis puede resultar, 0-2 horas después de completar la administración, en un nivel en plasma promedio de al menos 7 µg/ml, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 µg/ml.

El uso terapéutico de la invención además puede incluir, determinar 0-4 horas, incluyendo aproximadamente 1, 2, 3 o 4 horas, después de completar la administración del inmunocombinado o una composición farmacéutica que comprende el mismo, un nivel de referencia del inmunocombinado o de un parámetro de eficacia en sangre en fluido corporal de un paciente y determinar en una administración subsecuente del inmunocombinado a 0-4 horas después de completar la administración subsecuente, un nivel subsecuente del inmunocombinado o parámetro de eficacia en sangre, en donde cuando el nivel de referencia es superior al nivel subsecuente, la dosis agregada en un ciclo de tratamiento siguiendo a la administración subsecuente puede aumentarse en un 5-100 %, incluyendo un 10-50 % o un 20-30 % y/o cuando el nivel de referencia es menor que el nivel subsecuente, la dosis agregada en un ciclo de

30 tratamiento después de la administración subsecuente puede reducirse en un 5-100 %, incluyendo un 10-50 % o un 20-30 %. El uso terapéutico de la presente invención además pueden comprender adicionalmente determinar, 0-2 horas después de completar la administración de la dosis individual del inmunocombinado o una composición farmacéutica que comprende el mismo, un nivel del inmunocombinado en un fluido corporal, en donde si el nivel es inferior a 7 µg/ml, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 µg/ml, la dosis individual puede aumentarse en el siguiente ciclo de tratamiento en al menos 10 mg/m², 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m² o aproximadamente 100 mg/m². El uso terapéutico de la presente invención además pueden comprender determinar, 0-2 horas después de completar la administración de una dosis individual del

40 inmunocombinado o una composición farmacéutica que comprende el mismo, un nivel del inmunocombinado en un fluido corporal, en donde si el nivel está sobre 50 µg/ml, 60, 70, 80 o 100 µg/ml, la dosis individual puede disminuirse en el siguiente ciclo de tratamiento en al menos 10 mg/m², 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 110 mg/m² o aproximadamente 120 mg/m².

50 En cualquiera de los usos terapéuticos de la presente invención al menos un agente citotóxico, incluyendo dos o tres, puede administrarse al menos una vez a la semana o una vez en un ciclo de tratamiento. Dicho agente citotóxico puede ser lenalidomida y/o dexametasona. El dicho sujeto al cual la combinación de fármaco se administra, puede o no haber estado previamente expuesto a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo dirigido a células que expresan CD138, a lenalidomida y/o a dexametasona. El sujeto puede haber respondido a una exposición a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo dirigido a células que expresan CD138, lenalidomida y/o dexametasona. Células diana que expresan CD138 pueden ser refractarias a exposición de un inmunocombinado que comprende un anticuerpo dirigido a células que expresan CD138, lenalidomida y/o dexametasona. El sujeto puede haber tenido relapso después de la exposición previa. Lenalidomida puede administrarse a una dosis de 5 a 35 mg, preferentemente de aproximadamente 25 mg, o a una dosis menor a 25, 20, 15 o 10 mg, más preferentemente en forma oral una vez al día en un ciclo de tratamiento de por ejemplo 21 o 28 días y/o dexametasona puede administrarse en una dosis de 20 a 50 mg, preferentemente a aproximadamente 40 mg, o a una dosis menor a 40 o 30 mg, por ejemplo oralmente una vez al día en un ciclo de tratamiento de por ejemplo de 21 o 28 días o, por ejemplo en los días 1-4, 9-12, 17-20 dentro de 28 días o por ejemplo los días 1, 8, 15 y 22.

65 El sujeto puede padecer un tumor sólido que comprende células diana que expresan CD138 y dicho tumor sólido

puede ser refractario a terapia de cáncer con hormonas o quimioterapia o el sujeto puede haber tenido relapso después de terapia de hormonas o quimioterapia, en donde dicha administración puede resultar en al menos un retraso de crecimiento de tumor o estasis de tumor. Dicho inmunoconjugado puede administrarse en un régimen de múltiples dosis repetidas con dosis individuales de 20 mg/m² a 160 mg/m². El tumor sólido puede ser negativo en el sector estrógeno y/o negativo en el sector de progesterona y/o negativo Her2/neu, incluyendo triple negativo con todas las tres, por ejemplo de cáncer de mama triple negativo.

Una administración de dicho inmunoconjugado o composición farmacéutica también puede estar precedida por una administración de diferente agente dirigido, por ejemplo, un anticuerpo no conjugado dirigido a células que expresan CD138, en donde dicho inmunoconjugado se administra a 1-6, preferentemente 2-4, horas después de completar la administración del anticuerpo no conjugado. El anticuerpo no conjugado puede administrarse a una dosis correspondiente a un nivel de 10 a 30 µg/ml de inmunoconjugado en un fluido corporal del sujeto, en particular un nivel de plasma del sujeto. Esta dosis administrada puede corresponder a aproximadamente una diferencia entre un nivel teórico y actual del inmunoconjugado en un fluido corporal, 0-2 horas después de completar una administración del inmunoconjugado al sujeto. El agente dirigido puede administrarse a una dosis de 10 a 40 mg/m², preferentemente 20-30 mg/m². Como resultado, el inmunoconjugado puede ser administrado a una dosis individual que es hasta 10 mg/m², hasta 20 mg/m² o hasta 30 mg/m² menor que la dosis administrada sin la administración del anticuerpo no conjugado.

Las características para los métodos de tratamiento de la invención descritos en el presente documento también aplican en el contexto de un uso médico, por ejemplo como a continuación:

a) Uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto, en particular un sujeto humano, que lo requiere (o un inmunoconjugado para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto, en particular un sujeto humano, que lo requiere), comprendiendo el inmunoconjugado: al menos un anticuerpo dirigido de ingeniería que hace diana en células que expresan CD138, y al menos una molécula efectora, en donde el anticuerpo dirigido de ingeniería se enlaza funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde preferentemente al menos una parte del anticuerpo dirigido de ingeniería confiere propiedades de isotipo IgG4, en donde el inmunoconjugado se va administrar en un régimen de múltiples dosis que comprenden al menos dos dosis, en donde la dosis de agregado a administrar dentro de un ciclo de tratamiento activo es una dosis tolerada máxima agregada (AMTD) o una fracción de la AMTD y en donde la AMTD y/o la fracción excede la dosis que resulta en toxicidad limitante de dosis (DLT) en donde el inmunoconjugado se administra como una sola dosis, incluyendo como parte de un régimen de dosis sencillas múltiples y/o excede la dosis tolerable máxima (MTD) cuando el inmunoconjugado se administra como una sola dosis, incluyendo como parte de un régimen de dosis sencillas múltiples dentro del ciclo de tratamiento activo;

b) Uso de una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un paciente que lo requiere (o una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para utilizar en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un paciente que lo requiere), el inmunoconjugado comprende al menos un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y al menos una molécula efectora, en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado,

en donde la composición farmacéutica ha de administrarse en un ciclo de tratamiento activo que opcionalmente se sigue de un periodo de reposo, y en donde la dosis del inmunoconjugado a administrar al menos una vez a la semana es de aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 110 mg/m², aproximadamente 120 mg/m², aproximadamente 130 mg/m², aproximadamente 140 mg/m², aproximadamente 150 mg/m² o aproximadamente 160 mg/m², aproximadamente 170 mg/m², aproximadamente 180 mg/m², aproximadamente 190 mg/m², aproximadamente 200 mg/m², aproximadamente 210 mg/m², aproximadamente 220 mg/m², aproximadamente 230 mg/m², aproximadamente 240 mg/m², aproximadamente 250 mg/m², aproximadamente 260 mg/m², aproximadamente 270 mg/m² o aproximadamente 280 mg/m² y la composición farmacéutica se va administrar por al menos tres semanas sola o en combinación con un agente citotóxico.

La invención también se dirige a un kit que comprende un anticuerpo contra el inmunoconjugado y, en un recipiente separado, instrucciones de cómo determinar, un nivel de dicho inmunoconjugado en un fluido corporal que se obtiene del sujeto por adición del anticuerpo al fluido corporal. El kit puede comprender además un inmunoconjugado que comprende al menos un anticuerpo dirigido de ingeniería que hace diana en células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, en donde el anticuerpo dirigido de ingeniería se enlaza funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado.

El anticuerpo de ingeniería dirigida puede comprender una región de unión a antígeno (ABR) contra CD138, y una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano y confiere las propiedades de isotipo IgG4.

5 La enfermedad puede ser mieloma múltiple, en particular mieloma múltiple de relapso o refractario. El mieloma múltiple refractario incluye "mieloma refractario primario" y "mieloma de relapso y refractario".

10 Dicha enfermedad que expresa CD138 en células diana también puede seleccionarse del grupo que consiste en carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato-carcinoma, carcinoma colorectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar en particular carcinoma pulmonar de células escamosas, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de timo, de útero, urinario o de ovarios.

15 En realizaciones preferidas, el inmunoconjugado marca como diana homogéneamente células diana que expresan CD138.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo dirigido de ingeniería de la presente invención puede

20 (i) consistir esencialmente en región de unión a antígeno (ABR) contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
(ii) comprende una región de unión a antígeno (ABR) contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano, y

25 una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano.

La ABR puede comprender:

30 (a) región variable de cadena pesada CDR3 que comprende restos de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1, y
(b) región variable de cadena ligera CDR3 que comprende restos aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2, respectivamente.

La ABR además puede comprender:

35 (a) región variable de cadena pesada CDR1 y CDR2 que comprende restos aminoácidos 31 a 35 y 51 a 68 de SEQ ID NO: 1, y/o
(b) región variable de cadena ligera CDR1 y CDR2 que comprende restos aminoácidos 24 a 34 y 50 a 56 de SEQ ID NO: 2, respectivamente.

La región de aminoácidos adicional puede comprender:

40 (a) restos aminoácidos 123 a 448 de SEQ ID NO: 1, y/o
(b) restos aminoácidos 108 a 214 de SEQ ID NO: 2, respectivamente y mutaciones de la misma que
45 (i) mantienen o reducen la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad dependientemente de complemento del anticuerpo dirigido de ingeniería y/o
(ii) estabilizan el anticuerpo dirigido de ingeniería.

50 El anticuerpo puede comprender una cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente un 80 %, un 85 % o un 90 %, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y una cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente un 80 %, un 85 % o un 90 %, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y comprende las regiones de unión a antígeno anteriormente especificadas.

55 La molécula efectora puede fijarse al anticuerpo dirigido de ingeniería por un enlazador. El enlazador puede comprender un enlace disulfuro. La molécula efectora (por ejemplo, DM4) puede proporcionar impedimento estérico entre el anticuerpo dirigido y la molécula efectora. La molécula efectora es un maitansinoide (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4).

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

El inmunoconjugado puede, en ciertas realizaciones de los métodos desvelados en el presente documento, comprender:

65 un agente dirigido que hace diana en CD138, que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma, en donde la cadena pesada de inmunoglobulina o su parte tiene al menos 70 %

identidad de secuencia con SEQ ID NO:1. Una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina de la parte puede ser una región constante isotipo IgG4.

5 El agente dirigido del inmunoconjugado puede comprender una secuencia de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 70 % identidad de secuencia con SEQ ID NO:2. El agente dirigido del inmunoconjugado también puede comprender una secuencia de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 70 % identidad de secuencia con SEQ ID NO:1.

10 La presente invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados aquí especificados para la inhibición, retardo y/o prevención del crecimiento de tumores y/o diseminación de células de tumor, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica puede incluir agentes citotóxicos como se especifica aquí.

15 La presente invención también se dirige a un kit que comprende, en recipientes separados, la composición farmacéutica en una o más formas de dosis y en un recipiente separado, instrucciones de cómo administrar la una o más formas de dosis a un sujeto, en particular a un sujeto humano que lo requiere, por ejemplo como una dosis sencilla repetida u otro régimen de tratamiento analizado en el presente documento.

20 En particular, en ciertas realizaciones, la presente invención también proporciona el inmunoconjugado descrito en el presente documento para utilizar en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado se va a administrar en los programas y/o a las dosificaciones descritas en el presente documento. El inmunoconjugado para utilizar de esta manera puede ser comprendido en una composición farmacéutica. El inmunoconjugado o composición farmacéutica también puede estar comprendido en un kit, en
25 donde el kit además comprende el agente citotóxico y/o el anticuerpo inmunoconjugado que hace diana en CD138, también descrito en el presente documento, en recipientes separados. El inmunoconjugado/composición farmacéutica y el agente citotóxico y/o el anticuerpo no conjugado se van a administrar en forma simultánea, separada o secuencial como se describe aquí. De manera similar, el inmunoconjugado y/o composición farmacéutica, el agente citotóxico y/o el anticuerpo no conjugado que hace diana en CD138 pueden estar en la
30 forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la forma descrita en el presente documento.

En un aspecto de la invención la administración de cualquiera de los inmunoconjugados aquí descritos es para un sujeto o células de este sujeto, en particular un sujeto humano, que se beneficia de dicha administración. El
35 inmunoconjugado también puede emplearse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de este trastorno.

Uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- 40
- (i) al menos un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y
 - (ii) al menos una molécula efectora, opcionalmente en combinación con uno o más agentes citotóxicos

45 en donde el agente dirigido se enlaza funcionalmente con la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el sujeto no responde (enfermedad refractaria), o responde en forma deficiente o tiene relapso, al tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores de proteasoma, y en donde el inmunoconjugado se va a administrar al sujeto, preferentemente de forma intravenosa.

Una preparación combinada de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos, para su
50 uso simultáneo, separado o secuencial para tratar una enfermedad en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- 55
- (i) al menos un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y
 - (ii) al menos una molécula efectora,

60 en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el sujeto no responde a, responde en forma deficiente a o tiene relapso de, tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores de proteasoma, y en donde el inmunoconjugado se va a administrar al sujeto, preferentemente en forma intravenosa en un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 140 mg/m² del inmunoconjugado cuando se administra sólo.

Uso de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos para la fabricación de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar una enfermedad en un sujeto
65 asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- (i) al menos un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y

(ii) al menos una molécula efectora en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoc conjugado,

en donde el sujeto no responde a, o responde deficientemente a o tiene relapso de, tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores de proteasoma, y en donde el inmunoc conjugado se va a administrar al sujeto, preferentemente en forma intravenosa en un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 840 mg/m² del inmunoc conjugado cuando se administra sólo.

La invención también se dirige a una combinación anticáncer que comprende

al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoc conjugado que comprende un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y al menos una molécula efectora, en donde el agente dirigido se enlaza funcionalmente con la molécula efectora para formar el inmunoc conjugado, en donde

(a) la combinación tiene una relación de sinergia mayor que 1, mayor que 1,1, mayor que 1,2, mayor que 1,3, mayor que 1,4, o

(b) la combinación tiene una relación de sinergia de aproximadamente 1 y la molécula efectora y el agente citotóxico tienen modos de acción superpuestos,

y en donde dicha combinación de anticáncer es una composición farmacéutica o un kit que comprende el agente citotóxico como mínimo y el inmunoc conjugado de recipientes separados.

El agente citotóxico puede ser un inhibidor de proteasoma, un agente inmunomodulador o anti-angiogénico, un agente de alquilación de ADN, una histona deacetilasa o una mezcla de dos más de los mismos.

El agente citotóxico puede ser bortezomib o carfilzomib, talidomida, lenalidomida o pomalidomida, melfalan o una mezcla de dos o más de los mismos.

La molécula efectora y el agente citotóxico de la combinación anticáncer pueden tener modos de acción superpuestos y en donde estos modos de acción involucran preferentemente inhibición de microtúbulos o inducción de freno de ciclo celular (melfalan, bortezomib y lenalidomida o talidomida son agentes citotóxicos que inducen freno de ciclo celular). En forma alterna, puede haber modos de acción no superpuestos.

Si la combinación anticáncer es parte de la composición farmacéutica, la composición farmacéutica puede comprender al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La combinación anticáncer también puede ser parte de un kit donde al menos un agente citotóxico y el al menos un inmunoc conjugado se almacenan en recipientes separados.

Una preparación combinada de al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoc conjugado, para su uso simultáneo, separado o secuencial para tratar en un sujeto una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoc conjugado comprende:

(i) un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y
(ii) al menos una molécula efectora,

en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la al menos una molécula efectora para formar el inmunoc conjugado y en donde el sujeto tiene un fenotipo refractario, en relapso después de tratamiento o que no se ha sometido a tratamiento antes.

El uso de al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoc conjugado para la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial para tratar un sujeto con una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoc conjugado comprende:

(i) un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138 y
(ii) al menos una molécula efectora

en donde el agente dirigido se enlaza funcionalmente a la molécula efectora como mínimo para formar el inmunoc conjugado, y en donde el sujeto tiene un fenotipo refractario, en relapso después de tratamiento o que no se ha sometido a tratamiento antes.

En una realización preferida, la combinación del al menos un agente citotóxico y el al menos un inmunoc conjugado tiene una relación o proporción de sinergia mayor que 1, mayor que 1,1, mayor que 1,2, mayor que 1,3 o mayor que 1,4. Alternativamente, la combinación del al menos un agente citotóxico y el al menos un inmunoc conjugado tiene una relación o proporción de sinergia de aproximadamente 1 y la molécula efectora y el agente citotóxico tiene modos de

acción superpuestos.

5 En una realización preferida, la combinación de al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoconjugado tiene efectividad más alta en comparación con cada uno de los agentes solos. Una efectividad más alta se define por cambios en parámetros de efectividad en sangre, por ejemplo niveles de proteína M, cadena ligera kappa Libre y otros parámetros relevantes, que cambian de manera positiva respecto a cada agente sencillo. En particular, la efectividad más alta puede definirse por ejemplo por % de declive en nivel de Proteína M, la extensión de declive en nivel de Proteína M, o la duración de la disminución en Proteína M.

10 Un inmunoconjugado para tratar una enfermedad no proliferativa de plasma en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- (i) al menos un agente dirigido a diana en células que expresan CD138 y
- (ii) al menos un molécula efectora,

15 en donde el agente dirigido se enlaza funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, y en donde en el sujeto, CD138 se expresa en las células diana a niveles comparables (equivalentes) a o inferiores a los niveles en los cuales CD138 se expresa en las células no diana.

20 Uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad no proliferativa de plasma en un sujeto asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- (i) al menos un agente dirigido que hace diana en células que expresan CD138, y
- (ii) al menos una molécula efectora,

25 en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, y en donde en el sujeto se expresa CD138 en las células diana a niveles comparables (equivalentes) a o inferiores a los niveles en los cuales CD138 se expresa en células no diana.

30 La invención también se dirige a un método para tratar una enfermedad no proliferativa de plasma asociada a células diana que expresan CD138, que comprende: administrar a un sujeto que lo requiere, o a células de la enfermedad no proliferativa de plasma, una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende

35 al menos un agente dirigido a células que expresan CD138, y al menos una molécula efectora, en donde dicho agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el inmunoconjugado induce al menos estasis de tumor, preferentemente remisión de un tumor sólido.

40 Ésta remisión puede ser una remisión seguida por intervalo de tiempo que está libre de nuevo crecimiento del tumor (remisión completa). Este intervalo de tiempo puede ser mayor que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, medio año o 1 año o más.

45 El tumor sólido puede ser un carcinoma pancreático o un carcinoma mamario.

La enfermedad puede ser carcinoma de células renales, cáncer endometrial, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato carcinoma, carcinoma colorectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar en particular carcinoma pulmonar de células escamosas, linfoma no Hodgkin, carcinoma de timo, de útero, urinario u ovarios, tanto en forma de tumores primarios como tumores metastásicos derivados de tumores primarios.

50 El tumor sólido puede ser un carcinoma mamario, que es negativo receptor de estrógeno y/o negativo receptor de progesterona y/o negativo de Her2/neu. Un tumor sólido de acuerdo con la presente invención también puede ser un carcinoma mamario, que no responde o responde deficientemente a la terapia de taxano o es refractario a hormona.

55 La ocupación de receptor en células diana, tales como células de médula ósea, puede ser más de 70 %, más de 80 %, más de 90 % o más de 75 %, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas después de completar una administración del inmunoconjugado.

60 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** proporciona una representación esquemática de nBT062 que tiene moléculas efectoras enlazadas.

La **Figura 2** es una representación química de BT062.

65 La **Figura 3** muestra la conversión de ansamitocina P-3 a maitansinol (se omite la estereoquímica por simplicidad).

La **Figura 4** muestra un esquema de síntesis representativa de DM4.

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

La **Figura 6** muestra un análisis de la unión del anticuerpo nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 y nBT062 a células OPM-2. Diferentes concentraciones de nBT062 y conjugados se suministraron a las células y se midió fluorescencia promedio por análisis FACS.

Las **Figura 7(A)-(D)** representan la citotoxicidad *in vitro* de conjugados nBT062-DMx hacia células MOLP-8 (CD138⁺) y BJBAB (CD138⁻). Las células se cultivaron en placas de fondo plano y se incubaron con las concentraciones indicadas de inmunconjugados durante 5 días. Se añadió reactivo WST durante 3 horas más para estimar la viabilidad celular. En (D) la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 se analizó en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante (1 μ M nBT062).

La **Figura 8** muestra la remisión completa de un carcinoma de xenoinjerto de páncreas en ratones tratados con BT062 contra un control. Se mantiene remisión completa: en el periodo de observación libre de tratamiento, no se observó recrecimiento de tumor.

La **Figura 9** muestra la remisión completa de un carcinoma de xenoinjerto mamario en ratones tratados con BT062 contra un control. Se mantiene remisión completa, ya que en periodo de observación libre de tratamiento, no se observó recrecimiento de tumor.

La **Figura 10** muestra la remisión completa de un carcinoma de xenoinjerto mamario en ratones tratados con 2 mg/kg o 4 mg/kg BT062 (una vez a la semana) contra un control o Taxano. A 1 mg/kg de BT-062 una vez a la semana, se logró estasis del tumor. Esto se define como la dosis eficaz mínima.

La **Figura 11** muestra la remisión completa de un adenocarcinoma de xenoinjerto pulmonar primario en ratones tratados con 4 mg/kg y 23,85 mg/kg de BT062 (una vez a la semana) contra un control de vehículo.

La **Figura 12** muestra la remisión completa de un carcinoma (muestra metastásica) de xenoinjerto de vejiga (células de transición) en ratones tratados con 4 mg/kg y 23,85 mg/kg de BT062 (una vez a la semana) contra un control de vehículo.

La **Figura 13** ilustra la rápida eliminación en plasma para dosis en el intervalo de 40 mg/m² a 120 mg/m², mientras que dosis superiores como se ilustra aquí por una dosis de 160 mg/m², mostraron una eliminación de plasma más cercana al valor esperado.

La **Figura 14** muestra los valores cmax medidos de BT062 en comparación con los valores Cmax teóricos.

Las **Figuras 15 y 16** muestran que los valores Cmax en general son similares sobre varios ciclos de tratamiento en un régimen de dosis sencilla repetida como se indica.

La **Figura 17** aclara que la rápida eliminación de plasma no puede ser atribuida a un efecto tampón provocado por CD138 soluble.

La **Figura 18** ilustra la supervivencia libre de progreso para sujetos humanos tratados con diferentes dosis de BT062 administrado en el curso de los ciclos de tratamiento indicados, en donde cada ciclo de tratamiento activo duro 21 días y la dosis respectiva se administró los días 1, 8 y 15 de cada ciclo. Cada ciclo de 21 días fue seguido por un periodo de reposo de 7 días (28 indica 21+7 días, por "ciclo").

Como puede verse, 14 pacientes estuvieron en el tratamiento del estudio por más de 3 meses. Para dos de estos pacientes se ha informado supervivencia libre de progreso de al menos 300 días (aproximadamente 10 meses).

La **Figura 19** muestra en (A) el curso de valores Cmax con diferentes dosis administradas semanalmente durante tres semanas seguido de un periodo de reposo de una semana de duración y en (B) los valores Cmax, 0-2 horas después de completar la administración para diferentes dosis. Los valores Cmax teóricos también se ilustran.

La **Figura 20** muestra el nivel de Proteína M en suero medido para un paciente que recibe 50 mg/m² semanalmente durante tres semanas, seguido de un periodo de reposo de 7 días. Los días -111 a 169 se ilustran. Las flechas indican tratamiento con BT062.

La **Figura 21** muestra el nivel de lambda-kappa FLC (fuerte aumento antes del primer tratamiento, fuerte disminución de los días 1 a 57) medido para un paciente (mieloma múltiple oligo-secretorio) que recibe 65 mg/m² semanalmente por tres semanas, seguido de un periodo de reposo de 7 días. Los días -83 a 163 se ilustran.

La **Figura 22** muestra el nivel de lambda-kappa FLC (fuerte aumento antes del primer tratamiento, estabilización por dos ciclos) medido por un paciente (mieloma múltiple oligo-secretorio) que recibe 80 mg/m² semanalmente por tres semanas, seguido por un periodo de reposo de 7 días. Los días -111 a 85 se muestran.

La **Figura 23** muestra el nivel de lambda-kappa FLC (disminución por tres meses) medido por un paciente (mieloma múltiple oligo-secretorio) que recibe 100 mg/m² semanalmente por tres semanas, seguido por un periodo de reposo de 7 días. Los días -83 a 141 se muestran.

La **Figura 24** muestra el nivel de proteína M en orina medido para un paciente que recibe 3x 120 mg/m² semanalmente durante tres semanas, seguido de un periodo de reposo de 7 días. Los días -27 a 337 se ilustran.

La **Figura 25** muestra el nivel de una proteína M en suero medido para un paciente que recibe 3x 160 mg/m² semanalmente por tres semanas, seguido por un periodo de reposo de 7 días. Los días -20 a 57 se ilustran, que indican una respuesta menor.

La **Figura 26** muestra el nivel de kappa FLC medido para un paciente que recibe 160 mg/m² a intervalo de tres semanas. Los días -21 a 101 se ilustran.

La **Figura 27** muestra una comparación de niveles en plasma de BT062 administrado como una dosis sencilla repetida de 160 mg/m² en comparación con múltiples dosis de 100 mg/m² y 120 mg/m² que se administra tres veces en un ciclo de tratamiento activo de igual duración (21 días).

La **Figura 28** muestra niveles de proteína M en suero durante una administración prolongada de BT062 como dosis sencillas repetidas de BT062 de 160 mg/m², que lleva a respuesta menor con efectos secundarios manejables.

La **Figura 29** muestra niveles de proteína M en suero y valores Cmax sobre el tiempo en una administración de dosis sencilla repetida para un paciente tratado con una dosis sencilla repetida de BT062 de 160 mg/m² (véase también la Figura 28).

La **Figura 30** muestra los efectos de la terapia de combinación en volumen de tumor medio (TV = Tumor Volume) en un modelo de ratón de xenoinjerto/(modelo de xenoinjerto MOLP-8 MM). El resultado muestra los efectos de la combinación de BT062 y lenalidomida.

La **Figura 31** muestra el efecto de la terapia de combinación en volumen de tumor medio (TV) en un modelo de ratón de xenoinjerto. El resultado muestra los efectos de la combinación de BT062 y VELCADE.

La **Figura 32** muestra el efecto de lenalidomida en diferentes células que expresan CD138 *in vitro*, en particular células MOLP-A (A), células RPMI8226 (B), NCI-H929 células (C) y células U266 (D). En forma notable, la expresión de CD138 no fue afectada *in vivo* (modelo de xenoinjerto L363 MM) por el tratamiento de la combinación de lenalidomida y dexametasona (datos no mostrados).

La **Figura 33** muestra los resultados de un estudio de combinación de fármacos *in vivo* (modelo de xenoinjerto L363 MM) en donde BT062 (2 mg/kg, 4 mg/kg) se administra en forma intravenosa los días 1, 8, 15, 22 y 29; lenalidomida se administra oralmente los días 0-4, 7-11, 14-18, 21-25,28-32 y dexametasona se administra subcutáneamente los días 0, 7, 14, 21 y 28. Una reducción considerable en volumen de tumor respecto a la combinación simple de lenalidomida y dexametasona en particular puede verse en el contexto de BT062 del esquema de dosis de 4 mg/kg. Los resultados se ilustran en términos del efecto en el volumen de tumor relativo mediano en el modelo respecto a una administración intravenosa de un control vehicular. El volumen de tumor relativo mediano el día X fue, aquí y en posteriores figuras calculado como sigue: los volúmenes relativos de tumores individuales (RTV Individuales) para el Día X se calculan al dividir el volumen de tumor individual el Día X (Tx) por el volumen individual del mismo tumor el Día 0 (T0) multiplicado por 100 %. Grupos de volúmenes de tumor se expresan como el RTV mediano o promedio (geométrico) de todos los tumores en un grupo (RTV mediano/promedio en grupo).

La **Figura 34** muestra el nivel de proteína M en suero medido para un paciente programado para recibir 80 mg/m² de BT062 semanalmente por tres semanas, seguido por un periodo de reposo de 7 días. BT062 se administra en combinación con Lenalidomida y Dexametasona. Los días -13 a 106 se muestran, que indican una respuesta menor.

La **Figura 35** muestra los resultados de un estudio *in vivo* (modelo de cáncer de mama derivado de humano en ratones desnudos NMRI) en donde BT062 (0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 y taxol (10 mg/kg) se administra intravenosamente los días 1, 8, 15 y 22. BT062 mostró a superiores concentraciones, resultados superiores. Los resultados se muestran en términos del efecto del volumen de tumor relativo promedio en el modelo respecto a una administración intravenosa de PBS. Para el cálculo del volumen de tumor relativo mediano en día, ver la Figura 33.

La **Figura 36** muestra los resultados de un estudio *in vivo* (modelo de cáncer de mama derivado de humano con calificación CD138 1HC 2-3 en ratones desnudos NMRI) en donde BT062 (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 y Docetaxel (10 mg/kg) se administraron intravenosamente los días 0, 7 y 14. BT062 mostró a superiores concentraciones, resultados superiores. Docetaxel fue tan efectivo como la más alta concentración de BT062. Los resultados se muestran en términos del efecto de volumen de tumor relativo promedio en el modelo respecto a una administración intravenosa de PBS. Para el cálculo del volumen de tumor relativo mediano del día, ver Figura 33.

La **Figura 37** muestra los resultados de un estudio *in vivo* (modelo de cáncer de mama derivado de humano con calificación CD138 1HC 1-2 en ratones desnudos NMRI) en donde BT062 (1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 y Docetaxel (10 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7 y 14. No se observó diferencia en los regímenes de tratamiento. Los resultados se ilustran en términos del efecto del volumen de tumor relativo promedio en el modelo respecto a una administración intravenosa de PBS. Para el cálculo del volumen de tumor relativo mediano el día, ver Figura 33.

La **Figura 38** muestra los resultados de un estudio *in vivo* (modelo de cáncer de próstata derivado de humano en ratones desnudos NMRI) en donde BT062 (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 y Docetaxel (10 mg/kg) se administra intravenosamente los días 0, 7 y 14. BT062 mostró a superiores concentraciones, resultados superiores. Los resultados se ilustran en términos del efecto en el volumen de tumor relativo promedio.

Docetaxel fue tan eficaz como la concentración más alta de BT062 y permitió mantenimiento del bajo volumen de tumor con el tiempo.

Descripción detallada de diversas y realizaciones preferidas de la invención

La presente invención se refiere a la administración de sujetos, en particular sujetos humanos (pacientes), que lo requieren, de inmunoconjugado que comprenden agentes dirigidos a CD138 aquí descritos y el suministro de la o las moléculas efectoras de los inmunoconjugados en sitios diana y la liberación de una o varias moléculas efectoras sobre o en el sitio diana, en particular células, tejidos y/u órganos diana. Más particularmente, la presente invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden estos agentes dirigidos a CD138 y moléculas efectoras potenciales que se enlazan a los agentes dirigidos. Las moléculas efectoras pueden ser activadas por ruptura y/o disociación de la porción de agente dirigido del inmunoconjugado sobre o en sitio objetivo. Los inmunoconjugados pueden administrarse solos o como parte de una combinación anticáncer que incluye un agente citotóxico tal como pero no

limitado a, un inhibidor de proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib), agente anti-angiogénico/agente inmunomodulatorio (por ejemplo, talidomida o lenalidomida o pomalidomida), agente alquilante de ADN (por ejemplo, melfalan) o corticosteroide (por ejemplo, dexametasona), en donde la combinación anticáncer tiene efectos sinérgicos o efectos aditivos inesperados en el tratamiento de cáncer sobre el inmunocombinado empleado solo en monoterapia, el agente citotóxico empleado solo en monoterapia o ambos.

Los inmunocombinados de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un sujeto que requiere tratamiento o a células aisladas de este sujeto que requiere tratamiento. La o las moléculas efectoras pueden liberarse o desprenderse del inmunocombinado por disociación/ruptura en o dentro de una célula o tejido y/u órgano diana.

En un ejemplo, el inmunocombinado BT062, que hace diana en células que expresan CD138 por el anticuerpo nBT062 y comprende DM4 como una molécula efectora, se administró a un paciente con mieloma múltiple de relapso/refractario 14 veces en una cantidad de 40 mg/m² como en un régimen de múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento activo fue 21 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y periodo de reposo de una semana se insertó antes que se iniciara el siguiente ciclo de tratamiento activo. Dicho en forma diferente, el ciclo de tratamiento fue de 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22, resultando, en este ejemplo, en un periodo libre de tratamiento de aproximadamente dos semanas. En este ejemplo, el inmunocombinado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que pudo mejor concentrarse dentro y/o en la célula de tumor. Mediciones de la concentración en plasma de BT062 mostraron que en una fase de medición inicial (hasta 2 horas después del fin de administración) valores C_{max} para BT062 fueron significativamente inferiores al valor calculado teórico mientras que no se observaron toxicidades limitantes de dosis (DLT) sugiriendo que BT062 se concentra en el diana de tumor más que agregarse en forma aleatoria a las CD138 diana y no diana. Un "efecto tampón" que resulta de sCD138 (CD138 soluble) puede ser excluido (compárese la Figura 17). Como se discutirá a continuación en el contexto de la administración a 80 mg/m², puede confirmarse una rápida concentración en las células diana.

Un ciclo de tratamiento activo es un ciclo de tratamiento que se define por una administración regular del agente activo, aquí en general el inmunocombinado, y excluye cualesquiera periodos de reposo. Un ciclo de tratamiento activo incluye típicamente tres semanas de tratamiento activo y se considera que no termina con la última dosis administrada sino en un tiempo cuando termina una administración adicional. De esta manera, un ciclo de tratamiento activo incluyendo una dosis de 120 mg/m² el día 1, 65 mg/m² en ambos días 8 y 15, se considerará que termina el día 21 y que es de 21 días de duración. Mientras que un ciclo de tratamiento activo en general dura 21 días, puede estar en el intervalo de al menos 2 semanas (14 días) a cuatro semanas (28 días). En este último caso, un ciclo de tratamiento activo y un ciclo de tratamiento "completo" o "íntegro" son lo mismo. Dentro del periodo de un ciclo de tratamiento activo, el agente activo, se administra regularmente. Esto incluye, por ejemplo en intervalos alternos de 2 a 3 días, en intervalos de 4 días, en intervalos progresivamente crecientes tales como el día 1, 3, 6, 10, 15. Un ciclo de tratamiento además del tratamiento activo comprende un periodo de reposo. Por ejemplo, en el ejemplo anterior, el esquema de administración anterior en un ciclo de tratamiento de 28 días se considerará que no comprende administración el día 22. Éste ciclo de tratamiento, incluyendo un periodo de reposo, también se refiere aquí como ciclo de tratamiento "íntegro" o "completo". Un periodo libre de tratamiento describe el tiempo durante el cual no se proporciona el tratamiento. De esta manera, en el ejemplo anterior, el periodo libre de tratamiento empezará el día 16. Al inicio del periodo de reposo, no se administra inmunocombinado al paciente. En una realización preferida, no se administra tratamiento de ninguna clase durante este periodo. El periodo de reposo puede durar por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días o más típicamente es de una semana. Un periodo libre de tratamiento puede durar 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 días o más.

En otro ejemplo, el inmunocombinado BT062 se administra a un paciente con mieloma múltiple de relapso/refractario 18 veces en una cantidad de 50 mg/m² cada una como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 21 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y un periodo de reposo de una semana se inserta antes que empiece el siguiente ciclo de tratamiento. Dicho de manera diferente, el ciclo de tratamiento fue de 28 días con tres dosis/ciclo que se administran los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22. En este ejemplo, el inmunocombinado se administra intravenosamente al paciente de manera tal que pudo ser mejor concentrado dentro y/o en las células de tumor. No se proporcionan medios adicionales para liberar la molécula efectora del inmunocombinado. Seis ciclos de tratamiento todos se toleraron y al menos pudo lograrse enfermedad estable durante seis ciclos, con una disminución de proteína M en suero casi del 25 % después del tercero y quinto ciclos de tratamiento (Figura 20).

Todavía en otro ejemplo, el inmunocombinado BT062 se administró a un paciente con mieloma múltiple de relapso/refractario 19 veces en una cantidad de 65 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22. El periodo libre de tratamiento fue de esta manera 14 días antes que empezara el siguiente ciclo de tratamiento. A esta concentración, niveles en plasma todavía estuvieron por debajo de C_{max} teórico (porcentaje promedio de C_{max} teórico = 60 %; Tabla 11a), pero no al grado observado con menores dosis, por ejemplo 40 mg/m² o 50 mg/m² (porcentaje promedio de C_{max} teórico = 33 % Tabla 11a). Sin embargo, una fuerte disminución del nivel de FLC en suero pudo observarse después de un solo ciclo de tratamiento y pudo mantenerse

por dos meses (Figura 21). Además, el superior porcentaje de Cmax teórico alcanzó a nivel de dosis de 65 mg/m², la concentración total en plasma sin Cmax teórico (aquí promedio total 17.7 mg/m², Tabla 11b) fue similar a aquellas observadas a menores concentraciones de 40 mg/m² o 50 mg/m² (promedio total 18.6 mg/m² y 23.0 mg/m², Tabla 11b). De esta manera, las concentraciones totales en plasma faltantes de Cmax teórica pueden ser diferentes concentraciones, a pesar de un aumento del porcentaje promedio de Cmax teórico en más de 10 % más de 20 % o más de 25 %, preferentemente entre 15 y 25 %, permanecieron dentro del intervalo de 15-25 mg/m², es decir alrededor de 20 mg/m². Para 14 pacientes (de 32 en el estudio) supervivencia libre de progreso de al menos 3 meses se ha informado (Figura 18), para cuatro de estos pacientes supervivencia libre de progreso de al menos 168 días se ha informado. Uno de estos cuatro pacientes mostró reducción clara de proteína M en suero después de 9 tratamientos (Paciente Número 6, por favor ver también la Figura 20) y para otro paciente en una fuerte disminución en FLC pudo observarse dentro de los primeros 2 meses (Paciente Número 19, ver también la Figura 24). La primera DLT se observa en la cohorte de 140 mg/m² (Paciente Número 23), pero no se informó DLT para los seis otros pacientes en este nivel de dosis. Para dos de los cuatro pacientes (Pacientes Números 30 y 32) que se trataron con dosis semanales de 160 mg/m² de DLT se observó y señaló una reducción de la dosis a 140 mg/m² en ciclos posteriores.

Todavía en otro ejemplo, el inmunoc conjugado BT062 se administra un paciente con mieloma múltiple refractario/ sin relapso secretorio (Paciente Número 12 en la Figura 18) por 15 ciclos en una cantidad de 80 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue de 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22. En este ejemplo, el inmunoc conjugado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que pudiera mejor concentrarse en y/o en las células de tumor. En esta concentración, los niveles de plasma todavía están por debajo de Cmax teórica, pero no al grado observado con menores dosis, por ejemplo 40 mg/m² (porcentaje promedio del Cmax-33 % teórico; Tabla 11a). Después de tres administraciones a 80 mg/m², que totalizan una administración de 240 mg/m² (dosis agregada) dentro de tres semanas, el inmunoc conjugado permaneció bien tolerado. Una rápida concentración en el diana de tumor pudo confirmarse a esta dosis. La Tabla 12 muestra los resultados de mediciones de ocupación de receptor (RO = Receptor Occupancy). Aquí, el enlace de BT062 al receptor (CD138) se midió en células de Mieloma Múltiple en la médula ósea, por lo tanto el sitio del tumor, en el paciente de Mieloma Múltiple. El receptor (CD138) ligado a BT062 se tiñó con anticuerpos anti-May (Muestra 1). Total CD138 se midió con anticuerpos anti-May después de saturación de receptor con BT062 (Muestra 2). Incubación con un isotipo IgG1 determinó enlace no específico a la muestra (Muestra 3). La primera hilera en la Tabla 12 muestra los resultados de una medición dentro de cuatro horas después de completar la administración. Como puede verse, la ocupación del receptor dentro de cuatro horas después del final de la administración en este caso es, 99 %. El paciente mostró una respuesta parcial. La duración de una administración (tiempo de administración) obviamente difiere con el modo de administración.

Los tiempos de administración en administraciones intravenosas (IV) en general se definen por mg/min (1 mg/min por los primeros 15 minutos y si se toleran, 3 mg/min por el resto) y por lo tanto aumentan con el nivel de dosis asignado al paciente. Los tiempos para lavar por arrastre la línea de administración después de administración varían por igual. En el presente estudio, para dosis entre 10 mg/m² y 200 mg/m², el tiempo de infusión más corto fue 18 minutos y el tiempo de infusión máximo fue 3 horas y 2 minutos con un promedio de 1 hora y 36 minutos. Si se administran 200 mg/m² completamente a 1 mg/min esto puede resultar en una administración de hasta 8 horas. En una realización alterna, el inmunoc conjugado puede ser administrado como bolo IV dentro de un minuto.

De esta manera, una administración de acuerdo con la presente invención se "completa" en cualquier tiempo entre 0 y 8 horas después del inicio de una administración, en general dentro de 0 y 4, a menudo dentro de 2 horas desde el inicio de la administración.

La Figura 22 muestra un paciente (13 en la Figura 18) sujeto al mismo esquema de administración (80 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22) que se administra a un paciente con relapso/refractario. El fuerte aumento de lambda-kappa antes del primer día de tratamiento puede ser estabilizado por 2 ciclos.

El paciente 12 en la Figura 18 (80 mg/m² como múltiples dosis repetidas como con anterioridad) mostró una respuesta parcial por aproximadamente 8 meses.

En un ejemplo adicional, el inmunoc conjugado BT062 se administra a un paciente con mieloma múltiple de relapso/refractario seis veces en una cantidad de 100 mg/m² como múltiples dosis repetidas en donde la duración de cada ciclo de tratamiento activo fue 21 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 y un periodo de reposo de 1 semana (no hay administración el día 22 lo que lleva efectivamente a una interrupción de administración de dos semanas). En este ejemplo, el inmunoc conjugado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que pueda concentrarse mejor en y/o en las células de tumor.

La Figura 23 muestra el resultado de este esquema de dosis con el paciente de 15 (Figura 18, con refractario relapso con MM oligo-secretorio), que mostró supervivencia libre de progreso por más de 3 meses.

A esta concentración, el nivel en plasma sólo fue inferior a la Cmax teórica durante las primeras dos administraciones (Tabla 11a) dirigiendo hacia una acumulación del inmunocombinado después de dosis semanal a esta dosis. Sin embargo, en los experimentos equivalentes con 120 mg/m² como múltiples dosis repetidas, estos valores disminuyeron indicando que los resultados de 100 mg/m² pueden ser una desviación en un solo paciente y también indicando que incluso a dosis superiores no puede llevarse a cabo acumulación significativa. Después de tres administraciones a 100 mg/m², a 120 mg/m² y, en su mayoría a 140 mg/m² y totalizando una administración de 300 mg/m², 360 mg/m² y 420 mg/m², respectivamente dentro de tres semanas, el inmunocombinado permaneció bien tolerado. No se observaron DLT después de tres ciclos de 21 días de 3x 100 mg/m² (300 mg/m²) o 3x 120 mg/m² (360 mg/m²) en cada ciclo (3x 300 mg/m²= 900 mg/m² en 12 semanas y 3x 360 mg/m²= 1080 mg/m² en 12 semanas) en comparación con 640 mg/m² (cuatro ciclos de 21 días de 160 mg/m² cada uno).

En un ejemplo adicional, el inmunocombinado BT062 se administró a un paciente con mieloma múltiple refractario/relapso seis veces en una cantidad de 120 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento activo fue de 21 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 y un periodo de reposo de una semana. En este ejemplo, el inmunocombinado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que puede mejor concentrarse dentro y/o en las células de tumor.

La Figura 24 muestra el resultado de este esquema de dosificación con el paciente 19 (Figura 18, MM de relapso refractario con oligo-secretorio) que mostró una respuesta menor no confirmada, a pesar de una cantidad de una cantidad de retrasos de tratamiento (x).

En esta concentración, el nivel de plasma todavía está por debajo de la Cmax teórica (Tabla 11a) indicando que no había acumulación relevante del inmunocombinado después de dosis semanal a esta dosis. Después de tres administraciones a 120 mg/m², que totalizan una administración de 360 mg/m² dentro de tres semanas, el inmunocombinado permaneció bien tolerado. No se observaron DLT después de tres ciclos de 21 días de 3x 120 mg/m² (360 mg/m²) en cada ciclo.

En un ejemplo adicional, el inmunocombinado BT062 se administra a un paciente con mieloma múltiple de relapso/refractario siete veces en una cantidad de 160 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento activo fue 21 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 y un periodo de reposo de 1 semana. En este ejemplo, el inmunocombinado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que puede mejor concentrarse en y/o dentro de las células de tumor. La Figura 25 muestra los resultados (proteína M disminuye en más de 25 % calificando para una respuesta menor) para el paciente 31, que como puede verse en la Figura 18 no exhibe DLT a esta concentración.

Como se indica en la Figura 18, 2 de 4 pacientes exhiben DLT a 160 mg/m² (enzimas elevadas en hígado, neutropenia) pero puede reanudar el tratamiento a 160 mg/m². En este esquema de administración, MAD fue 160 mg/m², mientras que 140 mg/m² se determina como MTD (1 de 6 pacientes muestran DLT a esta concentración)

Tabla 1: Cantidad total de BT062 suministrada dentro de 3 semanas resulta en diferente tolerabilidad del fármaco. Una sola dosis de 200 mg/m² en un periodo de 3 semanas resultó en DLT (toxicidades relacionadas al diana). Dosis totales similares (3x 80 mg/m², 3x 100 mg/m², 3x 120 mg/m², 3x 140 mg/m²) administradas en 3 intervalos durante un periodo de 3 semanas no resultan en ninguna toxicidad relacionada a fármaco seria en los pacientes.

Dosis sencilla cada tres semanas	Dosis sencilla cada tres semanas	Dosis sencilla repetida
160	200	240, 300, 360, 420
Eventos adversos relacionados al fármaco tales como toxicidad en los ojos	DLT	No hubo toxicidades relacionadas al fármaco serias (hasta ahora) un DLT (síndrome de eritrodisaetia palmar-plantar) a 420 de seis

En todavía en otro ejemplo, el inmunocombinado BT062 fue co-administrado a un paciente con Mieloma múltiple con relapso por cuatro ciclos en una cantidad de 80 mg/m² como múltiples dosis repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento es 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días, 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22. Al mismo tiempo, una dosis oral diaria de 25 mg de lenalidomida se administra a 1 a 21 y 40 mg de dexametasona se administra semanalmente (días 1, 8, 15, 22). En este ejemplo, el inmunocombinado se administra intravenosamente al paciente de manera tal que pueda mejor concentrarse dentro y/o en las células de tumor. A pesar de inicio retardado de los ciclos de tratamiento 2 y 3 y saltar la dosis de BT062 el día 15 del Ciclo 3 y lenalidomida los días 15 a 21 en el ciclo 3, se mantuvo una respuesta menor lograda después del primer ciclo (Figura 34).

En otro ejemplo, el inmunocombinado BT062 se co-administra a un paciente que sufre de tumor pancreático como múltiples dosis repetidas de 220 mg/m², como los tumores sólidos atrapan el inmunocombinado más rápidamente que las malignidades no asociadas con las masas sólidas en donde la duración de cada ciclo de tratamiento es 28 días con tres dosis/ciclo administradas los días 1, 8, y 15 del ciclo y ninguna administrada el día 22. Al mismo tiempo, una dosis oral diaria de 10 mg del agente inmunomodulador lenalidomida se administra. En este ejemplo, el

inmunoconjugado se administra intravenosamente al paciente de manera tal que pueda mejor concentrarse dentro y/o en la célula de tumor. La administración es seguida por un tratamiento de mantenimiento que consiste en una dosis sencilla repetida de 160 mg/m² del inmunoconjugado el día 1 de un ciclo de 21 días por 4 meses.

5 CD138 o syndecan-1 (también descrito como SYND1; SYNDECAN; SDC; SCD1; CD138 ANTIGEN, número de acceso SwissProt: P18827 humano) es una glucoproteína de membrana que originalmente fue descrita presente en células de origen epitelial, y subsecuentemente se encontró en células hematopoyéticas (Sanderson, 1989). CD138 tiene un largo dominio extracelular que enlaza con moléculas solubles (por ejemplo, los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF) y a moléculas insolubles (por ejemplo, a los componentes de matrices extracelulares de colágeno y fibronectina) a través de cadenas heparan sulfato (Langford, 1998; Yang, 2007) y actúa como receptor para la matriz extracelular. CD138 también media adhesión célula a célula a través de moléculas de enlace de heparina expresadas por células adherentes. Se ha mostrado que CD138 tiene un papel como un co-receptor para factores de crecimiento de células de mieloma (Bisping, 2006). Estudios de diferenciación de células plasmáticas muestran que CD138 también debe considerarse como un antígeno de diferenciación (Bataille, 2006).

15 En hematopoyesis maligna, CD138 se expresa altamente en la mayoría de las células MM, carcinoma de ovarios, carcinoma de riñón, carcinoma de vesicular biliar, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer pulmonar, células de carcinoma de colon y células de linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL = Chronic Lymphocytic Leukemia) (Horvathova, 1995), leucemia linfoblástica aguda (ALL = Acute Lymphoblastic Leukemia), leucemia mieloblástica aguda (AML = Acute Myeloblastic Leukemia) (Seftalioglu, 2003 (a); Seftalioglu, 2003 (b)), sarcomas de tejido sólido, carcinomas de colon así como otras malignidades hematológicas y tumores sólidos que expresan CD138 (Carbone et al., 1999; Sebestyen et al., 1999; Han et al., 2004; Charnaux et al., 2004; O'Connell et al., 2004; Orosz and Kopper, 2001). La expresión de CD138 también se asocia con diferentes tipos de malignidades gastrointestinales (Conejo et al., 2000). Como se ilustra en la Tabla 2, una cantidad de líneas celulares tumorigénicas existen que se asocian con expresión/sobre-expresión de CD138.

Tabla 2: Expresión CD138 en diferentes líneas celulares. En el contexto de MM se mostró que la sensibilidad hacia BT062 se correlaciona con una expresión superior de CD138 (índice de fluorescencia relativa, RFI = Relative Fluorescence Index).

Línea celular	Origen	Sensibilidad IC ₅₀ (nM)	Expresión CD138	
			RFI*	Receptores/célula
NCI-H929	MM	0,38	502	788.752
PC-3	Cáncer de próstata	0,79	541	195.671
U266	MM	1,59	617	782.987
MOLP-2	MM	1,78	425	161.064
SK-BR-3	Carcinoma de mama	2,72	485	444.350
LNCaP	Cáncer de próstata	7,39	179	23.388
CAPAN-2	Carcinoma de páncreas	15,51	328	n. d.
PANC-1	Carcinoma de páncreas	36,38	34	18.085
T47D	Carcinoma de mama	89,28	217	42.264
Jurkat	Linfoma de células T	39,00	n. d.	0

30 La sensibilidad observada, por ejemplo de las líneas celulares de carcinoma de mama y líneas celulares de carcinoma de páncreas fueron substancialmente menores que las de líneas celulares MM. Sin embargo, como se describe en la sección experimental en modelos de xenoinjerto de ratón utilizando células de pacientes con cáncer de mama y cáncer pancreático, no solo se obtuvieron resultados comparables, sino significativamente mejores que modelos de xenoinjerto comparables para MM. En ambos casos, remisión completa pudo obtenerse eventualmente, mientras que modelos MM comparables mostraron un retraso marcado en crecimiento de tumor, pero sin remisión completa.

40 Mientras que en cáncer pancreático no parece haber diferencia en expresión de ARNm de syndecan-1, entre los tumores tempranos o iniciales y avanzados, en carcinoma mamario, se informó que CD138 puede perderse con el tiempo como se refleja por tinción IHC débil o carente. Pérdida de expresión CD138 se ha informado y a menudo se correlaciona con un cambio de expresión, es decir expresión de novo en estroma circundante (Loussouarn, 2008). Como resultado, menos dianas para agentes dirigidos a CD138 pueden esperarse con el tiempo.

45 Otros cánceres que se han mostrado positivos para expresión de CD138 son muchos adenocarcinomas de ovarios, carcinomas de células de transición de vejiga, carcinomas de células claras de riñón, carcinomas pulmonares de células escamosas; y cánceres uterinos (véase, por ejemplo, Davies et al., 2004; Barbareschi et al., 2003; Mennerich et al., 2004; Anttonen et al., 2001; Wijdenes, 2002).

El tratamiento de mieloma múltiple activo (sintomático) y trastornos plasmaproliferativos relacionados habrán de servir como un ejemplo de enfermedades que pueden tratarse por inmunocombinados de la presente invención.

5 **Trastornos plasmaproliferativos** como se usa en el presente documento significan trastornos hematológicos y/o de células plasmáticas tales como MGUS, SMM, MM Activo (sintomático), Macroglobulinemia de Waldenström, plasmacitoma solitario, amiloidosis AL sistémica y síndrome de POEMS.

10 **Mieloma múltiple (MM)** se refiere a una proliferación maligna de células plasmáticas que típicamente se origina en la médula ósea, involucra primordialmente el esqueleto de un paciente y presenta características clínicas que se atribuyen a los sitios particulares de participación y anomalías en formación de proteínas plasmáticas. La afección habitualmente se caracteriza por numerosas acumulaciones nodulares o focos difusos de células plasmáticas anormales o malignas en la médula de diversos huesos (en especial el cráneo), provocando palpable hinchamiento de los huesos, y ocasionalmente en sitios extraesqueléticos. Ante examen radiológico, las lesiones de huesos pueden tener una apariencia "punzonada" característica. Las células implicadas en el mieloma típicamente producen proteínas anormales y/o niveles de proteínas anormales en el suero y en la orina. La enfermedad típicamente se desarrolla gamopatía monoclonal de significancia no determinada (MGUS = Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) a mieloma múltiple indolente (SMM = Smoldering Multiple Myeloma) a mieloma múltiple activo (MM = Active Multiple Myeloma). Síntomas de estas condiciones varían, pero pueden incluir hipercalcemia, insuficiencia renal, fatiga, anemia, dolor de huesos, fracturas espontáneas, incrementada frecuencia o duración de infección, o color u olor anormal de la orina. Cuando la presente invención se refiere a Mieloma Múltiple se refiere a (MGUS), mieloma múltiple indolente (SMM) y mieloma múltiple activo (MM) así como otra proliferación maligna de células plasmáticas que pueden desarrollarse eventualmente en MM activo.

25 **MGUS**, una afección de precursor clínicamente benigno de MM es más común que MM, ocurriendo en 1 % de la población con más de 50 años de edad y 3 % de aquellos con más de 70 años de edad (Greipp y Lust, 1995). Es importante distinguir pacientes con MGUS de aquellos con MM, ya que los pacientes de MGUS pueden ser observados con seguridad sin recurrir a terapia. Sin embargo, durante el seguimiento a largo plazo, de 241 pacientes con MGUS, 59 pacientes (24,5 %) continúan desarrollando MM o un trastorno relacionado (véase Kyle et al., 1993).

30 El término **gamopatía** se refiere a una perturbación primaria en síntesis de inmunoglobulina de un paciente.

35 La **gamopatía monoclonal** se refiere a cualquiera de un grupo de trastornos que se asocian típicamente a la proliferación de un solo clon de células plasmáticas o linfoides (normalmente visibles en electroforesis de proteínas de suero (SPEP = Serum Protein ElectroPhoresis) como un solo pico) y caracterizado por la presencia de inmunoglobulina monoclonal en el suero u orina de un paciente.

40 MM indolente (**SMM** = Smoldering MM) se ha informado que precede al inicio de mieloma múltiple sintomático en los mayores. El mieloma múltiple indolente a menudo se considera como una fase avanzada de MGUS; incluso al tiempo de progresión, mieloma múltiple evolucionado de mieloma múltiple indolente habitualmente carece de lesiones osteolíticas u otras características cardinales de mieloma múltiple sintomático.

45 Los síntomas clínicos de MM incluyen anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal y lesiones de huesos líticas. Las distinciones en el curso y severidad de la enfermedad conforme se desarrolla gamopatía monoclonal de significancia no determinada (MGUS) a mieloma múltiple indolente (SMM) a mieloma múltiple (MM) se proporcionan en la Tabla 3 siguiente. La tabla también resume métodos de detección, diagnóstico y supervisión de estas condiciones. Dichos síntomas y técnicas son familiares para aquellos expertos en la materia.

TABLA 3			
Comparación de Características Clínicas de MM, SMM o MGUS			
Características	MM	SMM	MGUS
Células plasmáticas de médula	>=10 %	>=10 %	<10 %
Proteína M de suero	>=3 g/dl	>=3 g/dl	<3 g/dl
Bence-Jones	>=1 g/24 h	<1 g/24 h	<1 g/24 h
Proteína en orina	Sí	Sí	Sí
Anemia	habitualmente presente	Puede ser	Ausente
Hipercalcemia, insuficiencia renal	Puede estar presente	ausente	ausente
Lesiones de hueso líticas	Habitualmente presente	ausente	Ausente

TABLA 3			
MM = mieloma múltiple			
SMM = mieloma múltiple indolente			
MGUS = gamopatía monoclonal de significancia indeterminada			
Fases de clasificación por características clínicas y severidad de mieloma múltiple			
Fase de avance de la enfermedad			
Fase I (MM activo)			
Relativamente pocas células de cáncer se han diseminado a través del cuerpo. El número de glóbulos rojos y la cantidad de calcio en la sangre son normales. No se encuentran tumores (plasmacitomas) en el hueso. La cantidad de proteína M en la sangre u orina es muy baja. Puede no haber síntomas de enfermedad.			
Fase II (MM activo)			
Un número moderado de células de cáncer se ha diseminado a través del cuerpo			
Fase III (MM activo)			
Una cantidad relativamente grande de células de cáncer se ha diseminado a través del cuerpo. Puede haber uno o más de los siguientes: Una disminución en el número de glóbulos rojos, provocando anemia. La cantidad de calcio en la sangre es muy alta, debido a que los huesos se dañan. Se encuentran más de tres tumores óseos (plasmacitomas). Se encuentran altos niveles de proteína M en sangre u orina.			
Características clínicas de MM			
Hipercalcemia			
Insuficiencia renal			
Anemia			
Proteína monoclonal:			
SPEP (electroforesis de proteína de suero)			
SPIEP (inmunolectroforesis de proteína de suero)			
Inmunolectroforesis de proteína en orina (proteína Bence - Jones)			
Diagnóstico de MM			
>10 % de células plasmáticas en médula o agregados en biopsia o un plasmacitoma			
Proteína monoclonal:			
Proteína M de suero >3 g/dl o			
Proteína M en orina			

El mieloma múltiple activo (MM) se reconoce típicamente en forma clínica por la proliferación de células plasmáticas malignas en la médula ósea de un paciente. Estas células plasmáticas neoplásicas producen inmunoglobulinas y evolucionan de linfocitos B. Las inmunoglobulinas que se producen por las células plasmáticas pueden detectarse

en el suero de sangre y/u orina de un paciente por prueba de electroforesis.

Como se indica en la **Tabla 3**, la medición de proteína M de suero es una herramienta importante para estimar MM en diferentes etapas.

5 **"Proteína M"** se refiere a una proteína monoclonal que típicamente se visualiza como una banda estrecha en gel electroforético, o un arco anormal en inmunoelectroforesis. Representa una proliferación de inmunoglobulina homogénea producida por células de clon que se originan de una célula común sencilla, por ejemplo una inmunoglobulina monoclonal caracterizada por una cadena pesada de una sola clase y sub-clase, y cadena ligera de un solo tipo (también referido como pico M y más ampliamente como paraproteína).

15 **"Electroforesis de proteína en suero"** (SPE o SPEP) y **"inmunofijación por electroforesis"** (IFE) pueden detectar inmunoglobulina monoclonal, que se produce en varios trastornos proliferativos de células plasmáticas incluyendo mieloma múltiple (MM). A lo ancho de la población, hasta 61 % de estos hallazgos no están asociados con síntomas clínicos, permitiendo un diagnóstico de monogamopatía de significancia no determinada (MGUS). SPE y IFE sin embargo no detectan todas las inmunoglobulinas monoclonales, particularmente cuando solo se secretan cadenas ligeras.

20 Aquellas **"moléculas de cadena ligera libres"** (FLC = "Free Light Chain Molecules") incluyen cadenas ligeras λ y κ . Las células plasmáticas producen uno de los cinco tipos de cadenas pesadas junto con cualquiera de moléculas κ o λ . Esto normalmente es en forma aproximada 40 % de exceso de producción de cadena ligera libre sobre síntesis de cadena pesada. Células plasmáticas secretan cadenas ligeras libres (FLC, kappa o lambda) además de moléculas de inmunoglobulina intactas, y en niveles de cadena ligera en suero se determinan por las proporciones relativas de síntesis ($\kappa > \lambda$) y excreción renal ($\kappa > \lambda$). En la presencia de una inmunoglobulina monoclonal, las proporciones $\kappa : \lambda$ ya pueden ser superiores o menores que el intervalo normal, dependiendo de la clase de FLC implicadas. La vida media en suero de FLC es de 2-6 horas, en comparación 5 días para IgA, 6 días para IgM y 21 días para IgG. De esta manera, la medición de niveles de FLC en suero permite una evaluación bastante más rápida de respuesta de tumor a la terapia que la medición de inmunoglobulina intacta. Igualmente, mediciones de FLC en suero permiten detección temprana de relapso.

30 Las enfermedades no proliferativas de plasma también se asocian a expresión de CD138.

Carcinoma pancreático

35 La mayoría de casos comprenden tipo exocrino. La mayoría de estos cánceres exocrinos representan adenocarcinoma ductal (además subtipos más rápidos comprenden tumores quísticos, tumores de células acinares y sarcoma). El cáncer endocrino del páncreas representa un tumor que produce hormona.

40 **Carcinoma *in situ*** se refiere a la etapa temprana de cáncer, cuando está confinada a la capa de células en donde empezó. En cáncer de mama, *in situ* significa que las células de cáncer permanecen confinadas a ductos (carcinoma ductal *in situ*) o lóbulos (carcinoma lobular *in situ*). No han crecido en tejidos más profundos en la mama o diseminado a otros órganos en el cuerpo, y en ocasiones se denominan cánceres de mama *no-invasivos* o *pre-invasivos*. Carcinoma invasivo (infiltrante).

45 Las células exocrinas y células endocrinas del páncreas forman tipos completamente diferentes de tumores.

Tumores exocrinos

50 Estos son por mucho, el tipo más común de cáncer de páncreas y la mayoría de los tumores exocrinos pancreáticos son malignos. Aproximadamente el 95 % de cánceres del páncreas exocrino son adenocarcinomas (un adenocarcinoma es un cáncer que empieza en células de glándulas). Estos cánceres habitualmente empiezan en los ductos del páncreas, pero en ocasiones se desarrollan de células que constituyen las enzimas pancreáticas (carcinomas de células acinares).

55 Los tipos menos comunes de cánceres ductales del páncreas exocrino incluyen carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células gigantes.

Tumores endocrinos

60 Los tumores de páncreas endocrino no son comunes. Como grupo, se conocen como tumores neuroendocrinos pancreáticos (NET = neuroendocrine tumors), o en ocasiones como tumores de células de isleta. Hay varios subtipos de tumores de células de isletas. Cada uno se nombra de acuerdo con el tipo de célula productora de hormona donde empieza:

65 El sistema principal empleado para describir las etapas de cánceres de páncreas exocrino es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) como se dispone por la *American Cancer Society* (ACS). El sistema TNM para clasificación contiene 3 partes clave de información:

T describe el tamaño del o de los tumores primarios, medidos en centímetro (cm), y si el cáncer se ha diseminado dentro del páncreas o a órganos cercanos. Se hacen distinciones entre TX, T0, T1, T2, T3 y T4, en donde un número superior indica avance de la enfermedad.

5 **N** describe la diseminación a nodos linfáticos cercanos (regional). Las categorías N incluyen NX, NO y N1.

M indica si el cáncer se ha sometido a metástasis (diseminado) a otros órganos del cuerpo. (Los sitios más comunes de cáncer pancreático diseminados son el hígado, pulmones, y peritoneo – el espacio alrededor de los órganos digestivos). **Las categorías M incluyen: MX, M0 y M1.**

10 Después de que se han determinado las categorías T, N y M, esta información se combina para asignar una fase, un proceso denominado agrupamiento por fases.

15 **Fase 0 (Tis, N0, M0):** El tumor se confina a las capas superiores de células de ductos pancreáticos y no ha invadido tejidos más profundos. No se ha diseminado fuera del páncreas. Estos tumores en ocasiones se denominan carcinoma pancreático in situ o neoplasia intraepitelial pancreática III (PanIn III).

20 **Fase IA (T1, N0, M0):** El tumor está confinado al páncreas y tiene menos de 2 cm de tamaño. No se ha diseminado a nodos linfáticos cercanos o sitios distantes.

Fase IB (T2, N0, M0): El tumor se confina al páncreas y es mayor que 2 cm de tamaño. No se ha diseminado a nodos linfáticos cercanos o sitios distantes.

25 **Fase IIA (T3, N0, M0):** El tumor crece fuera del páncreas pero no en grandes vasos sanguíneos. No se ha diseminado a nodos linfáticos cercanos o sitios distantes.

30 **Fase IIB (T1-3, N1, M0):** El tumor ya está confinado al páncreas o creciendo fuera del páncreas pero no en grandes vasos sanguíneos o nervios mayores cercanos. Se ha diseminado a nodos linfáticos cercanos pero no a sitios distantes.

Fase III (T4, Cualquier N, M0): El tumor crece fuera del páncreas en grandes vasos sanguíneos o nervios mayores cercanos. Puede o no haberse diseminado a nodos linfáticos cercanos. No se ha diseminado a sitios distantes.

35 **Fase IV (Cualquier T, Cualquier N, M1):** El cáncer se ha diseminado a sitios distantes.

40 Aunque formalmente no forma parte del sistema TNM, otros factores también son importantes para determinar pronóstico (perspectiva). El grado de cáncer (cuán anormales serían las células bajo el microscopio), en ocasiones se cita en una escala de G1 a G4, con cánceres G1 que se ven como las células más semejantes a normales y que tienen la mejor perspectiva.

45 Para pacientes que se han sometido a cirugía, otro factor importante es la extensión de la resección – si se retiró o no todo el tumor. Esto en ocasiones se cita a escala de R0 (en donde todo tumor visible y microscópico se retiró) a R2 (en donde algún tumor visible no pudo retirarse).

50 Desde un punto de vista práctico, cuán lejos se ha diseminado el cáncer a menudo no puede ser determinado de forma precisa sin cirugía. Esta es la razón por la que los doctores a menudo utilizan un sistema de clasificación más simple, que divide los cánceres en grupos con base en si es o no probable que puedan ser retirados quirúrgicamente. Estos grupos se denominan resecables, o que pueden ser operados, avanzados localmente (no resecables), y metastásicos. Estos términos pueden emplearse para describir tanto cánceres pancreáticos exocrinos como endocrinos.

55 **Resecable:** Si el cáncer solo está en el páncreas (o se ha diseminado justo más allá de él) y el cirujano puede retirar el tumor, se denomina resecable.

Avanzado localmente (no resecable): Si el cáncer no se ha diseminado aún a órganos distantes pero todavía no puede ser retirado por completo con cirugía, se denomina *avanzado localmente*. A menudo la razón por la que el cáncer no puede retirarse es debido a que demasiado del mismo está presente en vasos sanguíneos cercanos.

60 **Metastásico:** cuando el cáncer se ha diseminado a órganos distantes, se denomina metastásico. Todavía puede realizarse cirugía, pero la meta sería aliviar los síntomas no curar el cáncer.

65 Los cánceres neuroendocrinos pancreáticos no se clasifican como los cánceres del páncreas exocrino. Por el contrario, las estadísticas se descomponen en fases diferentes: localizado (solo en el páncreas), regional (diseminado a tejidos o nodos linfáticos cercanos), y distante (diseminado a sitios distantes, tales como el hígado).

Los **Tumores de vejiga** se agrupan por la forma en que las células de cáncer se ven al microscopio.

El carcinoma de células de transición (también denominado carcinoma urotelial) es por mucho el tipo más común de cáncer de vejiga. Dentro de este grupo también hay subtipos. Se nombran dependiendo de la forma de las células y si tienden a diseminarse e invadir otros órganos. (Si es probable que crezcan más profundos dentro de la pared de la vejiga se denominan invasivos, si no es probable que no sean invasivos). Estos tumores se dividen en grados basados en cómo se ven las células al microscopio. Si las células se ven más como células normales, el cáncer se denomina un cáncer de bajo grado. Cuando las células tienen un aspecto muy anormal, el cáncer es de alto grado. Cánceres de bajo grado tienden a crecer más lentamente y tienen un mejor resultado que los cánceres de grado superior.

También se incluyen en la definición, carcinoma de células escamosas (no es común; habitualmente invasivo); adenocarcinoma (no es común; casi todos son invasivos); células pequeñas (raro). Otros cánceres de vejiga raros también se incluyen en esta definición.

15 El cáncer de vejiga también tiene fases:

Fase 0a (Ta, N0, M0):

20 El cáncer es un carcinoma papilar no invasivo. Tiene crecimiento hacia el centro hueco de la vejiga pero no tiene crecimiento al músculo o tejido conectivo de la pared de la vejiga. No se disemina a los nodos linfáticos o sitios distantes.

Fase 0is (Tis, N0, M0):

25 El cáncer es un carcinoma plano, no invasivo, también conocido como carcinoma plano *in situ* (CIS = carcinoma *in situ*). El cáncer crece en la capa de revestimiento de la vejiga solamente. Ni tiene crecimiento hacia dentro a la parte hueca de la vejiga ni ha invadido el músculo o tejido conectivo de la pared de la vejiga. No se ha diseminado a los nodos linfáticos o sitios distantes.

30 **Fase I (T1, N0, M0):**

El cáncer ha crecido en la capa de tejido conectivo bajo la capa de revestimiento de la vejiga sin crecimiento en la capa gruesa de músculo en la pared de la vejiga. El cáncer no se ha diseminado a los nodos linfáticos o a sitios distantes.

35 **Fase II (T2, N0, M0):**

40 El cáncer ha crecido dentro de la capa de músculo grueso de la pared de la vejiga pero no ha pasado completamente a través del músculo para llegar a la capa de tejido graso que circunda a la vejiga. El cáncer no se ha diseminado a los nodos linfáticos o a sitios distantes.

Fase III (T3 o T4a, N0, M0):

45 El cáncer ha crecido completamente a través de la vejiga dentro de la capa de tejido graso que circunda a la vejiga (T3). Puede haberse diseminado a la próstata, útero o vagina (T4a). No crece dentro de la pared pélvica o abdominal. El cáncer no se ha diseminado a nodos linfáticos o a sitios distantes.

Fase IV (T4b, N0, M0) o (cualquier T, N 1 a 3, M0) o (cualquier T, cualquier N, M1):

50 El cáncer se ha diseminado a través de la pared de la vejiga a la pared pélvica o abdominal (T4b) y/o se ha diseminado a nodos linfáticos (N1-3) y/o a sitios distantes tales como huesos, hígado o pulmones (M1).

Tipos de carcinoma de vesícula biliar

55 Más de 9 de 10 cánceres de vesícula biliar son adenocarcinoma. Un adenocarcinoma es un cáncer que empieza en las células con propiedades tipo glándula que revisten muchas superficies internas y externas del cuerpo (incluyendo el interior del sistema digestivo).

60 Un tipo de adenocarcinoma de vesícula biliar que merece atención especial se denomina *adenocarcinoma papilar* o solo *cáncer papilar*. Estos son cánceres de vesícula biliar cuyas células se disponen en proyecciones tipo dedos cuando se ve al microscopio. En general, los cánceres papilares no es probable que crezcan dentro del hígado o nodos linfáticos cercanos. Tienden a tener un mejor pronóstico (perspectiva) que la mayoría de otros tipos de adenocarcinomas de vesícula biliar. Aproximadamente 6 % de todos los cánceres de vesícula biliar son adenocarcinomas papilares. Hay otros tipos de cáncer que pueden desarrollarse en la vesícula biliar, tales como carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células pequeñas, pero estos no son comunes.

Las siguientes fases de carcinomas de vesícula biliar se distinguen con base en el sistema TNM de AJCC:

Fase 0: Tis, N0, M0: Este es un pequeño cáncer solo en la capa epitelial de la vesícula biliar. No se ha diseminado fuera de la vesícula biliar.

Fase IA: T1(a o b), N0, M0: El tumor crece en la lámina propia (T1a) o la capa muscular (T1b). No se ha diseminado fuera de la vesícula biliar.

Fase IB: T2, N0, M0: El tumor crece dentro del tejido fibroso perimuscular. No se ha diseminado fuera de la vesícula biliar.

Fase IIA: T3, N0, M0: El tumor se extiende a través de la capa serosa y/o directamente crece dentro del hígado y/o una o más estructuras cercanas. No se ha diseminado a los nodos linfáticos o a tejidos u órganos lejanos de la vesícula biliar.

Fase IIB: T1 a T3, N1, M0: Además de cualquier crecimiento en la vesícula biliar, el tumor se ha diseminado a nodos linfáticos cercanos (N1). No se ha diseminado a tejidos u órganos lejanos de la vesícula biliar.

Fase III: T4, cualquier N, M0: El tumor invade los vasos sanguíneos principales que dirigen dentro del hígado o ha alcanzado a más de un órgano cercano diferente al hígado. Puede o no haberse diseminado a los nodos linfáticos. No se ha diseminado a tejidos u órganos alejados de la vesícula biliar.

Fase IV: Cualquier T, cualquier N, M1: El tumor se ha diseminado a tejidos u órganos lejanos de la vesícula biliar.

Carcinoma mamario

Un adenocarcinoma se refiere en general a un tipo de carcinoma que empieza en tejido glandular (tejido que produce y secreta una sustancia). En el contexto de cáncer de mama, los ductos y lóbulos de la mama son tejido glandular, de manera tal que los cánceres que empiezan en estas áreas a menudo se denominan adenocarcinomas. Hay varios tipos de cáncer de mama, aunque algunos de ellos son bastante raros. En algunos casos, un solo tumor de mama puede tener una combinación de estos tipos o tener una mezcla de cáncer invasivo e *in situ*.

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS; también conocido como *carcinoma intra ductal*) es el tipo más común de cáncer de mama no invasiva.

El **carcinoma ductal invasivo (o infiltrante) (IDC = invasive ductal carcinoma)** es el tipo más común de cáncer de mama. Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante) (IDC) empieza en un pasaje de leche (ducto) de la mama, rompe la pared del ducto y crece dentro del tejido graso de la mama. En este punto puede ser capaz de diseminarse (metástasis) a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y la corriente sanguínea. Aproximadamente 8 a 10 cánceres de mama invasivos son carcinomas ductales infiltrantes. Pacientes IDC revelan expresión de CD138 (Loussouarn et al., 2008).

El **cáncer de mama triple negativo** describe cánceres de mama (habitualmente carcinomas ductales invasivos) cuyas células carecen de receptores de estrógeno y receptores de progesterona, y no tienen un exceso de la proteína HER2 en sus superficies. Cánceres de mama triple negativos tienden a crecer y diseminarse más rápidamente que la mayoría de los otros tipos de cáncer de mama. Debido a que las células de tumor carecen de estos ciertos receptores, ni terapia de hormonas ni fármacos que hacen diana en HER2 son efectivos contra estos cánceres (aunque la quimioterapia todavía puede ser útil, de requerirse).

Algunos otros cánceres de mama que caen bajo el término "carcinoma mamario" son cáncer de mama inflamatorio, carcinoma medular, carcinoma metaplásico, carcinoma mucinoso, carcinoma tubular, carcinoma papilar, carcinoma cístico adenoide (carcinoma adenoquistico), tumor phyllodes.

La cirugía, radiación o quimioterapia constituyen terapias de cáncer estándar. Terapia de hormonas se emplea en ocasiones. La terapia de hormonas es una forma de terapia sistémica. Es más a menudo empleada como una terapia adyuvante para ayudar a reducir el riesgo de recurrencia de cáncer después de cirugía, aunque puede emplearse como tratamiento neoadyuvante por igual. También se utiliza para tratar cáncer que ha regresado después de tratamiento o se ha diseminado. Estrógeno promueve el crecimiento de aproximadamente 2 de 3 cánceres de mama – aquellos que contienen receptores de estrógeno (cánceres ER-positivos) y/o receptores de progesterona (cánceres PR-positivos). Debido a esto, varios enfoques a bloquear el efecto de estrógeno o reducir los niveles de estrógeno, se emplean para tratar cánceres de mama ER-positivos y PR-positivos. Sin embargo, terapia de hormonas es ineficaz para pacientes que carecen de ER o PR.

El carcinoma mamario también sigue este sistema de fases:

Fase 0: Células atípicas no se han diseminado fuera de los ductos o lóbulos, los órganos productores de leche, dentro del tejido de mama circundante. Referido como carcinoma *in situ*, se clasifica en dos tipos: "Carcinoma ductal *In Situ*" (DCIS), que es un cáncer muy temprano que es altamente tratable y es de sobrevivencia y "Carcinoma Lobular *In Situ*" (LCIS), que no es un cáncer sino un indicador que identifica a una mujer que tiene

5 un riesgo incrementado en desarrollar cáncer de mama.
Fase I: El cáncer no es más grande que dos centímetros (aproximadamente una pulgada) y no se ha diseminado a nodos linfáticos circundantes o fuera de la mama.

Fase II: Ésta fase se divide en dos categorías de acuerdo con el tamaño de tumor y si o no se ha diseminado a los nodos linfáticos:

10 Cáncer de mama **Fase II A** - el tumor tiene menos de dos centímetros y se ha diseminado hasta tres nodos linfáticos de axila auxiliares. O, el tumor ha crecido más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y no se ha diseminado a los nodos linfáticos circundantes.

15 Cáncer de mama **Fase II B** - el tumor ha crecido entre dos y cinco centímetros y se ha diseminado hasta tres nodos linfáticos axilares auxiliares. O, el tumor es más grande que cinco centímetros, pero no se ha diseminado a los nodos linfáticos circundantes.

Fase III: Esta fase también se divide en dos categorías:

Cáncer de mama **Fase III A** - el tumor es más grande que dos centímetros pero más pequeño que cinco centímetros y se ha diseminado hasta nueve nodos linfáticos auxiliares de axila.

20 Cáncer de mama **Fase III B** - el cáncer se ha diseminado a tejidos cerca de la mama incluyendo la piel, pared de pecho, costillas, músculos o nodos linfáticos en la pared del pecho o sobre la clavícula.

Fase IV: Aquí, el cáncer se ha diseminado a otros órganos o tejidos, tales como hígado, pulmones, cerebro, sistema esquelético o nodos linfáticos cerca de la clavícula.

25 **Cáncer pulmonar**

Hay 4 tipos de tumores pulmonares neuroendocrinos, es decir carcinoma neuroendocrino de grandes células, tumor carcinoide atípico, tumor carcinoide típico y cáncer pulmonar de células pequeñas. Los tumores carcinoide son tumores que empiezan de células del sistema neuroendocrino difuso. Los tumores carcinoide típicos y atípicos se ven diferentes al microscopio. Los carcinoide típicos crecen lentamente y solo raramente se diseminan más allá de los pulmones y aproximadamente 9 de 10 carcinoide de pulmón son carcinoide típicos.

Para propósitos de tratamiento dos tipos principales de cáncer pulmonar, que son tratados de manera muy diferentemente, se distinguen, es decir cáncer pulmonar de células microcíticas (SCLC = Small Cell Lung Cancer) y cáncer pulmonar de células no microcíticas (NSCLC = Non-Small Cell Lung Cancer). Si el cáncer tiene características de ambos tipos, se denomina *cáncer de células grandes/células microcíticas mixtas*.

35 Aproximadamente del 10 % al 15 % de todos los cánceres pulmonares son el mismo tipo de célula. Otros nombres para SCLC son *carcinoma microcítico* y *carcinoma no diferenciado de células microcíticas*.

Este cáncer a menudo empieza en los bronquios cerca del centro del pecho. Aunque las células de cáncer son pequeñas, pueden dividirse rápidamente, forman grandes tumores, y se diseminan a los nodos linfáticos y otros órganos a través del cuerpo. La cirugía raramente es una opción y nunca es el único tratamiento suministrado. Tratamiento incluye agentes citotóxicos, tales como fármacos para determinar la enfermedad amplia/extensa. Hay 3 sub-tipos de NSCLC, es decir carcinoma de células escamosas; adenocarcinoma; carcinoma de células grandes (no diferenciado).

45 **Clasificación de cáncer pulmonar de células no microcíticas**

El sistema empleado para clasificar cáncer pulmonar de células no microcíticas es el sistema del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Las fases se describen utilizando números Romanos de 0 a IV (0 a 4). Algunas fases además se dividen en A y B. Como regla, cuanto menor sea el número menos se ha diseminado el cáncer. Un número alto, tal como fase IV (4), significa un cáncer más avanzado.

Un sistema de fases respectivo, incluyendo las Clases I a IV, también se desarrolló para carcinoma de células escamosas (cáncer de cabeza y cuello). Los cánceres de Clase I son cánceres localizados y habitualmente curables, la clase II y III, típicamente son avanzados localmente y/o se han diseminado a los nodos linfáticos locales, y los cánceres de Clase IV habitualmente son metastásicos (que se han diseminado a partes distantes del cuerpo) y en general se consideran inoperables.

El tratamiento en el contexto de la presente invención incluye evitar o frenar la progresión, estabilizar el estado de enfermedad, remitir la enfermedad o mejorar uno o más síntomas de un trastorno asociado a células que expresan CD-138. El tratamiento de esta manera incluye evitar o frenar el aumento de severidad o la remisión del trastorno. En el caso de MM generalmente solo pacientes con MM activo clase II o III reciben terapia primaria (pacientes de Clase I con SMM inicialmente solo se observan en intervalos de 3 a 6 meses), un tratamiento de acuerdo con la presente invención no solo incluye tratamiento por ejemplo de cualquier clase activa de MM, sino también incluye el tratamiento de formas de estados de enfermedad que preceden el estado de enfermedad tradicionalmente tratado.

65 El tratamiento en particular también incluye evitar la progresión de un estado de enfermedad al siguiente: en el caso de MM, esto por ejemplo sería la forma de progresión de MGUS a SMM o de SMM a clase I MM activo u otra clase

de MM. En el caso de cánceres de páncreas exocrino, por ejemplo una progresión de la Clase I a Clase II, incluyendo cualquier empeoramiento como se refleja por las categorías establecidas por AJCC dentro de las clases, por ejemplo de IA a IB. Sin embargo, el término también incluye mantener el estatus quo, tal como mantener enfermedad estable y, como se discute a continuación, producir ciertas respuestas en el paciente tratado. Un paciente también se "trata" exitosamente si el paciente muestra reducción observable y/o medible en o en la ausencia de entre otros, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células de cáncer o ausencia de las células de cáncer; reducción en el tamaño de tumor; inhibición (es decir, frenar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos incluyendo la diseminación de cáncer dentro del tejido suave y hueso; inhibición (es decir, frenar en cierta medida preferentemente detener) metástasis de tumor; inhibición, en cierta medida de crecimiento de tumor; y/o alivio en cierta medida de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; reducir la morbilidad y mortalidad, y mejora en la calidad de aspectos de la vida. En general, un efecto de un cierto tratamiento en el estado de enfermedad de un paciente puede supervisarse, en el caso de MM, al medir los niveles de proteína M en el suero y/u orina del paciente y/o los niveles FLC en el suero y/u orina del paciente. En el caso de otros trastornos asociados con células que expresan CD-138, se miden otros parámetros para estimar el efecto de un tratamiento de acuerdo con la presente invención. Proteína C-reactiva (CRP = C-reactive protein) es un parámetro de inflamación no específico para supervisión clínica de cáncer. Por nombrar solo unos cuantos, para cáncer pancreático, parámetros relevantes que pueden medirse son CA 19-9 (antígeno en carbohidrato 19.9, un marcador de tumor a menudo elevado en cáncer pancreático), bilirrubina, o CRP. Además, la formación de imagen tal como sonografía, CT, MRT se emplea. En cáncer de cabeza y cuello, biomarcadores que dependen del tipo de tumor se emplean (por ejemplo, enolasa específica de neurona (NSE = neuron-specific enolase) para células de Merkel o antígeno carcinoembrionario (CEA = carcinoembryonic antigen); en carcinoma de mama, la expresión de CA 15-3Her₂ y la expresión de Cadherina pueden emplearse como marcadores, mientras que el tratamiento supervisado por marcadores de suero tales como NSE.

El antígeno de tumor de vejiga (BTA= Bladder Tumor Antigen) y las pruebas NMP22 pueden emplearse junto con cistoscopia (utilizando un tubo iluminado delgado para observar la vejiga) para diagnosticar la condición en sujetos sintomáticos. Estas pruebas también se utilizan para dar seguimiento a algunos pacientes después de tratamiento, aunque la cistoscopia y citología de orina (utilizando un microscopio para buscar células de cáncer en la orina) todavía se recomiendan como las pruebas estándar para diagnóstico y seguimiento. Las pruebas BTA y NMP22 a menudo se emplean entre cistoscopias. Valores normales pueden permitir que se realice cistoscopia menos a menudo. Sin embargo, estas pruebas no pueden reemplazar a la citología y cistoscopia de orina.

Para cáncer de vejiga avanzado, algunos de los marcadores empleados para otros cánceres tales como CEA, CA 125, CA 19-9, y antígeno polipéptido de tejido (TPA = tissue polypeptide antigen) pueden ser elevados y pueden emplearse para dar seguimiento a los pacientes durante y después de tratamiento. Para cáncer pulmonar, no existen marcadores establecidos, pueden elevarse, CEA y NSE.

Las células de tumor, tales como células de mieloma o células de carcinoma mamario se conoce que desprenden CD138. La pérdida de CD138 de superficies está correlacionada con un mal pronóstico en mieloma. Altos niveles de CD138 soluble también se han detectado en otras indicaciones oncológicas tales como cáncer de cabeza y cuello o pulmonar (Anttonen et al. 1999). La pérdida de Syndecan-1 de superficie se correlaciona con la transición mesenquimal epitelial (EMT = Epithelial Mesenchymal Transition) este proceso describe la transformación de una célula maligna en una célula mal o menos diferenciada asociada a invasividad y estadio metastásico. Esto por ejemplo se informa para cáncer de mama metastásico (Loussouarn et al., 2008).

Una **cantidad eficaz** de un agente, en particular un inmunoconjugado o una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención, se refiere a una cantidad requerida para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto, en particular un sujeto humano (paciente). En el caso de cáncer tal como MM, la cantidad efectiva del agente puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño de tumor; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, frenar en cierta medida y preferentemente detener) metástasis de tumor; inhibir en cierta medida, crecimiento de tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición en el presente documento de "tratamiento".

"Un equivalente farmacocinético" de, por ejemplo 200 mg/m² se refiere a la cantidad de inmunoconjugado que resulta en farmacocinética igual observada a dosis de 200 mg/m² cuando el inmunoconjugado se administra en combinación, incluyendo co-administrar con un agente para tratamiento actual incluyendo efectos secundarios adversos potenciales primordialmente en células no diana que también expresan CD138. Esos equivalentes pueden ser algo menos que 200 o algo más que 200, dependiendo del otro agente. Se incluyen por ejemplo cantidades efectivas menores a 160, menores a 170, menores a 180, menores a 190 y menores a 210, menores a 220, menores a 230 y menores a 240 mg/m². Por ejemplo, la persona con destreza en la técnica esperará que la administración concomitante con corticosteroides o con antibióticos permitirá dosis ligeramente superiores del inmunoconjugado incluso en casos de efectos secundarios en la piel, que sin embargo pueden evaluarse fácilmente por el experto en la materia.

Para evaluar el éxito de la administración de un fármaco, aquí un inmunoconjugado (es decir, su capacidad para producir una respuesta funcional, es decir su eficacia), se distinguen diferentes "respuestas" a una administración.

Las respuestas a menudo se evalúan al medir la eficacia de parámetros en la sangre. Los parámetros típicos de efectividad en sangre son nivel de proteína M, nivel FLC u otros marcadores que se correlacionan con la enfermedad en cuestión con la eficacia del inmunoconjugado (marcador específico de la enfermedad) en particular el cáncer en cuestión. La eficacia indica la capacidad para cambio beneficioso de un tratamiento determinado.

5

En el contexto de MM y otras enfermedades plasmoproliferativas, las respuestas se distinguen como sigue:

10

la expresión **respuesta completa** (CR= Complete Response) se refiere a la inmunofijación negativa de suero y orina y desaparición de cualesquiera plasmacitomas de tejido suave y <5 % de células plasmáticas en médula ósea;

la expresión **respuesta completa severa** (sCR= Stringent Complete Response) se refiere a CR como se definió anteriormente más la proporción FLC normal y ausencia de células clonales en médula ósea por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia;

15

la expresión **respuesta parcial muy buena** (VGPR = Very Good Partial Response) se refiere a componente M en suero y orina detectable por inmunofijación, pero no en electroforesis o ≥ 90 % o mayor reducción en componente M de suero más componente M de orina <100 mg durante 24 h;

20

la expresión **respuesta parcial** (PR = Partial Response) se refiere a ≥ 50 % reducción de proteína M en suero y reducción en 24 horas de proteína M urinaria por ≥ 90 % o a <200 mg por 24 horas, si la proteína M de suero y orina no se miden, una disminución de ≥ 50 % en la diferencia entre niveles FLC involucrados y no involucrados se requiere en lugar de los criterios de proteína M, si la proteína M en suero y orina no se puede medir, y tampoco se puede medir el ensayo o análisis de cadenas ligeras libres en suero, reducción de ≥ 50 % en células plasmáticas de médula ósea se requiere en lugar de proteína M, siempre que el porcentaje de líneas de referencia fue ≥ 30 %, además de los criterios anteriores, de estar presentes en la línea de referencia, reducción de ≥ 50 % en tamaño de plasmacitomas de tejido suave también se requiere (Durie et al., 2006).

25

La expresión **respuesta menor** (MR = Minor Response) en relación a pacientes con mieloma de relapso/refractario se refiere a ≥ 25 % pero reducción de <49 % de proteína M en suero y reducción en proteína M de orina de 24 horas en 50-89 %, que aún excede 200 mg por 24 horas, además de los criterios anteriores, de estar presentes en la línea de referencia, reducción de 25-49 % en tamaño de plasmacitomas de tejido suave también se requiere, sin aumento en tamaño o número de lesiones de huesos líticas (desarrolladas por fractura de compresión no excluye respuesta).

30

Sin embargo, una respuesta aunque no formalmente clasificada también incluye una reducción de al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 % o el 50 % en niveles de FLC en suero. Esto es en particular significativo en casos en donde la proteína M no puede medirse.

35

La expresión **enfermedad estable** (SD = Stable Disease) se refiere en el contexto de enfermedades plasmoproliferativas de la presente invención, a no cumplir los criterios para CR, VGPR, PR o enfermedad progresiva mientras que la expresión **enfermedad progresiva** (PD = Progressive Disease) se refiere al aumento del 25 % desde el valor de respuesta más bajo en cualquiera uno o más de los siguientes:

40

- Componente M en suero (aumento absoluto debe ser $\geq 0,5$ g/100 ml) y/o
- Componente M en orina (aumento absoluto debe ser ≥ 200 mg durante 24 horas) y/o
- Solo en pacientes sin niveles de proteína M medibles en suero y orina; la diferencia entre niveles FLC involucrados y no involucrados (aumento absoluto debe ser > 100 mg/l)
- 45 - Porcentaje de células plasmáticas en médula ósea (porcentaje absoluto debe ser ≥ 10 %)
- Desarrollo definido de nuevas lesiones de hueso o plasmacitomas de tejido suave o aumento definido en el tamaño de lesiones en hueso existentes o plasmacitomas de tejido suave.
- Desarrollo de hipercalcemia (calcio de suero corregido >11,5 mg/100 ml) que puede ser atribuido solamente al trastorno proliferativo de células plasmáticas.

50

La expresión mieloma con relapso se refiere aquí a una forma de MM activa en un sujeto, en donde el sujeto se sometió al menos a un régimen de tratamiento previo y que no cumple con los criterios para mieloma de relapso/refractario.

55

La expresión mieloma refractario en general se refiere a un estado de la enfermedad cuando el número de células plasmáticas continúa incrementándose aun cuando se proporciona tratamiento, esto es la enfermedad al tiempo de evaluación ha demostrado independientemente del régimen de tratamiento administrado.

60

La expresión mieloma de relapso/refractario se refiere aquí al relapso de enfermedad mientras que en terapia de rescate, o progresión dentro de 60 días de la terapia más reciente.

La expresión fenotipo refractario incluye cualquier tipo de mieloma refractario, esto es mieloma refractario y de relapso/refractario.

65

La expresión mieloma de relapso o refractario cubre mieloma de relapso refractario y de relapso/refractario.

Un tumor o una célula diana de CD138 se dice que es refractario a, por ejemplo una terapia/tratamiento si la célula diana CD138 continúa dividiéndose y/o el tumor continúa creciendo a la misma velocidad durante esta terapia/terapia como sin esta terapia/tratamiento.

- 5 El retraso del crecimiento de tumor se refiere a un crecimiento de tumor que se retrasa respecto a un crecimiento de tumor regular sin tratamiento.

Estasis de tumor se refiere a un estado en el cual no hay mayor crecimiento en el tamaño del tumor.

- 10 Remisión se refiere a una disminución en tamaño del tumor (remisión parcial), incluyendo la erradicación completa del tumor y ausencia de recrecimiento (remisión completa).

Terapia de hormonas incluye una terapia con una hormona. La terapia hormonal de cáncer se emplea para combatir a células de cáncer. Se emplea una terapia de hormonas, por ejemplo en el contexto de carcinoma mamario o

- 15 cáncer de próstata e incluye la administración de estrógeno y progesterona o sus derivados.

La quimioterapia es el tratamiento de células cancerosas con un fármaco antineoplásico tal como un taxano o con una combinación de dichos fármacos en un régimen de tratamiento convencionalizado.

- 20 La terapia de mantenimiento es una terapia que sigue un tratamiento previo y se dirige a mantener el estado que se obtiene cuando se completa el tratamiento primario. Por ejemplo, si el tratamiento previo resulta en una respuesta parcial, la terapia de mantenimiento se diseña para mantener respuesta parcial.

- 25 En el estudio clínico discutido con más detalle a continuación, los sujetos han sido tratados con al menos un inmunomodulador y una terapia inhibidora de proteasoma, que han fallado antes de entrar al estudio. La enfermedad se consideró refractaria a tratamiento si el sujeto experimenta enfermedad progresiva (PD) en su régimen previo.

- 30 La expresión "progresión a", por ejemplo "MM activa" en relación a pacientes con SMM se refiere en el contexto de la presente invención, a evidencia de progresión con base en los criterios del grupo de trabajo de mieloma internacional (IMWG = International Myeloma Working Group) para la enfermedad progresiva en MM en cualquiera uno o más de los siguientes que se siente relacionados al trastorno proliferativo de células plasmáticas clonales subyacentes, desarrollo de nuevos plasmacitomas de tejido suave o lesiones de hueso, hipercalcemia (>11 mg/100 ml), disminución en hemoglobina de ≥ 2 g/100 ml, y nivel de creatinina en suero ≥ 2 mg/100 ml. (Kyle & Rajkumar, 2009).

- 35 Supervivencia libre de progreso es la duración desde el inicio de un tratamiento a progreso de enfermedad o muerte (independientemente de la causa de la muerte), lo que suceda primero. Cuando se hace una referencia a "supervivencia libre de progreso" sin una referencia a periodo de tiempo, falta de progreso de más de tres meses está implicada.

- 40 La patogénesis de mieloma múltiple involucra enlace de células de mieloma, mediante moléculas de adhesión de superficie celular, a células de estroma de médula ósea (BMSC = Bone Marrow Stroma Cells) así como la matriz extracelular (ECM = Extracellular Matrix). Este enlace activa, y de esta manera puede hacerse finalmente responsable por crecimiento de células de mieloma múltiple, resistencia a fármaco, inmigración de células de MM en
- 45 el medio de médula ósea (Munshi et al. 2008). En particular, la adhesión de células de mieloma múltiple a ECM mediante syndecan-1 (CD138) a colágeno tipo I, induce la expresión de metaloproteinasas de matriz 1, de esta manera promoviendo la resorción de huesos e invasión de tumor (Hideshima et al. 2007). Interacciones entre células de mieloma múltiple y el microambiente de médula ósea resulta en activación de una cascada pletotrópica proliferativa y antiapoptótica.

- 50 Para pacientes de mieloma múltiple, pero también para pacientes que sufren de otras enfermedades asociadas con dolores óseos, existe una cantidad de tratamientos de soporte para tratar este y otros síntomas. Medicamentos apropiados incluyen bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato, ácido zoledrónico), que pueden frenar el daño a los huesos. También se ha demostrado que estos agentes son capaces de reducir lesiones de huesos osteolíticas y
- 55 evitar fracturas (Ludwig et al., 2007). Primordialmente se suministran a través de una vena para disminuir el riesgo de complicaciones de huesos como fracturas, y para reducir los niveles de calcio en la sangre anormalmente altos (Hipercalcemia). Los datos sugieren que bisfosfonatos reducen el dolor de huesos asociado a MM. Los pacientes también pueden someterse a cirugía si sus huesos son débiles o se rompen.

- 60 En una realización, los inmunoconjugados reducen, en particular reducen a un nivel aceptable, dolores de huesos y/o complicaciones de huesos, tales como osteonecrosis. Una reducción a un nivel aceptable involucra en particular la capacidad para interrumpir la administración de un medicamento que alivia estos dolores o se dirige a reducir estas complicaciones de huesos. Los bisfosfonatos tales como pamidronato, ácido zoledrónico y clodronato, se administran comúnmente para aliviar complicaciones de huesos, tales como osteonecrosis en pacientes MM y de
- 65 esta manera para aliviar dolores de huesos asociados con dichas complicaciones. Bisfosfonatos comunes incluyen para administración oral FOSOMAX, BONIVA, ACTONEL, DIDRONEL y SKELID, para administración intravenosa,

BONEFOS, AREDIA y ZOMETA.

5 Siguiendo la migración de células de mieloma múltiple al compartimento estromal de médula ósea, la adhesión entre las células de mieloma múltiple y BMSC regula por aumento muchas citoquinas como interleucina-6 (IL-6) y factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) que tienen actividades promotoras de crecimiento de tumor y angiogénicas (Hideshima et al. 2007). Las cascadas de señalización iniciadas por estas citoquinas eventualmente resultan en resistencia de células MM a terapéutica convencional (Anderson et al. 2000; Hideshima et al. 2006).

10 En el compartimento hematopoyético humano normal, la expresión de CD138 se restringe a células plasmáticas (Wijdenes, 1996; Chilosi, 1999) y CD138 no se expresa en linfocitos de sangre periférica, monocitos, granulocitos y glóbulos rojos. En particular, células progenitoras y madre CD34⁺ no expresan CD138 y mAb anti-CD138 no afectan el número de unidades formadoras de colonia en los cultivos de células madre hematopoyéticas (Wijdenes, 1996). En compartimentos no hematopoyéticos, CD138 se expresa primordialmente en epitelios simples y estratificados dentro del pulmón, hígado, piel, riñones e intestinos. Sólo se vio una débil tinción en células endoteliales (Bernfield, 1992; Vooijs, 1996). Se ha informado que CD138 existe en formas polimórficas en células de linfoma humano (Gattei, 1999). Tejido epitelial CD138 del tracto gastrointestinal, piel, y ojos son los tejidos no-diana que son más tendientes a ser dirigidos por inmunoconjugados de la presente invención resultando en toxicidades.

20 Anticuerpos monoclonales B-B4, BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2 en particular B-B4 se han informado que son específicos a CD138. De aquellos B-B4, 1D4 y MI15 reconocen tanto la molécula intacta como la proteína núcleo de CD138 y se mostró que reconocen cualquiera de los mismos o epítomos cercanamente relacionados (Gattei, 1999). Estudios previos informaron que B-B4 no reconoce CD138 soluble, pero sólo CD138 en la forma ligada a membrana (Wijdenes, 2002).

25 El anticuerpo anti-CD138 inicial se desarrolló por Diaclone SAS (Besançon, Francia) como el Mab B-B4 parental murino, generado por inmunización con la línea celular de mieloma múltiple humano U266, utilizando tecnología de hibridoma estándar (Clement, 1995; Wijdenes, 1996). B-B4 liga a un epítipo lineal entre los restos 90-93 de la proteína núcleo en syndecan-1 humano (CD138) (Wijdenes, 1996; Dore, 1998). Consistente con el patrón de expresión de CD138, B-B4 se muestra que reacciona fuertemente con la línea celular de plasma RPMI8226, pero no reacciona con células endoteliales. También consistente con el patrón de expresión de CD138, B-B4 también reacciona con líneas celulares epiteliales A431 (derivadas de queratinocito) y HepG2 (derivado de hepatocito). Una inmunotoxina B-B4-saporina también fue altamente reactiva hacia la línea celular de plasma RPMI8226, de hecho considerablemente más tóxica que la saporina libre. Sin embargo, de las dos líneas celulares epiteliales probadas, la B-B4-saporina muestra sólo toxicidad hacia la línea celular A431, aunque en un ensayo clonogénico B-B4-saporina no mostró efecto inhibitorio en excrecencia de células A431 (Vooijs, 1996). Otros investigadores informaron la falta de especificidad de antígenos asociados con MM contra tumores (Couturier, 1999).

40 B-B4 enlazado covalentemente con el maitansinoide DM1 mostró citotoxicidad selectiva en líneas celulares y células de mieloma múltiple, así como actividad anticáncer en modelos de xenoinjerto de mieloma múltiple humano en ratones SCID (Tassone, 2004).

45 La presente invención utiliza la expresión célula de tumor para incluir células de cáncer así como células precancerosas que pueden o no formar parte de un tumor sólido. Las células de tumor preferidas a tratar son células de malignidades hematopoyéticas.

50 Un tumor sólido de acuerdo con la presente invención es una masa anormal de tejido que habitualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Un tumor sólido de acuerdo con la presente invención comprende células de tumor diana que expresan CD138 y de esta manera un tumor sólido maligno. Diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas, y linfomas. Malignidades hematopoyéticas en general no forman tumores sólidos. Carcinoma mamario y carcinoma de próstata son dos ejemplos de tumores sólidos malignos.

55 Un **agente dirigido** de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse con una molécula expresada por una célula diana e incluye péptidos. En particular, agentes dirigidos de acuerdo con la presente invención incluyen anticuerpos dirigidos y moléculas no dirigidas a inmunoglobulina, que pueden basarse en proteínas sin inmunoglobulina incluyendo pero no limitadas a moléculas AFFILIN®, ANTICALINS® y AFFIBODIES®. Moléculas no dirigidas a inmunoglobulina también incluyen moléculas no dirigidas peptídicas tales como oligonucleótidos dirigidos de ADN y ARN (aptámeros), pero también ligandos fisiológicos, en particular ligandos del antígeno en cuestión tal como CD138.

60 Un **anticuerpo dirigido** de acuerdo con la presente invención es o se basa en un anticuerpo natural o se produce en forma sintética o por ingeniería genética y liga a un antígeno en una célula o células (célula o células dirigidas) de interés. Un anticuerpo dirigido de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo dirigido puede someterse a ingeniería por ejemplo para mejorar su afinidad a las células diana (Ross, 2003) o disminuir su inmunogenicidad. El anticuerpo dirigido puede ligarse a una formulación liposómica incluyendo

moléculas efectoras (Carter, 2001). Un fragmento de anticuerpo que comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de enlace de antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv pero también diacuerpos; anticuerpos de dominio (dAb) (Ward, 1989; patente de EE.UU. 6.005.079); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. En un anticuerpo de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) las cadenas pesadas y ligeras (VH y VL) pueden enlazarse por un enlazador aminoácido corto que tiene por ejemplo la secuencia (glicina₄serina)_n, que tiene suficiente flexibilidad para permitir que los dos dominios ensamblen una cavidad de enlace de antígeno funcional. La adición de diversas secuencias de señal puede permitir una dirección más precisa del anticuerpo dirigido. La adición de la región constante de cadena ligera (CL) puede permitir dimerización mediante enlaces disulfuro, dando incrementada estabilidad y avidéz. Regiones variables para construir scFv pueden, si un mAb contra un objetivo de interés está disponible, ser obtenidas por RT-PCR que clona las regiones variables de ARNm que se extrae del hibridoma precursor. En forma alterna, scFv puede generarse de novo por tecnología de expresión en fago (Smith, 2001). Como se emplea aquí, el término "fragmento funcional" cuando se emplea con referencia a un anticuerpo dirigido, se pretende que se refiera a una porción del anticuerpo dirigido que es capaz de ligar específicamente a un antígeno que se enlaza específicamente por el anticuerpo al que se hace referencia. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede por ejemplo tener al menos un brazo que es reactivo contra un tejido diana y un brazo que es reactivo contra una porción enlazadora (Publicación de Patente de EE.UU. 20020006379). Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención también puede ligar a más de un antígeno en una célula diana (Carter, 2001). Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser modificado por ejemplo al introducir restos cisteína para introducir grupos tiol (Olafsen, 2004).

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

Anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias derivadas de un anticuerpo humano y de un anticuerpo no humano y también están dentro del alcance de la presente invención. Métodos convenientes para humanizar anticuerpos incluyen injerto de CDR (injerto de región de determinación de complementariedad) (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de EE.UU. 5.530.101; y 5.585.089), restauración con carillas o prótesis de recubrimiento (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 1991; Studnicka et al., 1994; Roguska et al., 1994), intercambio de cadenas (Patente de EE.UU. 5.565.332) y Delmmunosation™ (Biovation, LTD). En injerto de CDR, las regiones determinantes de complementariedad de ratón (CDR) por ejemplo de mAb B-B4 se injertan en estructuras variables humanas, que después se unen a regiones constantes humanas, para crear un anticuerpo B-B4 humano (hB-B4). Varios anticuerpos humanizados por injerto de CDR ahora están en uso clínico, incluyendo MYLOTARG (Sievers et al., 2001) y HECEPTIN (Pegram et al, 1998).

La tecnología de prótesis de recubrimiento utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no-CDR de regiones variables de anticuerpo para semejar las superficies de anticuerpos conocidos del hospedero diana. Estrategias y métodos para recubrimiento de anticuerpos, y otros métodos para reducir inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un hospedero diferente, se describen por ejemplo en la Patente de EE.UU. 5.639.641. Anticuerpos humanos pueden elaborarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de expresión en fago. Ver también las Patentes de EE.UU. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Los anticuerpos dirigidos que se han sometido a cualquier modificación no natural tal como anticuerpos de ratón/humano quiméricos o anticuerpos de mono/humano quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos que se diseñaron por ejemplo para mejorar su afinidad a las células diana o disminuir su inmunogenicidad pero también a fragmentos de anticuerpo en particular fragmentos funcionales de estos anticuerpos dirigidos que se han sometido a cualquier modificación no natural, diacuerpos; anticuerpos de dominio; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla donde, y anticuerpos multiespecíficos aquí se denominan anticuerpos dirigidos de ingeniería.

Los anticuerpos quimerizados, mantienen la región de enlace de anticuerpo (ABR o región Fab) del anticuerpo no humano, por ejemplo el anticuerpo murino donde se basan, mientras que cualesquiera regiones constantes pueden proporcionarse por ejemplo por un anticuerpo humano. En general, la quimerización y/o el intercambio de regiones constantes de un anticuerpo no afectarán la afinidad de un anticuerpo debido a que las regiones del anticuerpo que contribuyen a enlace de antígeno no se afectan por este intercambio. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo de ingeniería, en particular quimerizado de la presente invención, puede tener una superior afinidad de enlace (como se expresa por valores K_D) que el anticuerpo no humano respectivo donde se basa. En particular, el anticuerpo nBT062 y anticuerpos basados en él, pueden tener superior afinidad de anticuerpo que el B-B4 murino.

En otra realización preferida de la presente invención, inmunoconjugados que comprenden aquellos anticuerpos de ingeniería/quimerizados también exhiben esta superior afinidad de anticuerpo. Estos inmunoconjugados también

pueden exhibir en ciertas realizaciones, otras propiedades ventajosas, tales como una superior reducción de carga de tumor que sus contrapartes que contienen B-B4. En una realización preferida, los anticuerpos dirigidos de ingeniería en particular quimerizados exhiben afinidades de enlace que se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) menores a 1,6, menores a 1,5 o aproximadamente o menores a 1,4, mientras que sus contrapartes murinas se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o mayor que 1,6. Inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos pueden caracterizarse por constantes de disociación K_D (nM) de menos de 2,6, menos que 2,5, menos que 2,4, menos que 2,3, menos que 2,2, menos que 2,1, menos que 2,0, menos que o aproximadamente 1,9 se prefieren, mientras que inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos contraparte murinos pueden caracterizarse por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o mayores a 2,6 (compare la Tabla 12, Materiales y Métodos).

La molécula de anticuerpo básica es una estructura bifuncional en donde las regiones variables ligan antígeno mientras que las regiones constantes restantes pueden producir respuestas independientes de antígeno. Las clases mayores de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, se determinan por las regiones constantes. Estas clases además pueden dividirse en subclases (isotipos). Por ejemplo, la clase IgG tiene cuatro isotipos, es decir, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 que se determinan por las regiones constantes. De las diversas clases de anticuerpos humanos, sólo IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanos se conoce que activan efectivamente el sistema de complemento. Mientras que las regiones constantes no forman los sitios de enlace de antígeno, la estructura o arreglo de las regiones constantes y región bisagra pueden conferir flexibilidad de segmento en la molécula lo que le permite enlazar con el antígeno.

Diferentes isotipos IgG pueden ligar a receptores Fc en células tales como monocitos, células B y células NK, de esta manera activando las células para liberar citoquinas. Diferentes isotipos también pueden activar complemento, resultando en inflamación local o sistémica. En particular; los diferentes isotipos IgG pueden ligar Fc γ R a diferentes grados. Fc γ Rs son un grupo de glucoproteínas de superficie que pertenecen a la súper-familia Ig y se expresan primordialmente en leucocitos. Las glucoproteínas Fc γ R se dividen en tres clases designadas Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Mientras que IgG1, IgG2 e IgG3 ligan fuertemente a una variedad de estas clases de glucoproteínas Fc γ R, IgG4 exhiben un enlace mucho más débil. En particular, IgG4 es un enlazador intermedio Fc γ RI, que resulta en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC = Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) relativamente baja o incluso nula, y no ligan a Fc γ RIIIA o Fc γ RIIA. IgG4 también es un enlazador débil de Fc γ RIIB, que es un receptor inhibitorio. Además, IgG4 media sólo en forma débil o nula la fijación de complemento y débil o nula citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En el contexto de la presente invención, IgG4 puede emplearse específicamente para evitar el dirigir mediado por Fc de FcR hepático ya que no exhibe interacción con FcR γ II en células endoteliales sinusoidales de hígado (LSECs = Liver Sinusoidal Endothelial Cells), ninguna o débil interacción con FcR γ I-III en células Kupffer (macrófagos) y ninguna interacción con FcR γ III en células NK hepáticas. Ciertas mutaciones que reducen adicionalmente cualquier CDC también son parte de la presente invención. Por ejemplo, los restos IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 se mostró que reducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC = Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) y CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Una de más mutaciones que estabilizan el anticuerpo también es parte de la presente invención (también referido aquí como "mutaciones estabilizantes"). Estas mutaciones incluyen en particular mutaciones de leucina-a-ácido glutámico en la región CH2 de IgG4 e intercambio serina-a-prolina en el núcleo bisagra IgG4. Estas mutaciones disminuyen, en ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de medias moléculas a menos que 10 %, a menos que 5 % y preferentemente menor que 2 % o 1 %. Aún más, la vida media in vivo de anticuerpos estabilizados puede aumentarse varios días incluyendo 1, 2, 3, 4 o más de 5 días (Schuurman, 1999).

Cuando la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido de ingeniería que confiere propiedades de isotipo IgG4, esto significa que el anticuerpo dirigido de ingeniería muestra afinidad significativamente reducida a células que expresan receptor Fc en comparación con la afinidad de anticuerpos del isotipo IgG1. Estas propiedades preferentemente son conferidas por una región de anticuerpo adicional, lo que es distinto de ABR, en donde la región de anticuerpo adicional en forma total o parcial es de un anticuerpo humano. El resultado es una carencia equitativamente reducida (mayor que 90 % respecto a su contraparte de isotipo IgG1) o total de un potencial para inducir CDC o ADCC en comparación con el potencial para inducir CDC o ADCC habitualmente observado con anticuerpos de isotipo IgG1. Esta propiedad puede ser medida en ensayos basados en células al emplear el anticuerpo dirigido de ingeniería en su forma no conjugada. CDC y ADCC pueden medirse por diferentes métodos tales como el descrito en Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993) o el Ensayo de Toxicidad Celular Guava. El beneficio total de inmunoconjugados que comprenden al menos parte de un anticuerpo dirigido de ingeniería que confiere propiedades de isotipo IgG4 es una mejora de la especificidad de enlace y una toxicidad reducida. También, la afinidad reducida resultante a receptores Fc mejora el diana específico de antígeno de células de tumor lo que lleva a reducida toxicidad contra células negativas CD138.

Los agentes dirigidos, incluyendo anticuerpos dirigidos desvelados en el presente documento también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de enlace a un antígeno, en particular a CD138. Afinidades de enlace preferidas de agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) menores a 1,6, menos a 1,5 o aproximadamente o menores a 1,4. Para inmunoconjugados que comprenden los agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos con constantes de disociación K_D (nM) menores a 1,6, menores a 1,5 o menores a 2,5, menores a 2,4, menores a 2,3, menores a 2,2, menores a 2,1, menores a 2,0,

menores que o aproximadamente 1,9, se prefieren.

Una región de unión a antígeno (ABR) de acuerdo con la presente invención variará con base en el tipo de anticuerpo dirigido o anticuerpo dirigido de ingeniería empleado. En un anticuerpo de origen natural y en la mayoría de los anticuerpos quiméricos y humanizados, la región de unión a antígeno se constituye por una cadena ligera y los dos primeros dominios de una cadena pesada. Sin embargo, en anticuerpo de cadena pesada carente de cadenas ligeras, la región de unión a antígeno será constituida por ejemplo de los primeros dos dominios de la cadena pesada solamente, mientras que en anticuerpos de cadena sencilla (ScFv), que combinan en una sola cadena polipéptido los dominios variables de cadena ligera y pesada de una molécula de anticuerpo, ABR se proporciona por sólo una molécula polipéptido. Fragmentos FAB habitualmente se obtienen por digestión con papaína y tienen una cadena ligera y parte de una cadena pesada y de esta manera comprenden una ABR con sólo un sitio de combinación de antígeno. Por otra parte, diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos regiones de enlace de antígeno. En el contexto de la presente invención, sin embargo una región de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido o anticuerpo dirigido de ingeniería es cualquier región que determina en forma primordial la **especificidad de enlace** del anticuerpo dirigido o anticuerpo dirigido de ingeniería.

Si la ABR u otra región de anticuerpo dirigido se dice que es "de un cierto anticuerpo", por ejemplo un anticuerpo humano o no humano, esto significa en el contexto de la presente invención que ABR ya es idéntico a una ABR de origen natural correspondiente o se basa en ella. Una ABR se basa en una ABR de origen natural si tiene la especificidad de enlace de la ABR de origen natural. Sin embargo, dicha ABR puede comprender, por ejemplo mutaciones punto, adiciones, deleciones o modificación post traducción tales como glicosilación. Esta ABR en particular puede tener más que 70 %, más que 80 %, más que 90 %, preferentemente más que 95 %, más que 98 % o más que 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la ABR de origen natural.

nBT062 (véase también la Figura 1) es un IgG4 mAb quimérico humano murino, es decir una versión quimerizada de B-B4. Esta versión quimerizada de B-B4 se creó para reducir la respuesta humoral de anticuerpos humanos anti ratón (HAMA = Human Anti-Mouse Antibody) mientras que mantiene la funcionalidad de la región de enlace de anticuerpo de B-B4 para CD138. De manera sorprendente, los resultados obtenidos utilizando un inmunoconjugado que comprende este anticuerpo dirigido de ingeniería fueron mucho más homogéneos (la variancia en los resultados se redujo). El protocolo para producir nBT062 se especifica a continuación. Células de ovario de hámster chino que expresan nBT062 se han depositado con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig en diciembre 11, 2007. El número de identificación es DSM ACC2875. Un anticuerpo quimérico específico CD138 basado en B-B4 se refiere genéricamente aquí como c-B-B4.

La secuencia de aminoácidos tanto para las cadenas pesadas como las ligeras se ha pronosticado de la traducción de la secuencia de nucleótidos para nBT062. La secuencia de aminoácidos pronosticadas para cadena pesada y cadena ligera se presentan en **Tabla 4**. Regiones variables pronosticadas están con negritas, CDR pronosticadas están subrayadas.

Tabla 4. Secuencia de Aminoácidos Pronosticada para nBT062

- secuencia pronosticada de cadena pesada nBT062 (SEQ ID NO:1):

1	<u>QVQLQSGSE</u> LMPGASVKI SKCATGYTFS <u>NYWIEWVKQR</u> PGHGLEWIGE
51	<u>ILPGTGRTIY</u> <u>NEKFKGKATF</u> TADISSNTVQ <u>MQLSSLTSED</u> <u>SAVYYCARRD</u>
101	<u>YYGNFYAMD</u> <u>YWGQTSVTV</u> SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151	VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201	KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251	DTLMISRTPV VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS
301	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351	YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVVL
401	DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG (K)

La lisina C-terminal tiende a cortar y puede estar presente debido a recorte incompleto en una cierta proporción. (K) en paréntesis no es parte de SEQ ID NO:1.

45 - Secuencia pronosticada de cadena ligera nBT062 (SEQ ID NO:2):

1 **DIQMTQSTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIN NYLNWYQQKP DGTVELLIYY**
 51 **TSTLQSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEP EDIGTYQCQQ YSKLPRTFGG**
 101 **GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV**
 151 **DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG**
 201 **LSSPVTKSFN RGEC**

Tabla 5. Muestra una comparación de las definiciones de CDR generales de Kabat y Chothia y las CDR pronosticadas para nBT062.

5

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

10

También pueden emplearse anticuerpos totalmente humanos. Esos anticuerpos pueden seleccionarse por el enfoque de expresión en fago, en donde CD138 o su determinante de antihigiénico se emplea para ligar selectivamente expresión en fago, por ejemplo regiones variables B-B4 (véase, Krebs, 2001). Éste enfoque se acopla ventajosamente con una técnica de maduración de afinidad para mejorar la afinidad del anticuerpo. Todos los anticuerpos aquí referidos son anticuerpos aislados (véase la publicación de patente de EE.UU. 20090175863).

15

En una realización, el anticuerpo dirigido en su forma no conjugada es internalizado de manera moderada o deficiente. La internalización moderada constituye aproximadamente 30 % a aproximadamente 75 % de internalización de anticuerpo total, deficiente internalización constituye aproximadamente 0.01 % hasta aproximadamente 30 % de internalización después de 3 horas de incubación a 37 C. En otra realización preferida, el anticuerpo dirigido enlaza a CD138, por ejemplo anticuerpos B-B4, BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2 en particular B-B4. Células de hibridoma que se generaron al hibridar células de mieloma SP02/0 con células de bazo de ratones Balb/c se han depositado con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig en diciembre 11, 2007. El número de identificación de estas células de hibridoma que expresan B-B4 es DSM ACC2874. En otra realización, el anticuerpo dirigido no liga sustancialmente CD138 no expresado en superficie celular. Cuando, en el contexto de la presente invención el nombre de un anticuerpo específico se combina con la expresión "anticuerpo dirigido" tal como "anticuerpo dirigido nBT062", esto significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de enlace del anticuerpo nBT062. Si se dice que un anticuerpo dirigido está "basado en" un anticuerpo especificado, esto significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de enlace de este anticuerpo, pero puede tomar cualquier forma consistente con la descripción anterior de un anticuerpo dirigido. Cuando, en el contexto de la presente invención el nombre de un antígeno específico se combina con la expresión "anticuerpo dirigido" tal como "anticuerpo dirigido CD138", esto significa que este anticuerpo dirigido tiene especificidad de enlace para CD138. Sí, en el contexto de la presente invención, por ejemplo un anticuerpo dirigido se dice que hace algo "selectivamente" tal como "dirigido selectivamente a superficie celular que expresa CD138" o que es "selectivo" para algo, esto significa que hay una selectividad significativa (es decir una superior afinidad hacia células positivas CD138 en comparación con células negativas CD138), para que en el caso del ejemplo que se proporciona, CD138 expresado en superficie celular en comparación con cualquier otro antígeno expresado en superficie celular. Efectos secundarios adversos en un ambiente determinado pueden reducirse sustancialmente o incluso evitarse debido a esta selectividad.

35

"Moléculas dirigidas distintas de inmunoglobulina" de acuerdo con la presente invención, incluyen moléculas

dirigidas derivadas de proteínas no inmunoglobulina así como moléculas dirigidas no peptídicas. Pequeñas proteínas sin inmunoglobulina que se incluyen en esta definición se diseñan para tener afinidades específicas hacia, en particular CD138 expresada en superficie. Estas proteínas pequeñas sin inmunoglobulina incluyen moléculas de ingeniería basadas en andamio tales como las moléculas AFFILIN que tienen un peso molecular relativamente bajo tal como entre 10 kDa y 20 kDa. Andamios o estructuras apropiadas incluyen por ejemplo gama cristalina. Aquellas moléculas tienen en su estado natural actividad de enlace no específica hacia las moléculas diana. Por ingeniería de la superficie de proteína a través de aleatorización definida localmente de aminoácidos expuestos a solvente, se crean sitios de enlace completamente nuevos. Proteínas sin enlace anteriores de esta manera se transforman en proteínas de enlace específicas. Éstas moléculas pueden diseñarse específicamente para ligar una diana, tal como CD138, y permitir suministró específico de una o más moléculas efectoras (véase scil Proteins GmbH en www.scilproteins.com, 2004). Otro tipo de moléculas dirigidas sin inmunoglobulina se derivan de lipocalinas, e incluyen por ejemplo ANTICALINS, que semejan en estructura algo a las inmunoglobulinas. Sin embargo, las lipocalinas están compuestas de una sola cadena polipéptido con 160 a 180 restos aminoácido. La cavidad de enlace de las lipocalinas puede reconfigurarse para reconocer una molécula de interés con altas afinidad y especificidad (véase, por ejemplo Beste et al., 1999). Receptores bacterianos artificiales tales como aquellos comercializados bajo la marca Affibody® (Affibody AB) también están dentro del alcance de la presente invención. Estas moléculas receptoras bacterianas artificiales son pequeñas proteínas simples y pueden estar compuestas por un haz de tres hélices con base en el andamio de uno de los dominios de enlace IgG de la Proteína A (*Staphylococcus aureus*). Estas moléculas tienen propiedades de enlace similares a muchas inmunoglobulinas pero son sustancialmente más pequeñas, tienen un peso molecular que a menudo no excede 10kDa y también son comparativamente estables. Moléculas receptoras bacterianas artificiales convenientes son por ejemplo descritas en las Patentes de EE.UU. 5.831.012; 6.534.628 y 6.740.734.

Otras "moléculas dirigidas distintas de inmunoglobulina" son ligandos fisiológicos del antígeno en cuestión. Ligandos fisiológicos de CD138 incluyen por ejemplo pero no están limitados a ADAMTS4 (agreganasa-1), antitrombina-3, bFGF, catepsina G, CCL5 (RANTES), CCL7, CCL11, CCL17, CD44, colágenos (colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, colágeno tipo 3, colágeno tipo 4, colágeno tipo 5, colágeno tipo 6), CXCL1, elastasa, gp120, factor de crecimiento de hepatocitos [HGF = Hepatocyte Growth Factor], laminina-1, laminina-2, laminina-5, midkina, MMP-7, neutrófilo elastasa y pleyotrofina (HBNF, HBGF-8). Moléculas dirigidas no peptídicas incluyen pero no están limitadas a oligonucleótidos de ADN y ARN que ligan a CD138 (aptámeros).

Una "molécula efectora" de acuerdo con la presente invención es una molécula o un derivado o su análogo que se enlaza con un agente dirigido, en particular un anticuerpo dirigido y/o un anticuerpo dirigido de ingeniería, y que ejerce un efecto deseado, por ejemplo apoptosis u otro tipo de muerte celular, o un freno del ciclo celular continuo en la o las células dirigidas. Moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas que pueden ejercer los efectos deseados en una célula objetivo e incluyen pero no están limitados a fármacos citotóxicos, incluyendo fármacos citotóxicos de bajo peso molecular (masa molecular menor a 1500 Da, preferentemente menor a 1400, menor a 1200, menor a 1000, menor a 800, menor a 700, menor a 600, menor a 500, menor a 300 pero en general mayor que 120 Da). Éstos fármacos citotóxicos de acuerdo con la presente invención en general son fármacos citotóxicos biológicos no proteicos y contienen o inducen, ante administración, la producción de otro fármaco citotóxico de al menos 5 átomos de C, 10 átomos de C, preferentemente más de 12 átomos de C, a menudo mayor que 20 átomos de C y en ocasiones mayor que 30, 40 o 50 átomos de C Y en general al menos una estructura de anillo, tal como un anillo benceno que a menudo está sustituido. Sin embargo, a menudo estructuras de anillo de interconexión son parte de estas moléculas. Estos fármacos citotóxicos biológicos no proteicos pueden intercalarse en ADN (intercaladores de ADN) o alquilación de ADN, inhibir formación de microtúbulos son inhibidores de mitosis. Los inhibidores de enzimas implicadas en la integridad estructural de ADN, tales como histona de acetilato o inhibidores de enzimas que de otra forma son vitales a una célula y provocan ruptura del metabolismo celular. Los efectores también puede categorizarse como radionúclidos, modificadores de respuesta biológica, agentes formadores de poros, ribonucleasas, proteínas de cascadas de señalización apoptótica con actividades que inducen apoptosis, oligonucleótidos antisentido, agentes antimetástasis, sustancias antioxidativas, anticuerpos o citoquinas, así como sus derivados funcionales o análogos/fragmentos.

En una realización preferida, la molécula efectora aumenta el suministro de efector interno del inmunoconjugado, en particular cuando la forma natural del anticuerpo donde se basa el anticuerpo dirigido del inmunoconjugado es deficientemente internalizable. En otra realización preferida, el efector en su forma nativa no es selectivo. En ciertas realizaciones, el efector tiene alta toxicidad no selectiva, incluyendo toxicidad sistémica, cuando ésta en su forma nativa. La "forma nativa" de una molécula efectora de la presente invención es una molécula efectora antes de enlazarse al agente dirigido para formar un inmunoconjugado. En otra realización preferida, la toxicidad no selectiva de la molécula efectora se elimina sustancialmente ante conjugación con el agente dirigido. En otra realización preferida, la molécula efectora provoca, al alcanzar la célula objetivo o diana, muerte o freno del ciclo celular, incluyendo freno de ciclo celular continuo, en la célula diana.

Una molécula efectora de acuerdo con la presente invención incluye pero no está limitada a agentes antineoplásicos, en particular agentes quimioterapéuticos intracelulares que se definen a continuación.

La **Tabla 6** proporciona ejemplos de fármacos citotóxicos de bajo peso molecular que pueden servir como moléculas efectoras.

Efactor	Masa molecular (g/mol [Da])
Doxorubicina	564
Danurubicina	528
Vinblastina	811
Docetaxel	808
Paclitaxel	854
Epotilona B	508
Vorinostat	264
Neocarzinostatina	660
Calicheamicina γ 1	1368
Esperamicina	1342
Metotrexato	454
Componentes de silimarina	482
Masoprocol	302
Ácido aminolevulínico	132
Miltefosina	407
Epigallocatequina galato (EGCG)	459
Psoraleno	186
Melfalan	304

5 Los fármacos citotóxicos de bajo peso molecular (véase anteriormente para peso moleculares) pueden ser preferentemente antimetabólicos, más particularmente agentes que afectan la tubulina, que incluyen inhibidores de polimerización de tubulina tales como maitansinoides, dolastatinas (y derivados tales como auristatina) y criptoficina y fármacos taxoides potentes (taxano) (Payne, 2003). Además se incluye en la definición de pequeño fármaco de alta toxicidad y están otros agentes que interfieren con tubulina tales como epotilonas (por ejemplo ixabepilona) y derivados de colchicina (agentes que interfieren con tubulina se discuten más a continuación).

10 Una molécula efectora que es un maitansinoide, incluye maitansinoides de cualquier origen, incluyendo pero no limitados a maitansinol sintético y análogos y derivados de maitansinol.

15 La maitansina es un producto natural originalmente derivado del arbusto etíope *Maytenus serrata* (Remillard, 1975; Patente de EE.UU. 3.896.111). Éste fármaco inhibe la polimerización de tubulina, resultando en bloqueo mitótico y muerte celular (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). La citotoxicidad de maitansina es de 200-1000 veces superior a la de los fármacos anticáncer en uso clínico que afectan la polimerización de tubulina, tales como Vinca alcaloides o taxol. Sin embargo, pruebas clínicas de maitansina indican que carece de una ventana terapéutica debido a su alta toxicidad sistémica. La maitansina y los maitansinoides son altamente citotóxicos pero su uso clínico en terapia de cáncer se ha limitado enormemente por los severos efectos secundarios sistémicos primordially atribuidos a su deficiente selectividad para tumores. Pruebas clínicas con maitansina muestran serios efectos adversos en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal.

20 Los maitansinoides también se han aislado de otras plantas incluyendo tejido de semillas de *Trewia nudiflora* (Patente de EE.UU. 4.418.064).

25 Ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y C-3 maitansinol ésteres (Patente de EE.UU. 4.151.042).

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

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

DM-1 (N²-deacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) es una molécula efectora preferida en el contexto de la presente invención. DM1 es 3 a 10 veces más citotóxico que maitansina y se ha convertido en un pro-fármaco al ligarlo mediante uno o varios enlaces disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un antígeno asociado a

tumor. Ciertos de estos conjugados (en ocasiones denominados “fármacos activados por tumor” (TAPs = Tumor Activated Prodrugs)) no son citotóxicos en el compartimento sanguíneo, ya que se activan al asociar con las células diana e internalizan, de esta manera liberando el fármaco (Blättler, 2001). Varios conjugados anticuerpo-DM1 se han desarrollado (Payne, 2003), y se han evaluado en pruebas clínicas. Por ejemplo el tratamiento con huC242-DM1 en
 5 pacientes de cáncer colorectal fue bien tolerado, no induce ninguna respuesta inmunodetectable y ha tenido un prolongado tiempo de circulación (Tolcher, 2003).

Otros maitansinoides particularmente preferidos comprenden una cadena lateral que contiene un tiol estéricamente impedido ligado tal como pero no limitado a maitansinoides N²-deacetil- N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también referidos como “DM3” y N²-deacetil- N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también referido como
 10 “DM4”. La síntesis de DM4 se ilustra en las **Figuras 3 y 4** y se describe en otra parte aquí. DM4 difiere de DM1 y DM3 ya que tiene grupos metilo en su αC. Esto resulta en un impedimento estérico cuando DM4 se liga mediante un enlazador en particular, pero no limitado a, un enlazador que comprende un enlace disulfuro, a un agente dirigido tal como nBT062. Una amplia variedad de maitansinoides que contienen un grupo tiol estéricamente impedido (que
 15 posee uno o dos sustituyentes, en particular sustituyentes alquilo, tales como los sustituyentes metilo de DM4) se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. 2004/0235840, publicada en noviembre 25, 2004, que se incorpora aquí en su totalidad por referencia. El impedimento estérico conferido por los grupos alquilo tales como los grupos metilo en el carbono adyacente al átomo de azufre de DM3 y DM4, puede afectar la velocidad de ruptura intracelular del inmunoc conjugado. La unidad alquilo variable por lo tanto afecta potencia, eficacia y
 20 seguridad/toxicidad *in vitro* e *in vivo*.

Como se informa por Goldmahker et al., en la Publicación de Patente de EE.UU. 2006/0233814, tal impedimento induce alquilación (por ejemplo, metilación) del fármaco libre, una vez que el fármaco se libera en su diana. La alquilación puede incrementar la estabilidad del fármaco permitiendo el efecto así denominado de activación inespecífica (bystander). Sin embargo, como apreciará la persona con destreza en la especialidad, otras moléculas efectoras que comprenden sustituyentes tales como grupos alquilo en posiciones que resultan en un impedimento estérico cuando el efector se enlaza a un agente diana mediante un enlazador, son parte de la presente invención (Publicación de Patente de EE.UU. 2004/0235840). Preferentemente, este impedimento induce una modificación química tal como alquilación del fármaco libre para incrementar su estabilidad total, lo que permite al fármaco no
 25 sólo inducir muerte celular o freno de ciclo celular continuo en células de tumor que expresan CD138 sino que opcionalmente también afecta células auxiliares que por ejemplo soportan o protegen el tumor de los fármacos, en particular células del estroma de tumor y la vasculatura de tumor y que generalmente no expresan CD138 para disminuir o perder su función de soporte o protección.

La maitansina se evaluó en pruebas clínicas Fase I y Fase II auspiciadas por el *National Cancer Institute* (NCI) bajo IND n.º 11.857 (presentada a la FDA en septiembre 19, 1975). Ambas respuestas completas y parciales se vieron en pacientes con malignidades hematológicas y respuestas parciales en pacientes con un amplio espectro de tumores sólidos (Blum and Kahlert., 1978, Issell and Crooke, 1978, Chabner et al., 1978, Eagan et al., 1978, Cabanillas et al., 1978). Sin embargo, toxicidades significantes incluyendo náusea, vómito, diarrea, elevaciones de pruebas de función
 30 de hígado, letargia y neuropatía periférica se notaron (véase Maitansina IND n.º 11.857, Annual Report, February, 1984; Blum and Kahlert., 1978, Issell and Crooke, 1978, Chabner et al., 1978). Efectos tóxicos impidieron mayor desarrollo.

En otra realización, las moléculas efectoras pueden representar Taxanos. Los Taxanos son una clase de agentes que interfieren con tubulina comprenden taxanos (Payne 2003). Los taxanos son venenos del husillo mitótico que inhiben la despolimerización de tubulina, resultando en un aumento en la velocidad de estructura de microtúbulos y muerte celular. Los taxanos que están dentro del alcance de la presente invención son por ejemplo descritos en las Patentes de EE.UU. 6.436.931; 6.340.701; 6.706.708 y las Publicaciones de Patente de EE.UU. 20040087649; 20040024049 y 20030004210. Se describen otros taxanos por ejemplo en la Patente de EE.UU. 6.002.023, Patente de EE.UU. 5.998.656, Patente de EE.UU. 5.892.063, Patente de EE.UU. 5.763.477, Patente de EE.UU. 5.705.508, Patente de EE.UU. 5.703.247 y Patente de EE.UU. 5.367.086. Una realización preferida de la presente invención pueden ser Taxanos altamente potentes que contienen grupos tiol o disulfuro. Como la persona con destreza en la técnica apreciará, los taxanos PEGilados tales como aquellos descritos en la Patente de EE.UU. 6.596.757, también están dentro del alcance de la presente invención.
 45
 50

La presente invención incluye moléculas efectoras adicionales que afectan ADN, más particularmente agentes de intercalado tales como antraciclina y derivados (daunorubicina, valrubicina, doxorubicina, aclarubicina, epirubicina, idarubicina, amrubicina, pirarubicina, zorubicina) y antracendionas, tales como sustancias derivadas de *Streptomyces* (actinomicina, mitomicina, bleomicina, aactinomicina) o amsacrina.
 55

Una molécula efectora puede representar agentes alquilantes de ADN más particulares como y más particularmente mostaza de nitrógeno y análogos (por ejemplo Ciclofosfamida, Melfalano, Estramustina), Alquilsulfonatos, Nitrosoureas, Aziridinas, Hidrazinas, Etilen Iminas, y otras sustancias tales como Trenimon y Mitobronitol (un análogo de manitol). En particular, agentes alquilantes de ADN preferidos son análogos de CC-1065 o derivados (Patentes de EE.UU. 5.475.092; 5.585.499; 6.716.821) y duocarmicina.
 60
 65

CC-1065 representa un antibiótico antitumor potente aislado de cultivos de *Streptomyces zelensis* y se ha mostrado que es excepcionalmente citotóxico *in vitro* (Patente de EE.UU. 4.169.888). Dentro del alcance de la presente invención por ejemplo están los análogos CC-1065 o derivados descritos en las Patentes de EE.UU. 5.475.092. 5.585.499 y 5.739.350. Como la persona con destreza en la técnica fácilmente apreciará, análogos de CC-1065 o derivados modificados como se describe en la Patente de EE.UU. 5.846.545 y profármacos de análogos CC-1065 o derivados como se describe por ejemplo en la Patente de EE.UU. 6.756.397, también están dentro del alcance de la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención, análogos y derivados de CC-1065 pueden por ejemplo ser sintetizados como se describe en la Patente de EE.UU. 6.534.660.

Otras moléculas efectoras de alquilación de ADN tales como sustancias basadas en platino se incluyen además (por ejemplo carboplatina, nedaplatina, oxaliplatina, triplatina, satraplatina).

Entre las moléculas efectoras que afectan ADN también se incluyen inhibidores de topoisomerasa I y II tales como sustancias derivadas de Camptoteca (belotecano, topotecano) y Podofilotoxina y derivados (etopósido, tenipósido).

Una subclase adicional de moléculas efectoras que afectan ADN incluye antimetabolitos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato, conocidos como inhibidores de dihidrofolato reductasa) o Aminopterina. También se incluyen metabolitos que interfieren con el metabolismo de purina o pirimidina, en particular inhibidor de adenosina deaminasa (pentostatina), o inhibidor de ribonucleótido reductasa/halogenado (cladribina, clofarabina), tiopurina y tiazofurina. Adicionales antimetabolito incluyen inhibidor de polimerasa de ADN (citarabina), inhibidor de ribonucleótido reductasa (gemcitabina), y agentes hipometilantes (azacitidina, decitabina) e inhibidores de ribonucleótido reductasa. En forma más general se incluyen también sustancias de reticulado de ADN tales como cisplatina.

Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención pueden ser antibióticos antitumorales definidos como moléculas efectoras que dañan o modifican el ADN incluyendo antibióticos de enediina tales como calicheamicina que incluyen por ejemplo gamma 1I, N-acetil calicheamicina y otros derivados de calicheamicina. La calicheamicina liga en una forma específica de secuencia con el surco menor de ADN, se somete a redistribución y expone radicales libres, llevando a ruptura de ADN de doble hebra, resultando en apoptosis y muerte celular. Un ejemplo de una molécula efectora de calicheamicina que puede emplearse en el contexto de la presente invención se describe en la Patente de EE.UU. 5.053.394. Este compuesto se emplea en inmunocombinados con los anticuerpos monoclonales publicados como gemtuzumab, ozogamicina e inotuzumab ozogamicina.

Un subgrupo de enediina comprende las cromoproteínas esperamicina y neocarzinostatina. En particular, trabectedina, que también se categoriza como agente que daña el ADN (antibióticos antitumorales). La trabectedina provoca ruptura de la estructura principal de AND, y puede aislarse de una ascidia (también conocida como ecteinascidina 743 o ET-743) se vende por ZELITA y JOHNSON & JOHNSON bajo la marca YONDELIS.

Otro grupo de moléculas efectoras preferidas son sustancias tales como pero no limitadas a toxinas que afectan el metabolismo celular. En particular inhibidores de enzima tales como pero no limitados a olaprib o más preferido proteasoma (por ejemplo bortezomib) e inhibidores de proteína quinasa o inhibidores de lipoxigenasa tales como masoprocol son parte de la presente invención. También se incluyen antagonistas receptores tales como pero no limitados a antagonista receptor de endotelina A (por ejemplo atrasentano), o esteroides de sexo tales como testolactona, que interfieren con el metabolismo de estrona. Además se incluyen sustancias que interactúan con receptor de estrógeno tales como polifenoles derivados de plantas, por ejemplo pero no sólo isoflavonoides, estilbenos, silimarina, glucósidos fenilpropanoides.

También son adecuadas como moléculas efectoras sustancias que afectan el metabolismo celular, tales como sustancias empleadas para terapia fotodinámica o de radiación incluyendo pero no limitadas a derivados de porfirina, por ejemplo ácido δ -aminolevulínico. Efavoxirax representa un radiosensibilizante, que aumenta los niveles de oxígeno al disminuir la afinidad de oxígeno-hemoglobina. Además incluyen retinoides (de primera, segunda y tercera generación), en particular tretinoína (ATRA), todos ácidos trans retinóicos que se emplean para tratar leucemia promielocítica aguda (APML = Acute Promyelocytic Leukemia) que se vende para esta indicación por ROCHE bajo la marca VESANOID. Los retinoides son una clase de compuestos químicos que están relacionados químicamente con vitamina A, ejerciendo funciones diversas tales como por ejemplo activación de genes de supresión de tumor. En la actualidad, se emplean para tratar cáncer de la piel y trastornos inflamatorios de la piel.

En otra realización preferida, las moléculas efectoras pueden afectar las rutas de señalización tales como pero no limitadas a señalización de calcio. Son ejemplos trióxido de arsénico o cloruro de trimetilestaño, este último es un compuesto de organoestaño altamente tóxico.

La presente invención también incluye moléculas efectoras que afectan los mecanismos de resistencia fármacos que pueden incluir, por ejemplo actividad de resistencia anti-múltiples fármacos (mediante inhibición de P-glucoproteína). Compuestos heteroaromáticos bicíclicos y derivados pueden servir como ejemplos no limitantes.

Otra clase de molécula efectora puede incluir sustancias, o más particularmente proteínas que interfieren con una

ruta de señalización apoptótica, incluyendo, pero no limitadas a, oligonucleótidos antisentido, más particularmente oligodeoxinucleótidos tales como oblimersen (INN, marca genasense; también conocido como augmerosen y oligodeoxinucleótido antisentido bcl-2 G3139), que es un oligodeoxiribonucleótido antisentido actualmente estudiados como un tratamiento posible para varios tipos de cáncer, incluyendo leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B y cáncer de mama. Se ha propuesto que este compuesto pueda exterminar células de cáncer al bloquear la producción de Bcl-2 y al hacerlas más sensibles a quimioterapia. Las clases de sustancias adicionales inductoras de apoptosis adicional que pueden servir como moléculas efectoras, comprende polifenoles de plantas tales como pero no limitados a, silimarinas, que son capaces de interferir con reguladores del ciclo celular y proteínas implicadas en apoptosis.

Las moléculas efectoras también pueden ser proteínas, tales como aquellas de las cascadas de señalización apoptótica con actividades inductoras de la apoptosis, incluyendo, pero no se limitan a, Granzima B, Granzima A, Caspasa-3, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Bid truncada (tBid), Bax y Bak.

Otras moléculas efectoras pueden incluir enzimas tales como, pero no limitadas a, asparaginasa u otras enzimas con actividades antineoplásicas.

Una molécula efectora de fármacos de acuerdo con la presente invención puede ser un fármaco antiprotozoario tal como miltefosina.

En otra realización las moléculas efectoras pueden representar polifenoles vegetales, tales como, pero no limitados a, psoralenos y sus metabolitos hidroxilados.

Los polifenoles vegetales tales como flavonoides, taninos (proantocianidinas), estilbenoides, curcuminoides y ligandos que tienen una de las actividades antitumorales anteriormente mencionadas (por ejemplo, inducción de apoptosis, detención del ciclo celular) o actividad adicional tales como eliminación de radicales libres, actividad quelante de metales, actividad interferente con el receptor de estrógenos, antioxidantes, interferencia con enzimas metabolizantes de fármacos son también posibles moléculas efectoras. Más específicamente, los psoralenos y sus metabolitos hidroxilados que son capaces de intercalarse en el ADN actuando como quelantes de metales que tienen propiedades antioxidantes y citoprotectoras son moléculas efectoras preferidas. Son particularmente preferidos el resveratrol y derivados polihidroxilados y flavonoides, tales como catequinas y epicatequinas, más específicamente 3-O galato de epigallocatequina, que pueden actuar como antioxidantes.

Otra realización de moléculas efectoras pueden representar toxinas. Las toxinas pueden incluir toxinas bacterianas, tales como pero no limitadas a toxinas diftérica o Exotoxina A, toxinas de plantas, tales como pero no limitadas a Ricina u otros alcaloides y polifenoles, micotoxinas, tales como alfa amanitina o en forma más especial Amatoxinas y falotoxinas. Las toxinas pueden no sólo pueden ser de origen bacteriano, sino también de origen fúngico, de plantas, de vertebrados e invertebrados, todas las cuales pueden ser modificadas de manera genética o química. Aún más, las toxinas también pueden ser toxinas ambientales tales como pero no limitadas a metilmercurio. Las toxinas también pueden ser dolastatinas 10 y 15 son pequeños péptidos aislados de la babosa marina *Dolabella auricularia* que se ha mostrado que interactúa con tubulina.

Una amplia clasificación de moléculas efectoras de acuerdo con su mecanismo también es posible: Agentes antineoplásicos y agentes inmunomoduladores (de acuerdo con el código ATC L01) en particular "Agentes Quimioterapéuticos Intracelulares"

ATC: Sistema de Clasificación Química Terapéutica Anatómica (WHO)

1) Antimitóticos, o moléculas que afectan microtúbulos (agentes de enlace a tubulina) tales como alcaloides vinca y análogos (alcaloides Vinca (Vinblastina, Vincristina, Vinflunina, Vindesina, Vinorelbina) y Taxanos (Paclitaxel, Larotaxel, Docetaxel) dolastatinas (y derivados por ejemplo auristatina) y critoficina, maitansinas y derivados de colchicina, epotilonas (por ejemplo ixabepilona)

2) que afectan la replicación de ADN

a) Agentes de intercalado tales como Antraciclinas (Daunorubicina, valrubicina, Doxorubicina, Aclarubicina, Epirubicina, Idarubicina, Amrubicina, pirarubicina, Zorubicina) y Antracendionas, tales como sustancias derivadas de Estreptomocinas (Actinomocina, Mitomicina, Bleomicina, Dactinomocina) o Amsacrina

b) Agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, Nitrosoureas, Alquilsulfonatos, Aziridinas, Hidrazinas (Procabazina), Triazenos, Epóxidos, Etileno Iminas, Altretamina, Mitobronitol, duocarmicina y análogos/estereoisómeros, Trenimon, Estramustina, CC-1065

c) Agentes tipo alquilantes tales como Platino (por ejemplo Carboplatino, Nedaplatino, Oxaliplatino, Triplatino Tetranitrato, Satraplatino)

d) Inhibidores específicos de topoisomerasa I tales como camptotecina (Belotecano, Topotecano)

e) Inhibidores específicos de topoisomerasa II tales como Podofilotoxina y derivados (Etoposido, Tenipósido)

f) Antimetabolitos que afectan la síntesis de ADN/ARN por interferencia con

- ácido fólico tal como inhibidores de Dihidrofolato reductasa (por ejemplo Aminopterina, Metotrexato), inhibidor de timidilato sintasa

- purina tales como inhibidor de adenosina deaminasa (Pentostatín), inhibidor de ribonucleótido reductasa/halogenado (Cladribina, Clofarabina), Tiopurina, Tiazofurina
 - Pirimidina tal como inhibidor de Polimerasa de ADN (Citarabina), inhibidor de ribonucleótido reductasa (Gemcitabina), agente hipometalante (Azacitidina, Decitabina)
 - deoxiribonucleótido tal como inhibidor de ribonucleótido reductasa Hidroxicarbamid
- g) otros agentes de reticulado de ADN tales como compuestos basados en platino (por ejemplo Cisplatina)
- 3) Otras sustancias que interfieren con ADN por ejemplo "antibióticos citotóxicos/antitumorales" tales como elsamicina A, adicionales antibióticos tales como CC-1065, y subclases de antibióticos tales como calicheamicina enediina o derivada de bacterias o cromo proteína enediina esperamicina (agentes de combinación de ADN extremadamente tóxicos) o neocarzinostatina (Otros miembros del grupo de antibióticos de neocarzinostatina son macromicina, actinoxantina, kedarcidina y maduropeptina) o Trabectedina (ruptura de estructura principal de ADN)
- 4) toxinas que afectan el metabolismo celular por ejemplo inhibidores HSP90, Lonidamida (inhibidores tanto de respiración y glicólisis que lleva a un decremento en ATP celular)
- a) Inhibidores de enzimas por ejemplo Olaprib (inhibidor PARP), inhibidores CDK (Alvocidib), Proteasoma (Bortezomib), inhibidores de Proteína quinasa, Masoprocol (inhibidor de Lipoxienasa)
 - b) Antagonistas receptores tales como tutina (antagonista receptor de Glicina (toxina de planta), Atrasentan, receptor de retinoide X (Bexaroteno), esteroides de sexo tales como testolactona, sustancias que interfieren con el receptor de estrógeno
 - c) Fotosensibilizantes u otros compuestos empleados para terapia foto dinámica (Porfirmer Sodio), derivados de Porfirina por ejemplo ácido δ-Aminolevulínico)
 - d) Radiosensibilizante tal como Efavoxiral que aumenta los niveles de oxígeno al disminuir la afinidad de hemoglobina-oxígeno
 - e) Sustancias que afectan las rutas de señalización por ejemplo señalización de Ca²⁺ tales como trióxido de arsénico y cloruro de trimetilestaño
 - f) Otras sustancias que interfieren con el metabolismo tales como retinoides y derivados Tretinoina (ATRA)
- 5) Que afectan procesos epigenéticos tales como inhibidores de HDAC (por ejemplo Panobinostat, Vorinostat, ácido Valporico, MGCD0103 (Mocetinostat), que están en la actualidad en desarrollo clínico para linfoma de células T cutánea, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin o linfoma folicular)
- 6) Que afectan los mecanismos de resistencia a drogas tales como compuestos heteroaromáticos bicíclicos, que inhiben P-glucoproteína
- 7) Sustancias que inducen mecanismos/señalización apoptótica que incluye proteínas pero también oligodeoxinucleótidos antisentido tales como Oblimersen (marca Genasense)
- 8) Enzimas tales como Asparaginasa
- 9) Fármacos antiprotozoarios tales como Miltefosina
- 10) Polifenoles de plantas tales como Flavonoides, Taninos (Proantocianidinas), Estilbenoides, curcuminoides y lignanos que tiene una de las actividades antitumor anteriormente mencionadas (por ejemplo que inducen apoptosis, freno de ciclo celular) o actividad adicional tal como secuestro o barrido de radicales libres, actividad quelante de metal, actividad de interferencia de receptor de estrógeno, antioxidante, que interfiere con enzimas que metabolizan fármacos). Más específicamente soralenos y sus metabolitos hidroxilados, reserpatol y derivados polihidroxiados, Flavonoides, tales como Catequizas y Epicatequinas, más específicamente 3-O galato de epigallocatequina
- 11) Adicionales sustancias naturales y derivados tales como eotoxina A, toxina difteria y sus derivados, en donde los derivados pueden estar química o genéticamente modificados.
- Las moléculas efectoras también pueden ser categorizadas de acuerdo con la clase de sustancia a la que pertenecen tales como compuestos inorgánicos, compuestos aromáticos, compuestos basados en metal, proteínas relacionadas al metabolismo celular, enzimas, péptidos, oligonucleótidos, tales como nucleótidos antisentido, toxinas bacterianas, toxinas derivadas de plantas y polifenoles tales como taninos, flavonoides y cumarinas así como terpenoides, alcaloides, antibióticos anti-tumor (por ejemplo antibióticos enediina), micotoxinas, toxinas de invertebrados así como vertebrados, toxinas ambientales.

Un inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención comprende al menos un agente dirigido, en particular anticuerpo dirigido y una molécula efectora. El inmunoconjugado puede comprender adicionales moléculas por ejemplo para estabilización. Para inmunoconjugados, el término "conjugado" en general se emplea para definir la asociación operativa del agente dirigido con una o más moléculas efectoras y no se pretende que se refiera solamente a cualquier tipo de asociación operativa y particularmente no se limita a "conjugación" química. Siempre que el agente dirigido sea capaz de ligar al sitio diana y el efector agregado funciona suficientemente como se pretende, particularmente cuando se suministra el sitio diana, será adecuado cualquier modo de conexión. Los métodos de conjugación de acuerdo con la presente invención incluyen pero no están limitados a, conexión directa de la molécula efectora al anticuerpo dirigido con o sin modificación previa de la molécula efectora y/o el anticuerpo dirigido o en conexión mediante enlazadores. Los enlazadores pueden categorizarse funcionalmente por ejemplo, en

ácidos lábiles, enlazadores fotolábiles, enlazadores de ruptura por enzimas, tales como enlazadores que pueden ser descompuestos por peptidasas. Se prefieren enlazadores susceptibles a ruptura en muchas realizaciones de la invención. Estos enlazadores susceptibles a ruptura pueden ser descompuestos bajo condiciones presentes en el ambiente celular, en particular un ambiente intracelular y que no tienen efecto nocivo en el fármaco liberado ante la descomposición. Bajos pH tales como pH de 4 a 5, como existen en ciertos departamentos intracelulares, romperán enlazadores ácido lábiles, mientras que los enlazadores fotolábiles pueden ser descompuestos por ejemplo por luz infrarroja. Sin embargo, los enlazadores que se rompen por/bajo condiciones fisiológicas presentes en la mayoría de las células se prefieren y se refieren aquí como enlazadores de descomposición fisiológica. De acuerdo esto, los enlazadores disulfuro se prefieren en muchas realizaciones de la invención. Estos enlazadores son susceptibles a ruptura a través de intercambio de disulfuro, que puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Enlazadores disulfuro heterobifuncionales incluyen pero no están limitados a, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al. (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo la Patente de EE.UU. 4.563.304), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, Registro CAS número 341498-08-6), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (véase, por ejemplo, Yoshitake et al., (1979)) y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio]pentanoato (SMNP) (véase, por ejemplo la Patente de EE.UU. 4.563.304). Las moléculas enlazadoras más preferidas para utilizar en la composición de la invención son SPP, SMCC y SPDB.

Otros enlazadores convenientes pueden incluir enlaces "no segmentables", tales como pero no limitados a Sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC), que es un enlazador heterobifuncional capaz de enlazar compuestos con compuestos que contienen SH. Moléculas enlazadoras bifuncionales y heterobifuncionales, tales como moléculas enlazadoras heterobifuncionales dirigidas a carbohidratos, tales como S-(2-tiopiridil)-L-cisteína hidrazida (TPCH), también están dentro del alcance de la presente invención (Vogel, 2004). La molécula efectora, tal como un maitaisinoide, que puede conjugarse con el anticuerpo dirigido mediante un proceso de dos etapas de reacción. Esto incluye como una primer etapa la modificación del anticuerpo dirigido con un reactivo de reticulado tal como N-succinimidil piridilditiopropionato (SPDP) para introducir grupos ditiopiridilo en el anticuerpo dirigido. En una segunda etapa, un maitansinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, puede agregarse al anticuerpo modificado, resultando en el desplazamiento de los grupos tiopiridil en el anticuerpo modificado, y la producción de conjugado anticuerpo/maitaisinoide citotóxico enlazado a disulfuro (Patente de EE.UU. 5.208.020). Sin embargo, procesos de conjugación de una etapa tales como el descrito en la Publicación de Patente de EE.UU. 20030055226 a Chari et al., también están dentro del alcance de la presente invención. En una realización de la presente invención múltiples moléculas efectoras del mismo o diferente tipo se conectan o enlazan a un anticuerpo dirigido. Como se discute aquí en otra parte, la naturaleza de los enlazadores empleados puede influenciar el exterminio por actividad inespecífica (Kovtun et al., 2006). Ver también la discusión de la Figura 13. Ver también las Patentes de EE.UU. 5.208.030; 5.416.064; 6.333.410; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497 y la Solicitud de Patente de EE.UU. 2005/0169933, método para preparar inmunoconjugados.

Los análogos CC-1065 o derivados pueden conjugarse al agente dirigido mediante por ejemplo grupos de enlace PEG como se describe en la Patente de EE.UU. 6.716.821.

Las calicheamicinas pueden conjugarse a los anticuerpos dirigidos por enlazadores (Patente de EE.UU. 5.877.296 y Patente de EE.UU. 5.773.001) o de acuerdo con los métodos de conjugación descritos en la Patente de EE.UU. 5.712.374 y la Patente de EE.UU. 5.714.586. Otro método preferido para preparar conjugados de calicheamicina se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 20040082764. Los inmunoconjugados de la presente invención pueden tomar la forma de proteínas de fusión recombinantes.

Una asociación operacional en forma de conexión con o sin un enlazador se refiere aquí como "conexión o enlace funcional".

Un miligramo (mg) de inmunoconjugado BT062 comprende aproximadamente 3.5 moléculas de DM4 (1 DM4 tiene un peso molecular aproximado de 800 Da), de esta manera 1 mg de inmunoconjugado comprende 2800 Da de DM4.

El peso molecular de BT062 es aproximadamente 150000 Da. De esta manera, 1 mg de inmunoconjugado comprende aproximadamente 1/53 mg de moléculas DM4. De esta manera 4 mg/ml de anticuerpo corresponden aproximadamente 4/53 DM4 moléculas, que es 75 $\mu\text{g/ml}$. 160 mg/m^2 del inmunoconjugado corresponde a aproximadamente 2,5 a 3,5, en particular a aproximadamente 3 mg/m^2 de DM4.

De acuerdo con la presente invención, más de 2, 2,5, 3, 3,5 o incluso 4 mg/m^2 de DM4 pueden administrarse a un sujeto ya sea en dosis sencillas repetidas o múltiples dosis incluyendo múltiples dosis repetidas, sin DLT.

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

Algunos de los inmunoconjugados de la presente invención tienen una molécula efectora que está estéricamente impedida, y contiene un enlazador segmentable, inmunoconjugado impedido (**HICL**— Hindered Immunconjugate,

Cleavable Linker). Una contraparte no impedida (**UI**: inmunoconjugado no impedido (UI = Unhindered Immunoconjugate) de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido de ingeniería contra CD138 enlazado a una molécula efectora mediante un enlazador segmentable (**CL**) y se describe aquí como UICL. El UICL es un inmunoconjugado equivalente a HICL que comprende un anticuerpo dirigido de ingeniería en donde la molécula efectora sin embargo no se impide estéricamente. Ejemplos de un par de HICL/UICL son BT062 y nBT062-SPP-DM1. Una contraparte no impedida de este inmunoconjugado que comprende un enlazador no segmentable (**UINCL**) se refiere al inmunoconjugado equivalente que comprende un anticuerpo dirigido de ingeniería en donde la molécula efectora no está impedida estéricamente y comprende un enlazador no segmentable. Para BT062 (nBT062-SPDB-DM4), nBT062-SMCC-DM1 constituirá un ejemplo de esta contraparte no impedida que comprende un enlazador no segmentable (UINCL).

Un crecimiento de una actividad inhibidora del tumor (= actividad inhibidora de crecimiento de tumor) de un inmunoconjugado, es una medida relativa. Describe la actividad inhibidora de crecimiento de tumor de un conjugado respecto a la actividad del inmunoconjugado de más alto desempeño cuya actividad se establece como 100 %. Por ejemplo, si la actividad del inmunoconjugado de más alto desempeño, digamos BT062 provocará un retraso en crecimiento de tumor (TGD = Tumor Growth Delay) de 32 días, se ajusta como 100 %, la actividad por ejemplo de nBT062-DM1 que exhibe un retardo de crecimiento de tumor (TGD) de 18 días se calcula como sigue:

$$\text{Actividad Inhibitoria de Crecimiento de Tumor} = 100x (\text{TGD}_{\text{nBT062-DM1}} / \text{TGD}_{\text{BT062}}),$$

de forma más genérica:

$$\text{Actividad Inhibitoria de Crecimiento de Tumor} = 100x (\text{TGD}_{\text{Muestra}} / \text{TGD}_{\text{Referencia}}).$$

Tabla 7: Retardo de crecimiento de tumor (TGD) y % de Actividad de nBT062-DMx contra xenoinjertos de tumor MOLP-8 en ratones SCID con base en los grupos de tratamiento que reciben una dosis de 450 µg/kg.

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

(*) Retardo de crecimiento de tumor en días (TGD) como tiempo promedio en días para que el grupo de tratamiento alcance un tamaño predeterminado (160 mm³) menos el tiempo promedio para que el grupo de control alcance este tamaño predeterminado.
 (**) Actividad Inhibitoria de Crecimiento de Tumor = 100x(TGD_{Muestra}/TGD_{BT062}). La actividad de BT062 se define como 100 %.

En el ejemplo que se proporciona en la Tabla 7, BT062 proporciona un crecimiento de una actividad inhibitoria de tumor que excede la de su contraparte no impedida (nBT062-SPP-DM1) en 60 %, y un crecimiento de actividad inhibitoria de tumor que excede la de su inmunoconjugado de contraparte no impedida que comprende un enlazador no segmentable (nBT062-SMCC-DM1) en 44 %.

Como se discutió anteriormente, ciertos fármacos tales como maitansinoides, mientras que son efectivos son altamente tóxicos, destruyendo en su forma nativa, es decir no conjugada, las células en forma no selectiva. El enlace del maitansinoide citotóxico a un anticuerpo puede mantener al fármaco inactivo hasta que alcanza la célula objetivo (Lambert 2005). Varios conjugados anticuerpos-maitansinoide están bajo desarrollo clínico.

Se realizaron estudios de fase I y II con IMG901 (huN901-DM1, BB-10901) para tratar tumores sólidos positivos a CD56 (cáncer pulmonar de células pequeñas y cánceres neuroendocrinos). En estos estudios IMG901 se administró en 4 semanas consecutivas cada 6 semanas, y en general fue bien tolerado (Fossella et al., 2005, Lorigan et al., 2006, McCann et al., 2007, Carter and Senter, 2008, Johnson et al. 2008). La porción anticuerpo del inmunoconjugado huN901 muestra significativa actividad CDC o ADCC. El mismo inmunoconjugado se investiga para tratamiento de mieloma múltiple positivo CD56. En un estudio Fase I, la administración de IMG901 en 2 semanas consecutivas cada 3 semanas a un paciente con mieloma múltiple positivo CD56 quien ha fallado tratamientos de mieloma múltiple establecidos, ha mostrado evidencia preliminar de seguridad así como actividad clínica. Diez y ocho pacientes se informó que han recibido IMG901 (3 pacientes cada uno a 40, 60, 75, 90, 112, y 140 mg/m²/semana). Resultados farmacocinéticos (PK) preliminares se informó que indican una relación aproximadamente lineal entre dosis y concentración en suero máxima observada. Actividad clínica interesante se ha observado con un perfil de seguridad tolerable. Una respuesta menor (MR = Minor Response) confirmada se

documentó en 3 pacientes fuertemente pretratados (1 paciente cada uno con 60, 90, y 112 mg/m²/semana) utilizando los criterios Europeos de Trasplante de Médula Ósea. Se informó enfermedad estable durable a dosis de 60, 90, 112, y 140 mg/m²/semana (Chanan-Khan et al., 2007, Chanan-Khan et al., 2008). IMG901 a una dosis de 75 mg/m²/semana se llevará para adicional investigación en la Fase de expansión de la prueba. A superiores dosis, se informó neuropatía periférica con la combinación de tratamiento con lenalidomida y dexametasona, el régimen de tratamiento estándar para mieloma múltiple.

MLN2704 (huJ591-DM1) se investiga para tratar cáncer de próstata resistente a castración (Milowsky et al., 2006, Brand and Tolcher 2006). Una prueba Fase I de MLN2704 en pacientes con cáncer de próstata resistente a castración metastásico progresivo investiga el perfil de seguridad, farmacocinética, inmunogenicidad y actividad antitumor de MLN2704 cuando se administra una vez cada cuatro semanas. Resultados demuestran que las dosis terapéuticas de MLN2704 pueden administrarse en forma segura en una base repetitiva (Galsky et al., 2008). Pruebas en paralelo se realizaron con otro inmunoconjugado-DM1, es decir bivatuzumab mertansina que hace diana en CD44v6, que se expresa en carcinomas de cabeza y cuello y otros tumores sólidos. En la prueba clínica con el programa de administración más condensado (administración semanal) enlace a CD44v6 en queratinocitos de piel media toxicidad sería en la piel con un resultado fatal en un paciente, que llevó a terminar el programa de desarrollo de bivatuzumab mertansina (Tijink et al., 2006, Sauter et al., 2007, Rupp et al., 2007, Riechelmann et al., 2008).

CD44v6 no sólo se expresa en diversas células de cáncer, sino también en tejido de piel normal y semeja en este aspecto CD138 que también se expresa no sólo en células de cáncer sino en tejido de piel normal. De manera sorprendente, se encontró que BT062 muestra eficacia clínica sin efectos secundarios intolerables como toxicidad en la piel como se encuentra en bivatuzumab mertansina. Véase la Figura 28, que muestra que repetidas dosis sencillas de BT062 de hasta 160 mg/m² llevan a al menos enfermedad estable con efectos secundarios manejables sobre períodos prolongados de tiempo. La Figura en particular muestra una respuesta menor definida por proteína M de suero (niveles de proteína M se reducen en ≥ 25 %). Sólo después de un periodo de retención (días 400 a 421) aumentan los niveles de proteína M, pero pueden estabilizarse después de recibirse la siguiente dosis. En suma, hubo supervivencia libre de progreso por aproximadamente 22 meses, con una duración de una respuesta menor de 19 meses. También se mostró previamente que 10 dosis sencillas repetidas de 20 mg/m² (tratamiento por más de 6 meses), 5 dosis sencillas repetidas de 40 mg/m², 5 dosis sencillas repetidas de 80 mg/m², 6 dosis sencillas repetidas de 160 mg/m², y 1 dosis sencilla de 200 mg/m² seguidas por 6 dosis sencillas repetidas de 160 mg/m² (por lo tanto, una dosis total de 1160 mg/m²) fueron bien toleradas (véase también la Publicación de Patente de EE.UU. 20110123554).

CD138 también se expresa en células de sangre normales y otras células cuya destrucción llevaría a efectos secundarios intolerables, por lo tanto severos eventos adversos (SAE = Severe Adverse Events) discutidos posteriormente en el presente documento. Independientemente de esto, no se encontró toxicidad limitante de dosis hacia células no cancerosas/que no son de tumor que expresan CD138 de cualquier tipo en los regímenes de tratamiento de una sola dosis repetida hasta 120 mg/m². Una dosis agregada de 360 mg/m² resultó en 3 semanas (21 días) cuando 120 mg/m² se administran los días 1, 8, y 15 y un periodo de reposo de 1 semana. De esta manera, mientras que la dosis tolerada máxima agregada (AMTD) en el contexto de este régimen de tratamiento de una vez a la semana es superior que la dosis máxima tolerable (MTD) que en el caso de BT062, previamente se hubiera determinado que era de 160 mg/m² cuando el inmunoconjugado solo se administraba como una sola dosis, aquí el día 1 en un ciclo de 21 días. De hecho, AMTD es superior, incluyendo más de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % superior que la toxicidad limitante de dosis (DLT) previamente determinada, en el caso de BT062, 200 mg/m² para la administración del inmunoconjugado como una sola dosis, por ejemplo una vez, por ejemplo el día 1, en un ciclo de tratamiento activo de tres semanas (21 días). Esto constituye una diferencia significativa a otros inmunoconjugados, en donde no pudo encontrarse diferencia en DLT o MTD entre una administración del inmunoconjugado como una sola dosis (incluyendo dosis sencilla repetida), por ejemplo a una administración de una vez dentro de tres semanas en un régimen de múltiples dosis, por ejemplo una administración de tres veces una vez a la semana por tres semanas (21 días).

Los efectos de **dosis tolerada máxima agregada** (AMTD) son idénticos a los efectos de MTD definida aquí en otra parte. Sin embargo, el término "agregado" transporta que o significa que la administración no se realiza como una sola dosis o dosis sencilla repetida dentro de un cierto periodo de tiempo, por ejemplo un ciclo de tratamiento activo por ejemplo de tres semanas (por ejemplo 21 días), pero que dentro de ese cierto periodo de tiempo, el inmunoconjugado se administra en intervalos, por ejemplo intervalos semanales tales como los días 1, 8 y 15 de un periodo de 21 días. Preferentemente, dosis iguales se administran por ejemplo en intervalos de 7 días (por ejemplo los días 1, 8 y 15), intervalos de 3 días (por ejemplo, los días 1, 4, 7, 10, 13 y 16), intervalos de 4 días, intervalos de 5 días o intervalos de 6 días. Sin embargo, una ligera variación en las administraciones tales como una administración de refuerzo inicial descrita aquí en otra parte, también está dentro del alcance de la presente invención. Los intervalos de administración pueden aumentarse o disminuirse después de cada ciclo (véase terapia de mantenimiento discutida aquí en otra parte). Por ejemplo, el primer y opcional segundo ciclo pueden involucrar administración cada 3er día mientras que en los siguientes ciclos los intervalos pueden ser por ejemplo incrementados progresivamente a 4, 5, 6 o 7 días. Una **fracción** de AMTD incluye por ejemplo, aproximadamente 95 % de AMTD, aproximadamente 90 % de AMTD, aproximadamente 85 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 45 % de AMTD. Considerando por ejemplo que AMTD de un

inmunoconjugado teórico es 100 mg/m^2 , una fracción del 95 % sería por ejemplo 95 mg/m^2 .

Los eventos adversos (AE) pueden ser evaluados de acuerdo con la versión 4.0 de NCI-CTCAE (Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS March 31, 2003), National Cancer Institute, US National Institutes of Health, Fecha de publicación: 9 de agosto, 2006). Para AE no citados en CTCAE v4.03, la severidad se estimará por el Investigador por los siguientes criterios:

Solo AE grado 1 y grado 2 son aceptables, por lo que **Grado 1** (leve) requiere mínimo o ningún tratamiento y no interfiere con las actividades diarias del paciente y **Grado 2** (Moderado) resulta en bajo nivel de inconveniencia o consideración con respecto a medidas terapéuticas. Eventos moderados pueden provocar cierta interferencia con el funcionamiento del sujeto.

AE de **Grado 3** (Severos) y **Grado 4** (Que amenazan la vida) se consideran no aceptables, su ocurrencia define la toxicidad limitante de dosis (DLT), si otra forma no es definida por criterios DLT específicos de estudio (véase a continuación).

AE de Grado 3 y 4 también se denominan eventos adversos severos (SAE) e incluyen linfopenia, leucopenia, trombopenia, neutropenia, paro cardíaco, fibrilación atrial, embolia pulmonar y trombosis de venas profundas. Otros criterios específicos de estudio pueden ser empleados (véase a continuación).

Las **toxicidades limitantes de dosis** (DLT) se determinan utilizando la graduación de acuerdo con NCI CTCAE v4.0 referida anteriormente. En general, todas las toxicidades de al menos grado 3 se definen como DLT. Los criterios adicionales DLT específicos de estudio que pueden emplearse se citan a continuación:

No hematológicos:

- Alopecia, de cualquier grado no se considera DLT
- Náusea y vómito grado 3-4 que duran más de 3 días a pesar de medicamento antiemético óptimo.^a
- Diarrea grados 3-4 que dura más de 3 días a pesar de medicamento anti diarreico óptimo.^a

a.- Tratamiento óptimo anti diarreico y antiemético se determinan por cada investigador.

Hematológico:

- Neutropenia grado 4 que dura más de 5 días.
- Neutropenia grado 3 o superior con una temperatura mayor que o igual a 38.3°C (101°F) por dos determinaciones consecutivas separadas 4 horas.
- Trombocitopenia grado 4
- Trombocitopenia grado 3 o superior con sangrado y requiere el uso de transfusión de plaquetas.
- Neutropenia grado 3, trombocitopenia grado 3 NO se consideraron DLT.

La **Dosis Máxima Tolerada** (MTD) se define como la dosis en la cual cualquier sujeto aquí en una sola dosis o una dosis sencilla repetida se ha administrado, experimenta toxicidades limitantes de dosis (DLT). Como es fácilmente notable, una MTD puede ser fácilmente determinada para una amplia variedad de inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención. Estas DLT pueden ocurrir en un primero o un ciclo de tratamiento subsecuente. En particular, 1 de 6 sujetos a quienes se ha administrado una dosis sencilla o una dosis sencilla repetida experimentan DLT. Preferentemente se consideran DLT en el primer ciclo.

Durante escalas de dosis, preferentemente solo se consideran DLT en el primer ciclo.

Evento adverso (AE) específico de estudio

Cualquier signo, síntoma o enfermedad desfavorable o no pretendido que aparece o empeora en un paciente o sujeto de investigación clínica durante el periodo de observación en un estudio clínico. AE puede ser cualquiera de los siguientes:

- Una nueva enfermedad
- Una exacerbación de un signo o síntoma de la condición subyacente bajo tratamiento de una enfermedad concomitante,
- No relacionada a participación en el estudio clínico o un efecto del medicamento del estudio o fármaco comparador,
- Una combinación de uno o más de los factores anteriores.

En general, no se implica relación causal con el medicamento del estudio por el uso del término "evento adverso".

Evento adverso serio (SAE)

Un SAE es una ocurrencia médica adversa o efecto que a cualquier dosis:

- Resulta en muerte,
 - 5 - La muerte es un resultado de AE y no AE por sí mismo. Todas las muertes, independientemente de la causa o relación deben ser informadas para pacientes en el estudio
- Amenaza a la vida,
 - 10 - Amenaza a la vida significa que el paciente estaba en riesgo inmediato de muerte del evento como ocurrió. Esto no incluye un evento que puede haber llevado a muerte si fuera más severo.
- Resulta en incapacidad persistente o significativa,
- Es una anomalía congénita o defecto de nacimiento, o
- 15 • Es otra condición médicamente importante
 - Un evento médico importante que no es una amenaza inmediata para la vida o resultará en muerte u hospitalización, pero que puede lesionar al paciente/sujeto o puede requerir intervención médica para evitar uno de los resultados citados anteriormente, deberá ser informada como “serio” por igual.

20

Causalidad de evento adverso

Se refiere a la relación del AE con el producto de investigación. La causalidad se categorizará de acuerdo con los siguientes criterios:

25

No relacionado

Los AE para los cuales una explicación razonable para una causa alterna se considera plausible, por ejemplo producto que no es de investigación tomado, alternativa clínica plausible como una lesión accidental, progreso esperado de enfermedad subyacente o concomitante, relación temporal farmacológicamente incompatible, enfermedad intercurrente.

30

Relacionado

35 Los AE para los cuales una relación clínica y/o farmacológica razonablemente posible con el producto de investigación no puede ser excluida, por ejemplo que carece de alternativas plausibles.

40

Los Estudios de Fase I con la forma de inmunoconjugado de trastuzumab (T-DM1) para tratamiento de cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2 se realizan para investigar seguridad y farmacocinética de T-DM1 administrado semanalmente una vez cada 3 semanas. En ambos estudios AE de grado ≥ 2 relacionado a T-DM1 ha sido infrecuente y manejable. Respuestas de tumor objetivas se han observado a dosis en o por debajo de MTD (Burris et al., 2006, Krop et al., 2007, Beeram et al., 2008, Holden et al., 2008). Un estudio Fase II que investiga T-DM1 en cáncer de mama metastásico HER2 positivo cuando se administra una vez cada 3 semanas, se ha iniciado (Beeram et al., 2008, Carter and Senter, 2008, Holden et al., 2008). Una prueba clínica Fase III que evalúa T-DM1 para cáncer de mama metastásico HER2-positivo de segunda línea y pruebas clínicas Fase II que evalúan T-DM1 para cáncer de mama metastásico HER2-positivo de primera, segunda y tercer líneas están en proceso. Una prueba clínica Fase Ib en combinación con pertuzumab para pacientes de cáncer de mama metastásico HER2-positivo quienes han progresado en tratamiento basado en Herceptina, se planea. Tres pruebas clínicas fase I se han completado con cantuzumab mertansina, un conjugado DM1 del anticuerpo huC242 que hace diana o diana en un antígeno que se encuentra en cánceres colorectales y otros cánceres que expresan C242. El tratamiento con huC242-DM1 administrado en una base semanal así como una vez cada 3 semanas se encontró que es seguro y tolerado (Rowinsky et al., 2002, Tolcher et al., 2003, Helft et al., 2004).

45

50

55

Cuatro estudios investigan inmunoconjugados utilizando el maitansinoide DM4 que contiene tiol, que también es un componente BT062:

60

Un análogo de cantuzumab mertansina, IMG242 (huC242-DM4), se investigó en un estudio fase I en sujetos con cáncer que expresan CanAg (Tolcher et al., 2006). Sujetos recibieron una sola infusión IV de IMG242 una vez cada 3 semanas con una dosis en el intervalo de 18 a 297 mg/m². Toxicidad limitante de dosis se experimentó por 2 de 6 sujetos tratados al nivel de dosis 223 mg/m² durante su segundo ciclo de tratamiento. El fármaco fue bien tolerado al nivel 168 mg/m² y no induce ninguna respuesta de anticuerpo detectable (Mita et al., 2007). Con base en los primeros resultados de seguridad del estudio Fase I, se inició un estudio Fase II para evaluar IMG242 para tratar cáncer gástrico que expresa CanAg para dosis de 168 mg/m² (Sankhala et al., 2007). Cuarenta y cinco pacientes han sido tratados con IMG242 en dos pruebas clínicas. Con base en la seguridad y completos análisis clínicos farmacocinéticos (PK)/farmacodinámicos (PD), el estudio Fase II se enmendó para tratar pacientes con bajos niveles de CanAg en plasma en la dosis de 126 mg/m² y pacientes con altos niveles de CanAg en plasma a 168 mg/m² (Qin et al. 2008). Un estudio fase I con anticuerpo huMy9-6 conjugado a DM4 (AVE9633) también se realizó para el

65

tratamiento de sujetos con leucemia mieloide aguda CD33-positiva (AML). El régimen de tratamiento consistió en infusiones IV una vez cada 3 semanas utilizando un intervalo de dosis de 15 a 260 mg/m². Ni mielosupresión asociada ni respuestas se han anotado en un estudio de una sola dosis (Giles et al., 2006). Un segundo estudio de fase I que investiga AVE9633 con el régimen de tratamiento que consiste en infusiones IV el día 1 y el día 8 de un ciclo de 28 días también mostró que AVE9633 fue bien tolerado también proporciona evidencia de actividad antileucemia incluyendo un sujeto con respuesta completa (respuesta de plaquetas inadecuada, dependiente de transfusión) que dura al menos 4 meses (Legrand et al., 2007). Dos adicionales inmunoconjugados DM4 (SAR3419 y BIIB015) han entrado en pruebas clínicas de Fase I.

SAR3419 (huB4-DM4) es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado, huB4, que hace diana específicamente al antígeno CD19, conjugado a través de un enlace disulfuro con el derivado maitansinoide DM4. La expresión de molécula de CD19 se encuentra en todos los linfocitos B, incluyendo células pro-B, pero se pierde durante maduración a células plasmáticas. El antígeno CD19 también se expresa en la membrana de células foliculares dendríticas y en la mayoría de las líneas celulares B estabilizadas. Después de ligar al antígeno CD19, SAR3419 se somete a internalización y liberación intracelular de DM4. En estudio fase I/II SAR3419 se administra por infusión intravenosa, semanalmente con 8 a 12 dosis, a pacientes con NHL de células B con relapso/refractario que expresa CD19. Cuarenta y cuatro pacientes participaron a 7 niveles de dosis de 10 a 70 mg/m². Las histologías principales fueron foliculares (18; 41 %) y células B grandes difusas (17; 39 %). El número medio de regímenes previos fue 3 (1-8) y 19 pacientes recibieron trasplante previo. Veintiocho pacientes participaron en la parte de escala de dosis. De 6 pacientes a 70 mg/m², 1 paciente tuvo una toxicidad limitante de dosis (DLT) definida por protocolo de neutropenia y 2 pacientes tuvieron toxicidades significantes grado 2 con inicio tardío: visión borrosa asociada a depósitos córneos y bloqueo de ramificación de rama izquierda. La dosis tolerada máxima (MTD) se definió a 55 mg/m², mientras que MTD en un régimen que involucra una sola administración cada tres semanas fue 160 mg/m². De 22 pacientes a MTD de 55 mg/m², 4 pacientes tuvieron toxicidades grado 3-4 reversibles relacionadas después de 6 a 8 dosis: neuropatía óptica, parestesia, neutropenia y trombocitopenia. De 38 pacientes a dosis de 20 mg/m² o superiores, 12 (32 %) pacientes lograron una respuesta objetivo incluyendo 6 CR/CRu (respuesta completa/respuesta completa no confirmada), con efecto de dosis obvio. De 22 pacientes a MTD (55 mg/m²), 8 (36 %) tuvieron una respuesta, incluyendo 3 CR/CRu. De 9 pacientes se evalúan por duración de respuesta (RD), 4 pacientes tuvieron RD en el intervalo de 6 a al menos 12 meses. En suma, puede decirse que la dosis tolerada máxima agregada (AMTD) en un régimen de dosis de tres semanas (21 días) que involucra tres dosis no excede MTD en un régimen de dosis de tres semanas (21 días) que involucra una sola dosis (por ejemplo el día uno).

Tabla 8: Comparación de Inmunoconjugados que se administran en regímenes de múltiples dosis repetidas (una vez a la semana).

	Regímenes una vez a la semana	Corresponde a concentración total de (considerando 70 kg y 1,9 m ² de área de superficie corporal)
BT062	MTD 140 mg/m ²	266 mg
SGN-35 (Batlett et al., 2008)	Hasta 1,2 mg/kg	84 mg
SAR3419 (Coiffer et al., 2011)	MTD 55 mg/m ²	110mg
T-DM1 (Holden et al., 2008)	MTD a 2,4 mg/kg	168 mg
SGN-75 (anti-CD70; MMAF) (SEATTLE GENETICS)	Estudio 0,3 a 0,6 mg/kg (MTD no ha sido alcanzada)	

Como puede verse de la tabla anterior, BT062 puede administrarse a superiores dosis una vez a la semana (al menos en una cantidad total de 266 mg). En contraste con los otros inmunoconjugados citados, BT062 exhibió farmacocinéticas características. En particular BT062 mostró una discrepancia característica entre valores C_{max} observados y teóricos de BT062 descritos aquí en otra parte.

También, se conoce de otros inmunoconjugados tales como Mylotarg que hace diana o diana en CD33, que la actividad del inmunoconjugado puede no ser suficiente para tratar pacientes a bajas dosis. Este problema se ha aliviado por ejemplo por administración de factor de estímulo de colonia de granulocitos humanos recombinantes (rhG-CSF = recombinant human Granulocyte Colony Stimulating Factor) para sensibilizar células diana que expresan CD33 (Fianchi et al., Annals of Oncology 2008 19(1):128-134).

Los estudios anteriores demuestran que las respuestas a diferentes inmunoconjugados, en particular inmunoconjugados que contienen maitansinoide (tales como DM1 o DM4), varían ampliamente. Las pruebas de BT062 en sujetos humanos no solo mostraron tolerable toxicidad contra células no cancerosas que expresan CD138 a diferentes dosis de enfermedad estable, en especial a dosis de hasta 160 mg/m², sino también rápida eliminación del plasma a dosis de hasta aproximadamente 50 mg/m² en un esquema de administración semanal.

El inmunoconjugado aquí descrito puede administrarse en combinación con agentes citotóxicos. Estas combinaciones se refieren aquí también como combinaciones anticáncer.

Selección de socios de combinación de fármacos

Un conjunto de guías para el diseño de regímenes de quimioterapia de combinación se ha desarrollado (Takimoto, 2006). Cumplir con estas guías en general incrementará las posibilidades de que una combinación particular logre al menos uno de las tres ventajas teóricas más importantes de la quimioterapia en combinación sobre la terapia de un solo agente:

- 1.) Llevar al máximo el exterminio celular mientras que reduce al mínimo las toxicidades y hospederos al utilizar agentes con toxicidades limitantes de dosis sin interferencia;
- 2.) Incrementar el intervalo de actividad de fármaco contra células de tumor con resistencia endógena a tipos de terapia específicos; y
- 3.) Evitar o frenar el desarrollo de nuevas células de tumor resistentes.

Los principios recomendados a considerar para seleccionar agentes para uso en regímenes de quimioterapia en combinación comprenden:

- a) seleccionar fármacos que se sabe que inducen remisión completa como agentes sencillos,
- b) seleccionar fármacos con diferentes modos de acción y con efectos citotóxicos aditivos o sinérgicos,
- c) seleccionar fármacos con diferentes toxicidades limitantes de dosis,
- d) seleccionar fármacos con diferentes patrones de resistencia para reducir al mínimo la resistencia cruzada.

También, fármacos deberán administrarse a su dosis óptima y programa (e), y la administración deberá realizarse a intervalos consistentes, mientras que el periodo libre de tratamiento deberá ser lo más corto posible para permitir la recuperación de tejido normal (f) (Takimoto et al, 2009).

Los efectos sinérgicos o los efectos solo aditivos pueden ser contra-atacados por una diversidad de factores: Por ejemplo, los componentes de una combinación anticáncer pueden inactivarse entre sí, por ejemplo al ligar entre sí. Además, un componente de una combinación anticáncer puede interferir con el modo de acción de otro componente. Por ejemplo: Lenalidomida regula por disminución los receptores de adhesión celular tales como CD138, que es el objetivo o diana del inmunoconjugado de la presente invención (Quach et al., 2010, UDI et al., 2010). El inhibidor de proteasoma bortezomib provoca freno de ciclo celular G2/M (Wang et al., 2009) que también se afecta por agentes anti-mitóticos. De esta manera, si la molécula efectora del inmunoconjugado es un maitansinoide, compartirá un objetivo o diana para acción con bortezomib, que se considera desventajoso.

Las dosificaciones, rutas de administración y uso recomendado de los agentes citotóxicos de acuerdo con la presente invención que se han empleado ampliamente en terapia de cáncer se conocen en la técnica y se han descrito en bibliografía tal como el Manual de Referencia para Médicos (PDR = Physician's Desk Reference). El PDR describe dosis de los agentes que se han empleado en tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosis y dosis de estos agentes citotóxicos que son efectivos, dependerá del cáncer en particular que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares al médico con destreza en la técnica y pueden ser determinados por el médico. La edición 2006 del (PDR) describe el mecanismo de acción y dosis preferida de tratamiento y programas de dosis para talidomida (p 979-983), VELCADE (p 2102-2106) y melfalan (p 976-979). Una persona con destreza en la técnica puede revisar el PDR, utilizando uno o más de los siguientes parámetros, para determinar régimen de dosis y dosis de los agentes quimioterapéuticos y conjugados que pueden emplearse de acuerdo con las enseñanzas de esta invención. Estos parámetros incluyen:

1. Índice completo de acuerdo con a) Fabricante b) Productos (por compañía o nombre de fármaco con marca) c) Índice de categoría (por ejemplo, "inhibidores de proteasoma", "agentes alquilantes de ADN", "melfalan" etc.) d) Índice genérico/químico (nombre de fármacos comunes sin marca).
2. Imágenes de color de medicamentos
3. Información de producto, consistente con etiquetado de la FDA incluyendo a) Información química b) Función/acción c) Indicaciones y Contra-indicaciones d) Investigación de prueba, efectos secundarios, advertencias.

En el presente contexto, una meta de emplear combinaciones es una reducción en la dosis efectiva del inmunoconjugado de la presente invención, reduciendo sus efectos secundarios y abriendo nuevas ventanas

terapéuticas con efectos secundarios aceptables. Otra meta es reducir la dosis efectiva de agentes citotóxicos previamente empleados tales como Velcade o lenalidomida y preferentemente reducir los efectos secundarios de estos agentes. Similarmente, las consecuencias positivas de dosis incluyen, pero no están limitados a prolongación de tratamiento, superiores dosis, otros programas de aplicación, respuesta mejor y más sostenida al tratamiento.

5 Pacientes que exhiben un fenotipo refractario a fármacos tales como lenalidomida, melfalan (estudio en proceso) pueden hacerse sensibles de nuevo por el uso de inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención.

La expresión "agente citotóxico" comprende "fármacos citotóxicos/de cáncer" incluyendo agentes quimioterapéuticos, en particular agentes quimioterapéuticos que, en general se emplean en células de rápida división, es decir:

- Agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno (por ejemplo melfalan, ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, clorambucil, ifosfamida) o nitrosureas (por ejemplo carmustina, lomustina, streptozocina) o alquilsulfonatos;
- 15 - Agentes tipo alquilantes tales como cisplatina, carboplatina, nedaplatina, oxaliplatina; o agentes alquilantes no clásicos tales como tetrazinas, dacarbizina, procarbazona, altretamina
- Antraciclinas tales como doxorubicina y doxorubicina liposómica (DOXIL)
- Alcaloides tales como vincristina

20 La expresión "agentes citotóxicos" también comprende **fármacos inunomoduladores (ImiDs = immunomodulatory drugs)** tales como talidomida (o análogos), lenalidomida (CC-5013), pomalidomida, actimid, que se emplean para terapia de mieloma en vista de sus propiedades inmunomoduladoras pleiotrópicas. Comúnmente exhiben actividad anti-inflamatoria por inhibición de producción TNF alfa, pero también exhiben actividad anti-angiogénica y propiedades inmunomoduladoras tales como co-estímulo de células T e influencia en células T regulatorias (Quach et al., 2010).

La expresión "agente citotóxico" también comprende esteroides, tales como, pero no limitados a, dexametasona y prednisona así como inhibidores proteosómicos tales como bortezomib (VELCADE) o carfilzomib que inducen la activación de muerte celular programada en células neoplásicas dependientes de supresión de rutas pro-apoptóticas.

Los agentes adicionales citotóxicos potentes, incluyen etopósido, que inhiben la enzima topoisomerasa II, citarabina, que ante conversión daña ADN cuando un ciclo celular se mantiene en fase S (síntesis de ADN) y de esta manera en particular afecta a células de rápida división tales como células de cáncer. Además, agentes inhibidores de microtúbulos tales como vinca alcaloides, taxanos (como se describió anteriormente en el contexto de moléculas efectoras) también pueden servir como agentes citotóxicos de acuerdo con la presente invención.

También se incluye en la definición inhibidor quinasa tales como inhibidores sorafenib o HDAC (histona deacetilasa) tales como romidepsina así como agentes inhibidores de crecimiento, agentes anti-hormonales, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimulantes, agentes inmunosupresores, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de proteína tirosina quinasa (PTK = Protein Tyrosine Kinase).

Además se incluyen en esta definición agentes citotóxicos basados en anticuerpo incluyendo inmunoconjugados y anticuerpos que tienen un efecto citotóxico reconocido en la técnica. Anti-CD40 es un anticuerpo preferido. Otros anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo AVASTIN (bevacizumab) o MYELOMACIDE (milatuzumab).

La talomida (α -(N-ftalimido) glutarimida; talidomida), es un agente inmunomodulador. La fórmula empírica para talidomida es $C_{13}H_{10}N_2O_4$ y el peso molecular en gramos es 258,2. El número CAS de talidomida es 50-35-1. Parece tener múltiples acciones, incluyendo la capacidad de inhibir el crecimiento y supervivencia de células de mieloma en diversas formas y de inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

Lenalidomida (REVLIMID) es un derivado de talidomida que representa la segunda generación de compuestos inmunomoduladores (ImiDs = immunomodulatory compounds) que inicialmente se desarrollaron como inhibidores de TNF alfa. Efectos de lenalidomida incluyen freno de crecimiento o apoptosis, abrogado de adhesión de células de mieloma a células estromales de médula ósea y modulación de citoquinas que promueven crecimiento celular, supervivencia y resistencia a fármacos de células de mieloma (Morgan et al., 2006). Lenalidomida es efectiva en pacientes refractarios a talidomida. Además de efectos en células inmunes, ImiDs tales como lenalidomida se sugirió que provocan freno de ciclo celular en fase G0/G1. Además, se considera que ImiDs regulan por disminución los receptores de adhesión celular (VLA-4, VLA-5, CD138) (Quach et al., 2010).

60 Una regulación por disminución de CD138 se esperará que provoque un enlace reducido de cualquier agente que hace diana CD138, tal como BT062, a células diana.

Los inhibidores de proteasoma pueden dividirse en subgrupos adicionales:

65 a) derivados péptidos de origen natural que tienen una estructura epoxi cetona C-terminal, derivados beta-lactona, aclacinomicina A, lactacistina, clastolactacistina; y

b) inhibidores sintéticos (que comprenden aldehídos péptido modificados, estructuras alfa, beta epoxicetona, vinil sulfonas, restos de ácido bórico, pinacolesteres. Un inhibidor proteasómico preferido de la presente invención es bortezomib (PS 341; VELCADE, ver la discusión a continuación). Uno de los mecanismos propuestos sugiere que la inhibición proteasómica puede evitar degradación de factores pro-apoptóticos, permitiendo activación de muerte celular programada en células neoplásicas dependientes de supresión de rutas pro-apoptóticas. Además, bortezomib provoca freno de ciclo celular G2/M (Wang et al., 2009). De esta manera, bortezomib puede interferir con agentes anti-mitóticos que son parte del inmunconjugado de la presente invención, por ejemplo con el efecto de maitansinoide DM4, que actúa también en esta fase de ciclo celular. Además, la segmentación de PARP (Poli(ADP-ribosa) Polimerasa), que se lleva a cabo en la apoptosis, también es afectada tanto por DM4 como bortezomib. De acuerdo con esto, la combinación de un inmunconjugado que comprende un agente anti-mitótico, y un inhibidor proteasómico que exhibe las características de bortezomib, no se adapta con las guías generales establecidas previamente para obtener efectos sinérgicos (Takimoto et al, 2009).

VELCADE (bortezomib) es un inhibidor de proteasoma empleado para tratar mieloma múltiple. Se considera que velcade actúa en las células de mieloma para provocar muerte celular, y/o actúa indirectamente para inhibir crecimiento celular de mieloma y supervivencia por acción en el microambiente de huesos. Sin estar limitado a una teoría o modo de acción específico, VELCADE de esta manera interrumpe procesos celulares normales, resultando en inhibición de proteasoma que promueve apoptosis.

Dexametasona es una hormona esteroide glucocorticoide sintética que actúa como un anti-inflamatorio e inmunosupresor. Cuando se administra a pacientes de cáncer, dexametasona puede contra-atacar los efectos secundarios de la terapia de cáncer. Dexametasona también puede suministrarse sola o junto con otros agentes anticáncer, incluyendo talidomida, lenalidomida, bortezomib, adriamicina o vincristina.

Las sustancias para tratamiento, que pueden emplearse en combinación con BT062 también incluyen agentes inmunomoduladores (por ejemplo talidomida y lenalidomida, y pomalidomida), inhibidores de proteasoma (por ejemplo bortezomib y carfilzomib), esteroides (por ejemplo dexametasona), agentes alquilantes y quimioterapia de alta dosis, combinaciones (por ejemplo Melfalan y Prednisona (MP), Vincristina, doxorubicina (Adriamicina), y dexametasona (VAD)), y bisfosfonatos.

Actualmente, muchas combinaciones en particular de fármacos anti-mieloma se investigan en pruebas clínicas. El propósito del uso de una combinación en general ya sea para mejorar la efectividad, para superar un fenotipo refractario, por ejemplo, de células de mieloma, para reducir efectos secundarios debido al uso de menores concentraciones de uno de los socios de combinación o una combinación de los mismos. Se mostró que reduce toxicidad utilizar una baja dosis, por ejemplo, de lenalidomida más una baja dosis de dexametasona (Rajkumar et al., 2010).

Especialmente en pacientes con mieloma múltiple de relapso o refractario, hay y se han investigado varias combinaciones de fármacos.

Un ejemplo convencional para combinar agentes quimioterapéuticos representa la combinación triple de vincristina, dexametasona, doxorubicina (régimen VAD).

Los inhibidores proteasómicos tales como bortezomib se han combinado con fármacos de mieloma, tales como melfalan y prednisona (VMP). Esta combinación resultó en una tasa de respuesta completa de 16 % y una tasa de respuesta total de 89 % (Mateos et al., 2006).

Bortezomib también se ha aprobado para su uso en combinación con doxorubicina liposómica para pacientes de relapso o refractarios (Ning et al., 2007).

Bortezomib se investiga en varios estudios clínicos para uso en combinación con dexametasona, melfalan, prednisona y/o talidomida.

Bortezomib también está bajo investigación, combinado con doxorubicina liposómica, ciclofosfamida y dexametasona en pacientes de mieloma múltiple. Combinaciones con Vorinostat actualmente están bajo investigación dirigidas a resensibilizar pacientes a bortezomib que son refractarios a este fármaco.

La talidomida, que se administra oralmente, se ha combinado con melfalan / prednisona (MPT) (Facon et al., 2006) o dexametasona o bendamustina (Pönisch et al., 2008).

Aún más, lenalidomida (REVLIMID), fármaco inmunomodulador, empleado en combinación con dexametasona, resultó en un tiempo prolongado a progresión de tumor e incrementada supervivencia en comparación con dexametasona sola (Weber et al., 2006). Lenalidomida combinada con dexametasona también se ha estudiado en pacientes recientemente diagnosticados (Rajkumar et al., 2005) así como la combinación con melfalan/prednisona (RMP) (Palumbo et al., 2006).

La Publicación de Patente EE.UU. 2010/0028346 otorgada a Lutz et al., describe efectos sinérgicos de ciertos inmunoconjugados con agentes quimioterapéuticos.

5 La expresión "en combinación con" no se limita a la administración exactamente al mismo tiempo. Por el contrario, el término abarca administración del inmunoconjugado de la presente invención y el otro régimen (por ejemplo radioterapia) o agente, en particular los agentes citotóxicos referidos previamente en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que puedan actuar en conjunto para proporcionar un beneficio (por ejemplo, incrementada actividad, disminuidos efectos secundarios) que se incrementa en comparación con el tratamiento con solo cualquier
10 inmunoconjugado de la presente invención, o por ejemplo el o los otros agentes. Se prefiere que el inmunoconjugado y el otro agente o agentes actúen en forma aditiva, y en especial se prefiere que actúen en forma sinérgica. Estas moléculas son proporcionadas de manera conveniente en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido. El practicante médico con destreza en la especialidad puede determinar en forma empírica, o al considerar la farmacocinética y modos de acción de los agentes, la o las dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como las sincronizaciones y métodos de administración apropiados. Como se emplea en el contexto
15 de la presente invención "la administración concurrente" se refiere a la administración al mismo tiempo que el inmunoconjugado, a menudo en una forma de dosis combinada.

Los efectos sinérgicos, que son los efectos de dos componentes tales como un inmunoconjugado y un agente citotóxico, que excede un efecto estrictamente aditivo. Estos efectos sinérgicos pueden ser contra-atacados por una
20 cantidad de factores que se discuten adicionalmente a continuación.

El sinergismo se ha calculado como sigue (Yu et al., 2001; Gunaratnam et al., 2009):

$$\text{PROPORCIÓN (r)} = \text{FTV esperado (combinación)} / \text{FTV observado (combinación)}$$

25 FTV: Volumen de tumor fraccional (Fractional tumor volume) = volumen de tumor promedio (prueba)/volumen de tumor promedio (control)

Una relación > 1 se considera como sinérgica, mientras que $r < 1$ es menos que aditiva.

30 La relación (r) es, cuando está sobre 1, también se denomina "**PROPORCIÓN DE SINERGIA**".

La **CALIFICACIÓN DE ACTIVIDAD** es otra medida para los efectos de una combinación. Esta calificación se basa en el exterminio celular Log_{10}

$$\text{Exterminio celular } \text{Log}_{10} = (\text{T}-\text{C}) / \text{T}_d \times 3.32$$

en donde (T-C) o retraso en crecimiento de tumor, es el tiempo promedio en días requerido para que los tumores del grupo de tratamiento (T) y el grupo de control (C), alcancen un tamaño predeterminado (600 mm^3). T_d es el tiempo de duplicación del tumor, con base en el volumen de tumor promedio en el ratón de control, y 3,32 es el número de duplicaciones celulares por log del crecimiento celular. (Bissery et al., 1991). Un exterminio celular Log_{10} superior a 2,8 indica que la combinación es altamente activa, un exterminio celular log_{10} de 2,0-2,8 indica que la combinación es muy activa, un exterminio celular log_{10} de 1,3-1,9 indica que la combinación es activa, un exterminio celular log_{10} de 0,7- 1,2 indica que la combinación es moderadamente activa y un exterminio celular log_{10} menor a 0,7 indica que la combinación es inactiva.
45

Como apreciará el experto en la materia, la secuencia de aminoácidos de la porción de anticuerpo dirigido de ingeniería preferida de un inmunoconjugado, nBT062 puede variarse sin pérdida de la funcionalidad de la porción de anticuerpo dirigido a CD138. Esto en particular es cierto cuando la región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1, y la región variable de cadena ligera CDR3 que comprende restos aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2, respectivamente de la región de unión a antígeno (ABR = Antigen Binding Region). Ventajosamente, las regiones variables de cadena pesada CDR1 y CDR2 que comprende restos aminoácidos 31 a 35 y 51 a 68 de SEQ ID NO: 1, y/o (b) región variable de cadena ligera CDR1 y CDR 2 que comprenden restos aminoácidos 24 a 34 y 50 a 56 de SEQ ID NO: 2, respectivamente de la región de unión a antígeno (ABR) también se mantienen.
50
55

La expresión "identidad de secuencia" se refiere a una medida de la identidad de secuencias de nucleótido o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de manera tal que se obtiene la correspondencia de más alto orden. "Identidad", per se, tiene significado reconocido en la técnica y puede calcularse utilizando técnicas publicadas. (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Mientras existe una cantidad de métodos para medir identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por las personas con destreza (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).
60
65

Si cualquier molécula de ácido nucleico particular es al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico, por ejemplo a la secuencia de ácido nucleico nBT062, o una parte de la misma, cada una puede determinarse en forma convencional utilizando programas de computadora conocidos tales como el programa DNAsis (Hitachi Software, San Bruno, Calif.) para alineamiento de secuencia inicial seguido por ESEE version 3.0 DNA/protein sequence software (cabot@trog.mbb.sfu.ca) para alineamientos de múltiples secuencias.

Si la secuencia de aminoácidos es al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica, por ejemplo a SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o una parte de los mismos, puede determinarse en forma convencional utilizando conocidos programas de computadora tales como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias.

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

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

Como se discutió anteriormente, BT062 es un inmunocombinado que comprende el anticuerpo quimérico dirigido a CD138 que se conecta mediante un enlazador, aquí SPDB, al derivado maitansinoide citostático DM4. Una representación química de BT062 se proporciona en las **Figuras 1 y 2**. Inmunocombinados que comprenden nBT062 y una molécula efectora maitansinoide a menudo se caracterizan en términos de su enlazador y efector maitansinoide, por ejemplo, nBT062-SMCC-DM1, es un inmunocombinado que comprende nBT062, SMCC (un enlazador "no segmentable" que contiene un enlace tioéster) y DM1 como un efector. En forma más genérica, un inmunocombinado que contiene nBT062 y una molécula efectora también puede describirse como un efector-enlazador-nBT062 o solo como un efector nBT062 (nBT062N, en donde N es cualquier efector descrito aquí (véase también la Publicación de Patente de los E.U.A. 20090232810).

En un ejemplo, BT062 liga a células de mieloma múltiple positivas a CD138. Una vez que la célula diana internaliza y/o libera inmunocombinado, DM4 se libera de la molécula dirigida, de esta manera restaurando su potencia citotóxica original de DM4. De esta manera, BT062 proporciona una carga útil de anticuerpo dirigido (TAP = Targeted Antibody Payload), en donde el enlace funcional de DM4 a nBT062 mantiene inactivo el fármaco citotóxico hasta que llega/se internaliza en la célula dirigida que expresa CD138.

Los datos de estudios no clínicos que investigan citotoxicidad de BT062 en células de mieloma múltiple y modelos de animales aquí discutidos, demuestran que BT062 tiene actividad antimieloma altamente significativa a dosis que son bien toleradas en un modelo murino.

Se ha realizado un estudio de una sola dosis repetida, con escala de dosis, etiqueta abierta de fase I en pacientes con mieloma múltiple de relapso o de relapso/refractario (publicación de patente de EE.UU.: 20110123554; publicación internacional WO 2010 128087).

Los inmunocombinados aquí descritos pueden ser administrados por cualquier ruta, incluyendo en forma intravenosa, parenteral, oral, intramuscular, intratecal o como un aerosol. El modo de suministro dependerá del efecto deseado. Una persona con destreza fácilmente sabrá la mejor ruta de administración para un tratamiento particular de acuerdo con la presente invención. La dosis apropiada dependerá de la ruta de administración y el tratamiento indicado y puede determinarse fácilmente por una persona con destreza en la especialidad en vista de los protocolos de tratamiento actuales.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el inmunocombinado de la presente invención y/o cualquier agente citotóxico adicional como ingredientes activos pueden prepararse de acuerdo con técnicas de formulación farmacéutica convencionales. Ver, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a Ed. (1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Típicamente, cantidades efectivas de ingredientes activos se mezclarán con un vehículo farmacéutico aceptable. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, intravenosa, oral, parenteral, intratecal, transdérmica o por aerosol.

Las combinaciones anticáncer de la presente invención preferentemente ya pueden ser en la forma de composiciones farmacéuticas o en la forma de kits que comprenden los componentes de la combinación anticáncer

en diferentes recipientes. Los componentes del kit habitualmente se administran en combinación entre sí, a menudo son co-administrados ya sea en una forma de dosis combinada o en formas de dosis separadas. Estos kits también pueden incluir, por ejemplo otros componentes, un dispositivo para administrar los componentes o combinación, un dispositivo para combinar los componentes y/o instrucciones de cómo utilizar y administrar los componentes.

5 Para administración oral, el inmunoconjugado y/o agente citotóxico pueden formularse en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, tabletas, pastillas, fusiones, polvos, suspensiones o emulsiones. Para preparar las composiciones en forma de dosis oral, cualquiera de los medios farmacéuticos usuales pueden ser empleados, tales como por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservadores, agentes colorantes, agentes de suspensión, y semejantes en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y semejantes en el caso de preparaciones sólidas orales (tal como por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas). Debido a su facilidad de administración, tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosis oral más ventajosa, en cuyo caso vehículos farmacéuticos sólidos se emplean obviamente. Si se desea, las tabletas pueden ser de revestimiento con azúcar o revestimiento entérico por técnicas estándar. El agente activo debe ser estable para el paso a través del tracto gastrointestinal. De ser necesario, agentes convenientes para paso estable pueden emplearse, y pueden incluir fosfolípidos o derivados de lecitina descritos en la bibliografía, así como liposomas, micropartículas (incluyendo microesferas y macroesferas).

20 Para administración parenteral, el inmunoconjugado y/o agente citotóxico pueden disolverse en un vehículo farmacéutico y administrarse ya sea como una solución o una suspensión. Son ilustrativos de vehículos convenientes agua, salino, solución amortiguada con fosfato (PBS = Phosphate Buffer Solution), soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol, o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El vehículo también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservadores, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y semejantes. Cuando el agente dirigido en un conjugado y/o inmunoconjugado y/o agente citotóxico se administran en forma intracerebroventricular o intratecal, también puede ser disuelto en fluido cerebroespinal.

30 Dosis administradas a un sujeto pueden ser especificadas como cantidad, por área superficial del sujeto (que incluye humanos así como animales no humanos). La dosis puede estar en un régimen de dosis sencilla (múltiple), generalmente que dura 21 días, administrar a este sujeto en cantidades, preferentemente pero no en forma exclusiva de aproximadamente 5 mg/m^2 a aproximadamente 300 mg/m^2 , incluyendo aproximadamente 10 mg/m^2 , aproximadamente 20 mg/m^2 , aproximadamente 40 mg/m^2 , aproximadamente 50 mg/m^2 , aproximadamente 60 mg/m^2 , aproximadamente 80 mg/m^2 , aproximadamente 100 mg/m^2 , aproximadamente 120 mg/m^2 , aproximadamente 140 mg/m^2 , aproximadamente 150 mg/m^2 , aproximadamente 160 mg/m^2 y aproximadamente 200 mg/m^2 . En un régimen de múltiples dosis (repetidas), la dosis agregada puede ser administrada dentro de un ciclo, en general que dura 21 días, a este sujeto puede preferentemente pero no en forma exclusiva ser de 120 mg/m^2 a aproximadamente 840 mg/m^2 , incluyendo aproximadamente 120 mg/m^2 , aproximadamente 130 mg/m^2 , aproximadamente 140 mg/m^2 , aproximadamente 150 mg/m^2 , aproximadamente 180 mg/m^2 , aproximadamente 195 mg/m^2 , aproximadamente 240 mg/m^2 , aproximadamente 300 mg/m^2 , aproximadamente 360 mg/m^2 , aproximadamente 420 mg/m^2 , aproximadamente 450 mg/m^2 , aproximadamente 480 mg/m^2 , 600 mg/m^2 , 720 mg/m^2 aproximadamente 840 mg/m^2 . La dosis agregada se administra preferentemente en al menos tres dosis individuales, en donde la administración de la dosis puede ser isócrona, por ejemplo una vez cada semana, preferentemente los días 1, 8, 15 o anisócrona, dentro de por ejemplo un periodo de 21 días. Dosis individuales administradas pueden ser aproximadamente $3 \times 40 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 50 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 60 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 65 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 80 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 100 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 120 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 140 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 150 \text{ mg/m}^2$, aproximadamente $3 \times 160 \text{ mg/m}^2$, $3 \times 200 \text{ mg/m}^2$, $3 \times 240 \text{ mg/m}^2$ aproximadamente $3 \times 280 \text{ mg/m}^2$.

50 Los inmunoconjugados se administran convenientemente de inmediato o sobre una serie de tratamientos. En un régimen de múltiples dosis, estas cantidades pueden ser administradas una vez al día, una vez a la semana o una vez cada dos semanas. Cargar dosis con una sola dosis alta o en forma alterna dosis menores que se administran brevemente una después de otra seguidas de dosis sincronizadas e intervalos más prolongados, constituye una realización preferida de la presente invención. Por ejemplo, en un régimen de múltiples dosis, una dosis de carga en cualquier cantidad entre 100 a 160 mg/m^2 puede ser combinada con una o más dosis de 40 a 100 mg/m^2 . En una realización preferida, la sincronización de las dosis se ajusta para un sujeto de manera tal que haya pasado tiempo suficiente antes de un tratamiento segundo y/o cualquiera subsecuente de manera tal que la dosis previa haya sido substancialmente metabolizada, pero la cantidad de inmunoconjugado presente en el sistema del sujeto todavía inhibe, retrasa y/o evita el crecimiento de un tumor. Un régimen de "múltiples dosis repetidas" ejemplar comprende administrar dosis de inmunoconjugado de aproximadamente 10 , 20 , 40 , 50 , 60 , 65 , 80 , 100 , 120 , 140 , 160 , 180 , 200 , 220 o 240 mg/m^2 una vez cada semana. En forma alterna, una dosis alta inicial por ejemplo de 160 mg/m^2 puede ser seguida por una dosis de mantenimiento de una, dos o tres-semanas por ejemplo de aproximadamente 20 mg/m^2 . Otras combinaciones pueden evaluarse fácilmente por la persona con destreza en la técnica. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosis. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. Las dosis pueden variar entre otros, dependiendo de si se administran para propósitos preventivos o terapéuticos, el curso de cualquier terapia previa, la historia clínica del paciente, el estado de la enfermedad del paciente, la carga de tumor de paciente, la predisposición genética del paciente, las enfermedades concomitantes

del paciente, la etapa de la enfermedad antes el primer tratamiento y respuesta al agente dirigido/inmunoconjugado, los efectos secundarios experimentados por el paciente y la discreción por el médico a cargo.

5 Cuando una dosis X de un inmunoconjugado se dice que **excede significativamente** otra dosis Y, significa que una dosis total (por ejemplo, agregada) X excede la dosis total (por ejemplo, sencilla) Y en al menos 10 % (por ejemplo, si la dosis X es 100 mg/m², una dosis Y que excede significativamente X es al menos 110 mg/m²), preferentemente aproximadamente 20 % más preferible aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o incluso más.

10 La expresión **dosis individual** en particular es cuando se utiliza en el contexto de un régimen de múltiples dosis empleado para describir una dosis definida suministrada en una sola administración y puede ser contrastada a la **dosis agregada** administrada, por ejemplo en un **ciclo de tratamiento** activo, que es la suma de las dosis individuales administradas en el ciclo de tratamiento. Por ejemplo, tres dosis individuales en un ciclo de tratamiento activo duran, por ejemplo 21 días de 100 mg/m² resultan en una dosis agregada de 300 mg/m².

15 El nivel de un inmunoconjugado en un fluido corporal del paciente tal como por ejemplo el plasma del paciente o suero o plasma, se mide por métodos bien conocidos en la técnica. Niveles en plasma pueden evaluarse mediante un ensayo farmacocinético (PK) diferente como el descrito bajo Materiales y Métodos. Los niveles del inmunoconjugado en el suero o plasma u otro fluido corporal derivado de sangre, en general se determina 2 a 4 horas después del inicio de la administración respectiva, respectivamente, en donde las administraciones preferentemente están en la forma de una infusión. Esto corresponde en general a 0-2 horas después de completar una administración, en particular una infusión.

25 La presente invención en una realización se dirige a una terapia de mantenimiento. Como puede verse en la Figura 28, terapia de largo plazo con hasta 160 mg/m² una vez cada 21 días logra exitosamente enfermedad estable o incluso respuesta menor, pero al menos supervivencia libre de progreso. La Figura también muestra que las concentraciones en plasma de BT062 aumentan con el tiempo indicando una disminución de la carga de tumor bajo tratamiento. Este tipo de terapia es bien adecuado para seguir un régimen de múltiples dosis repetidas por ejemplo administración semanal. Una terapia de mantenimiento típica con dosis de hasta 160 mg/m² una vez cada tres semanas, puede seguir un régimen de múltiples dosis repetidas (por ejemplo una vez cada semana o por tres semanas). Dependiendo de la carga de tumor, reducir las dosis puede ser empleado, con lo que por ejemplo niveles en plasma del inmunoconjugado u otros parámetros relevantes pueden servir para determinar la dosis apropiada para terapia de mantenimiento. El mantenimiento puede lograrse por niveles umbral del inmunoconjugado, que están presentes/son mantenidos permanentemente en el sujeto, de manera tal que hay una cantidad constante de inmunoconjugado disponible. En una realización preferida, un tumor en un sujeto/las células diana se exponen permanentemente al inmunoconjugado, de manera tal que no pueden crecer nuevas células de tumor, o se destruyen rápidamente debido a una presencia constante del inmunoconjugado en el sujeto, que se refleja por un cierto nivel medible del inmunoconjugado en el sujeto, por ejemplo en plasma.

40 La terapia de mantenimiento preferentemente reduce la frecuencia de administración. Sin embargo, otras terapias de mantenimiento resultan en particular en por ejemplo dosis agregadas reducidas de inmunoconjugado que se administra, también se prefieren. El diseño particular de una terapia de mantenimiento dependerá entre otras cosas de la carga de tumor. El nivel de inmunoconjugado y/u otros parámetros de eficacia en sangre tales como proteína M, FLC o un marcador específico de tumor/cáncer pueden determinarse en un fluido corporal, tal como el plasma, suero u orina del sujeto (paciente) y la dosis de mantenimiento y frecuencia de la dosis pueden hacerse dependientes del nivel o un cambio en el nivel del parámetro de eficacia en sangre. Un kit que puede ser empleado en este así como otros contextos de la presente invención puede incluir marcadores, en particular anticuerpos, preferentemente anticuerpos etiquetados, contra el inmunoconjugado, por ejemplo contra la porción de toxina del inmunoconjugado, que puede emplearse para cuantificar el inmunoconjugado en un fluido corporal de un sujeto. Una señal que se obtiene del enlace por ejemplo del anticuerpo etiquetado, puede estar correlacionada con la cantidad de inmunoconjugado presente en el fluido corporal de un sujeto. Niveles de dosis individuales convenientes, tanto para múltiples dosis repetidas así como dosis sencillas repetidas, para terapia de mantenimiento son por ejemplo 60-160 mg/m².

55 Los periodos libres de tratamiento prolongados pueden ser beneficiosos para el paciente. Sorprendentemente, se encontró que después de incluso un periodo de reposo prolongado (véase los días 400 a 421) todavía puede mantenerse una enfermedad estable (véase la Figura 28).

60 La presente invención, en una realización, se dirige a un régimen de administración, preferentemente con una eliminación rápida de plasma. El régimen proporciona en general menos de aproximadamente 280 mg/m², menos de 120 mg/m², menos de 100 mg/m², menos de 80 mg/m², incluyendo no más de aproximadamente 40 mg/m², más preferible no más de aproximadamente 20 mg/m², aún más preferible no mayor que aproximadamente 10 mg/m² en una semana determinada por al menos tres semanas consecutivas que definen un intervalo (ciclo). El intervalo de 10 mg/m² a 280 mg/m² se traduce en una dosis diaria promedio de aproximadamente 1,43 mg/m² a 40 mg/m². De esta manera, dosis diarias promedio de aproximadamente 4 mg/m² a aproximadamente 17,14 mg/m², incluyendo aproximadamente 5,7 mg/m², aproximadamente 7,1 mg/m², 8,58 mg/m², 9,28 mg/m², 11,4 mg/m², 14,28 mg/m², 17,1 mg/m², 22,85 mg/m², 25,7 mg/m² (180 mg/m²), 28,58 mg/m² 34,2 mg/m², 40 mg/m² son parte de la presente invención. Esquemas de administración de dosis bajas hasta de 100 mg/m² se asocian con rápida eliminación de

plasma, en la fase de eliminación temprana, esto es, cualquier tiempo durante administración hasta dos horas después de que se completa la administración. Lo que distingue el régimen de administración de baja dosis de otros regímenes de bajas dosis es la rápida eliminación de plasma, que se define por una Cmax medida durante ese periodo que preferentemente es menor a 55 %, menor a 50 %, menor a 40 %, o menos que 35 % de Cmax teórica (Tablas 11).

Regímenes de administración están, a niveles superiores acompañados por una eliminación de plasma menos rápida, esto es por eliminaciones de plasma que exceden 55 %, a menudo 60 %, 70 % 80 % o 90 % del valor Cmax teórico, que se refiere aquí como moderados (igual o > 55 %, pero < 80 % del valor Cmax teórico) o eliminación de plasma lenta (igual o >80 % del valor Cmax teórico). A estas eliminaciones, se encontró de manera sorprendente que a pesar de la concentración relativa elevada del inmunocombinado en el plasma, estos regímenes de administración todavía no resultan en DLT. Esto a pesar del hecho de que los niveles de expresión de CD138 en células no diana que expresan CD138, por ejemplo células de órganos vitales, tales como el epitelio, que no son diana de ningún tratamiento, también son relativamente elevadas en CD138 (análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo BB4 CD138 muestran que la reactividad a este anticuerpo al epitelio corresponde con la de las células plasmáticas de paciente MM (Publicación de Patente de EE.UU. 20070183971)). Niveles de expresión de CD138 en células diana y no diana que producen calificaciones iguales (por ejemplo, más tres (+++) como en el ejemplo anterior) en análisis inmunohistoquímico se refieren aquí como niveles de expresión comparables y son parte de la presente invención. En una realización alterna, los niveles de expresión en células diana actualmente fueron consistentemente inferiores al epitelio (por ejemplo, más uno (+) o más dos (++) contra más tres (+++) para el epitelio). Algunas células diana de tumor muestran niveles de expresión mixtos, tales que, algunas células tienen un nivel de expresión de más dos y algunas un nivel de expresión de más tres. El promedio de un número representativo de células (tal como 100 células muestreadas al azar) determinará si estas células diana de tumor en cuestión caen bajo la definición de tener niveles de expresión comparables o inferiores al epitelio. Estos regímenes de tratamiento en general están sobre 40 mg/m², pero inferiores a 180 o incluso 280 mg/m² suministradas semanalmente al menos por tres semanas consecutivas que definen un ciclo de tratamiento activo que se traduce en dosis diarias de aproximadamente 5,71 mg/m² a aproximadamente 25,71 mg/m² (180), 40 mg/m² (280).

Con respecto al Paciente 8 (véase la Figura 18 para numeración) fue notable, que ese paciente durante todo el tratamiento de 168 días, mientras que hubo un aumento en FLC hasta el día 141, no hubo progreso de la enfermedad (véase también Figura 21), que refleja la eficacia de administración de BT062, mientras que el Paciente 6 no mostró progreso de la enfermedad durante 6 ciclos (Figura 20).

La Figura 19B demuestra claramente que una cantidad constante de aproximadamente 20 µg/ml se pierde, supuestamente durante infusión. Esto se ha calculado para la diferencia entre los niveles de plasma (definidos aquí como Cmax) determinados en las muestras y el valor Cmax teórico alcanzable. En la Tabla 11c, los valores absolutos para el nivel en plasma determinado entre 0 y 2 horas después del fin de infusión se exhiben y comparan con los valores en plasma de Cmax que se logran teóricamente ("Cmax Teórico" como se calcula por la fórmula a continuación)

La Cmax teórica se calcula de acuerdo con los siguientes parámetros estimados:

Área Superficial del Cuerpo de los Pacientes	1,9 m ²
Peso de Pacientes	70 Kg
Pacientes	40 ml/kg
<u>(Dosis administrada x área superficial)/peso corporal</u>	
Volumen de Plasma	

En ciertas realizaciones, la invención también se dirige a un régimen de tratamiento, en donde la dosis puede ser adaptada de acuerdo con el nivel medido de un parámetro de eficacia en sangre que se encuentra en un fluido corporal tal como plasma. Esto permite un tratamiento ajustado a la medida del paciente. Por ejemplo, la dosis de BT062 puede ser adaptada de acuerdo con niveles en plasma determinados entre 0 y 4 horas después de completar una administración, tal como una infusión.

Como puede verse en la Figura 29, el parámetro proteína M (disminuye en su nivel) indicado en esta mejora de la enfermedad del paciente. Al mismo tiempo, niveles en plasma (valores Cmax) de BT062 aumentan. Con crecientes ciclos de tratamiento, la carga de tumor se reduce y de manera concomitante, niveles en plasma ("valores Cmax") determinados en el plasma después de 0-4 horas tras completar la infusión con BT062 aumentan, de manera tal que una correlación negativa entre el nivel de proteína M y Cmax se observa. El aumento en valores Cmax puede explicarse por una disminución en volumen de tumor, que significa que menos células de tumor están presentes, lo que se refleja en la disminución en nivel de Proteína M. Menos CD138 como una fuente diana llevarán a menos sitios de enlace para BT062. Como consecuencia, se detectará más BT062 en el plasma. De esta manera, los valores Cmax pueden emplearse para evaluar la respuesta a tratamiento (aumento en Cmax se correlaciona con eficacia). Si, en un caso determinado, los valores Cmax aumentan, cuando se comparan con Cmax de una inyección previa (o cualquier inyección, en donde no se ve eficacia) por ejemplo 10 %, 20 % o más, esto indica que hay menos sitios de enlace en el tumor están presentes y que de esta manera disminuyó el tamaño del tumor. En este ejemplo,

la dosis puede ajustarse a una dosis menor en el siguiente ciclo de tratamiento. Como resultado, una cantidad menor de fármaco se requiere y pueden evitarse toxicidades.

Una **dosis sencilla repetida**, se refiere a una secuencia de administraciones, en donde la administración que sigue una administración se considera independiente de esta administración precedente. De esta manera, en el presente contexto, el nivel de inmunoc conjugado en la sangre de un sujeto puede considerarse como igual después de cada administración. Cada vez que se administra el inmunoc conjugado, se espera que iguales niveles de inmunoc conjugado estén inicialmente presentes en la sangre.

Los intervalos de administración entre las “dosis sencillas” de las dosis sencillas repetidas se definen de acuerdo con la vida media calculada teórica de un isotipo de un inmunoc conjugado en el caso de BT062, IgG4.

En general, la vida media de anticuerpos terapéuticos depende primordialmente de las características de anticuerpo/sus aspectos estructurales (por ejemplo enlace a receptores Fc) y la diana. Por ejemplo, la afinidad de enlace de la parte Fc al receptor neonatal FcRn está afectando la vida media. Al ligar a FcRn en endosomas, el anticuerpo es rescatado de degradación liposómica y reciclado a la circulación, lo que prolonga la vida media. Para un IgG4, una vida media de 15,6 (+/- 4,5) días (Alyanakian et al., 2003; Salfeld et al., 2007) se ha informado. En el estudio referido aquí, una “dosis sencilla repetida” se ha seleccionado que tiene intervalos de administración de tres semanas. Sin embargo, aproximadamente tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, pero también aproximadamente cinco o aproximadamente seis semanas son intervalos alternos para dosis sencillas repetidas. Una referencia a “aproximadamente” se refiere en el contexto de tres semanas a +/- 96 horas y en el contexto de cuatro a seis semanas a +/- 120 horas.

Un **régimen de múltiple dosis o múltiples dosis** se refiere a una secuencia de administraciones, en donde la administración después de una administración se considera dependiente de la administración precedente. De esta manera, en el presente contexto, el nivel de inmunoc conjugado en la sangre de un sujeto se espera en una segunda administración y posteriores que esté por encima del nivel base que existía antes de la administración inicial. En cada administración después de la administración inicial del inmunoc conjugado, un cierto nivel del inmunoc conjugado se espera que esté presente en la sangre. Intervalos de administración entre las “dosis” individuales de las múltiples dosis se definen, como en el contexto de dosis sencillas repetidas, de acuerdo con la vida media calculada teórica de un isotipo de un inmunoc conjugado, en el caso de BT062, IgG4. Para una IgG4 una vida media de 15,6 (+/- 4,5) días (Alyanakian et al., 2003; Salfeld et al., 2007) se ha informado. En el estudio aquí referido, se ha seleccionado una “dosis múltiple” que tiene intervalos de administración de una semana. Sin embargo, incluso intervalos de administración más cortos pueden seleccionarse tales como 4 días o incluso 3 días. En forma alterna, un intervalo más largo puede seleccionarse. Sin embargo, como mínimo una dosis múltiple implica al menos 2 administraciones en un periodo de 21 días. Una referencia a “aproximadamente” se refiere en el contexto de una semana a +/- 32 horas, en el contexto de 4 días, +/- 18 horas y en el contexto de 3 días +/- 12 horas. Una dosis múltiple repetida se refiere a múltiples dosis administradas en ciclos de tratamiento posteriores, que pueden incluir uno o varios periodos de reposo intermitentes o uno o varios periodos libres de tratamiento, incluyendo prolongado o prolongados periodos de reposo o periodo o periodos libres de tratamiento, que no destruyen en todos los efectos la o las múltiples dosis previamente administradas.

El nivel actual de inmunoc conjugado después de la primera y cada subsecuente administración, sin embargo depende de la “eliminación” de facto del inmunoc conjugado por ejemplo del plasma (“eliminación de plasma”) inmediatamente durante/después de completar la administración, en particular, 0-2 horas después de completar la administración. A 40 mg/m² el tiempo de infusión mediano fue 40 min dentro de un intervalo de 32 min a 1 hora 30 min. A nivel de dosis de 120 mg/m² el tiempo de infusión mediano fue 2 horas 2 min dentro de un intervalo de 1 hora 40 minutos a 2 horas 30 minutos. De acuerdo con esto, en una administración IV, aproximadamente 1 mg/m² puede en ciertas realizaciones ser administrada en promedio por minuto, pero tiempos de administración de aproximadamente 1 mg/m² por 30 segundos a aproximadamente 1 mg/m² por 120 segundos están bien dentro del intervalo. De manera sorprendente, se encontró que BT062 se libera plasma considerablemente más rápido que cualquiera de los valores esperados teóricos o los valores encontrados con inmunoc conjugados similares. Esta observación permite el diseño de nuevos regímenes de administración para el inmunoc conjugado tanto solo en una monoterapia al igual que en combinación con otros agentes relevantes, en particular agentes citotóxicos para proporcionar combinaciones anticáncer eficaces.

Cantidad efectiva agregada es la cantidad efectiva de inmunoc conjugado que se administra dentro de un periodo de un régimen de dosificación, preferentemente en dosis iguales, por ejemplo una vez a la semana, por ejemplo tres semanas tal como los días 1, 8 y 15 de un régimen de dosificación de 21 días o los días 1, 8, 15 de un régimen de dosificación de 28 días en donde no se administra dosis el día 22.

El avance de la terapia se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. La dosis puede variar entre otros, dependiendo de si se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, el curso de cualquier terapia previa, la historia clínica del paciente, el estado de enfermedad del paciente, la carga de tumor del paciente, la predisposición genética del paciente, las enfermedades concomitantes del paciente, la etapa de enfermedad ante primer tratamiento y respuesta al agente dirigido/inmunoc conjugado, los efectos secundarios experimentados por el paciente y la discreción del médico a cargo.

Las ventajas de un régimen de baja dosis son de amplio rango. Sin embargo, la ventaja probablemente más

significante es reducir el riesgo de efectos secundarios adversos. Mientras que los inmunoconjugados en general permiten discriminación sensible entre células diana y normales, resultando en menos efectos secundarios tóxicos que la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, muchos inmunoconjugados todavía no están completamente libres de efectos secundarios. A pesar de una superior dirección, el antígeno de interés en general también se expresa en células no cancerosas cuya destrucción durante la terapia puede llevar a efectos secundarios adversos. En el caso de CD138, el antígeno en particular se expresa en células epiteliales. También, el inmunoconjugado puede someterse a procesamiento dentro del cuerpo que no está relacionado con progresión en o en una célula objetivo y un cierto porcentaje de molécula efectora puede desprenderse en sitios remotos de las células diana lo que lleva a efectos secundarios tóxicos.

Se mostró que el inmunoconjugado de la presente invención fue eficaz a bajas dosis, mientras que exhibe toxicidades clínicamente aceptables (dosis de hasta 160 mg/m² suministradas una vez cada tres semanas). A dosis de hasta al menos 120 mg/m² pero en cualquier caso a dosis menores a 160 mg/m² (suministradas una vez cada tres semanas (por ejemplo el día 1), el inmunoconjugado probado también mostró rápida eliminación de plasma en sujetos humanos. Las **Tablas 9 y 10** muestran la eliminación observada (en regímenes de dosis sencillas repetidas).

Tabla 9: Concentraciones en plasma después del fin de infusión y valores promedio de cmax efectivos de BT062 de plasma que se obtienen de pacientes que han recibido una sola dosis/dosis sencilla repetida de BT062 (primer y cuarto ciclo). Una administración de dosis repetida en ciclos de 21 días. Valores Cmax se obtuvieron entre 0 y 2 horas posteriores a infusión. Ciclos de administración: ciclo 1: día 1, ciclo 2: día 22; ciclo 3: día 43; ciclo 4: día 64 etc.

Dosis BT062 (mg/m ²)	Nivel de plasma de BT062 (µg/ml) humano		
	cmax teórica	cmax eficaz (ciclo 1) promedio (más bajo; más alto)	cmax eficaz (ciclo 4) promedio (más bajo; más alto)
10	7	1,11	n.a.
20	14	2,9 (1,66; 4,44)	7,06 (6,79; 7,34)
40	27	4,31 (0,97; 9,86)	2,51 (1,02; 3,68)
80	54	18,8 (13,4; 23,6)	14,2 (7,4; 21)
120	81	21,4 (15,1; 28,7)	n.a.
160	109	81,2 (73,7; 85,5)	77,4
200	136	82,0 (68,0; 102,4)	n.a.

n.a. = datos no disponibles

Tabla 10: Valores promedio Cmax efectivo de BT062 de plasma que se obtienen en pacientes que han recibido una sola dosis/dosis sencilla repetida de BT062 (primer y cuarto ciclos). Administración de dosis repetida en ciclos de 21 días. Valores máximos se obtuvieron dentro de las primeras 2 horas posteriores a inyección. Valores cmax se obtuvieron entre 0 y 2 horas posteriores a infusión. Cmax efectiva se indica en porcentaje de Cmax teórica calculada. Ciclos de administración: ciclo 1: día 1, ciclo 2: día 22; ciclo 3: día 43; ciclo 4: día 64 etc.

Dosis BT062 (mg/m ²)	Nivel de plasma de BT062 (µg/ml) humano				
	cmax teórica	cmax eficaz (ciclo 1)	Porcentaje de cmax teórico (n)	cmax eficaz (ciclo 4)	Porcentaje de cmax teórico (n)
10	7	1,1	15 % (3)	n.a.	n.a.
20	14	2,9	20 % (4)	7,06	49 % (2)
40	27	4,31	16 % (3)	2,51	9 % (3)
80	54	18,8	34 % (3)	14,2	26 % (2)
120	81	21,4	26,5 % (3)	n.a.	n.a.
160	109	81,2	74,5 % (4)	77,4	71 % (1)
200	136	82,0	60 % (3)	n.a.	n,a

n.a. = datos no disponibles
n: número de pacientes

La Cmax teórica se calculó como se describió anteriormente.

Aunque la vida media de BT062 en plasma de sujetos humanos tratados demostró ser significativamente menor que la vida media en plasma que se observa en monos cynomolgus (días) y en plasma humano ex vivo (14 días), el inmunoconjugado aún mostró eficacia en los sujetos humanos, incluso a administraciones tan bajas como 20 mg/m² sugiriendo una dirección de tumor acelerada y enlace de células de tumor que resulta en una efectividad aumentada.

La dirección de tumor acelerada puede confirmarse al medir la ocupación del receptor (CD138) en múltiples células de mieloma en la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Como puede verse en la Tabla 11e a diferentes regímenes de múltiples dosis repetidas, la ocupación de receptor en el sitio de tumor en la médula ósea se acerca a 100 % dentro de cuatro horas después del fin de la administración del inmunoc conjugado, soportando una dirección de tumor acelerada mediada por anticuerpo. De acuerdo con esto, la presente invención se dirige a inmunoc conjugados que tienen una temprana, esto es 0-12, 0-10, 0-8, 0-6 o 0-4 horas después de completar la administración, de ocupación de receptor de tejido objetivo (CD138) entre 70-100 %, preferentemente 80-100 %, más preferible 90-100 %, aún más preferible más que 94, 95, 96, 97 o 98 % "ocupación de receptor" (RO). El "receptor" aquí es CD138 y RO se mide de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$RO = (MFI \text{ Muestra 1} - MFI \text{ Muestra 3}) / (MFI \text{ Muestra 2} - MFI \text{ Muestra 3})$$

MFI = Intensidad de Fluorescencia Promedio medida por citometría de flujo

Muestras de células de mieloma en aspirados de médula ósea.

Muestra 1: Inmunoc conjugado ligado, aquí, BT062 se tiñó con anticuerpos anti-May (May= maitansinoide).

Muestra 2: Total CD138 se midió con anticuerpos anti-May después de saturación de receptor con el inmunoc conjugado.

Muestra 3: Medición de enlace no específico por incubación con un anticuerpo de isotipo IgG1.

Como se anotó anteriormente, eliminación rápida inusual del plasma de pacientes MM tratados se observó en la fase de eliminación temprana (ya observado durante infusión y aproximadamente 0 a 2 horas posterior a infusión, por lo tanto completa infusión) seguido por fase de eliminación normal generalmente a niveles de dosis de hasta 120 mg/m², mientras que un perfil de eliminación más típico se observa para todos los 4 pacientes a las dosis de 160 mg/m² y 200 mg/m² (3 pacientes), aún cuando la eliminación todavía está por debajo del valor C_{max} teórico. Además, en los regímenes de administración que muestran rápida eliminación de plasma en la fase temprana de eliminación, por ejemplo 20, 40, 80 y 120 mg/m² no solo se observó rápida eliminación de plasma en la fase temprana de eliminación, sino una respuesta (disminución de proteína M en orina) se observó, incluyendo respuestas que se manifiestan en una disminución de proteína M en orina en más de 50 % después de **dosis sencillas repetidas (resultados no mostrados)**.

Como se discutió anteriormente, los datos soportan que la eliminación rápida de plasma de pacientes MM tratados observados en la eliminación temprana puede correlacionarse con una elevada ocupación de receptor en las células diana.

De manera sorprendente, se encontró que en un régimen de múltiples dosis ocurrió una rápida eliminación de plasma a dosis agregadas que están bien por encima de 120 mg/m² y de hecho cerca de DLT determinada de 160 mg/m² para un régimen de una sola dosis repetida, que abrió la posibilidad para mono-terapias o de combinación potentes debido a las bajas toxicidades del inmunoc conjugado en el régimen de múltiples dosis.

La **Tabla 11a** muestra el % de valores C_{max} teóricos que siguen esquemas de administración semanales dosificados diferentes que duran 3 semanas (21 días), por lo tanto regímenes de múltiples dosis. El porcentaje de C_{max} teórico en la cohorte de 65 mg/m² es superior que en las cohortes de menor dosis mostrada:

Tabla 11a: % de C_{max} teórico: CX se refiere al número de ciclo: C1 es el ciclo 1, en donde cada ciclo es de 21 días de longitud seguido por una semana libre de tratamiento (o cada ciclo se considera de 28 días de duración sin administración el día 22). DX es el día dentro del ciclo en el cual el inmunoc conjugado se administra; D8 es el día 8 del ciclo. El % de C_{max} teórico se calcula como se estableció anteriormente. La alta desviación estándar para 100 mg/m² y los percentiles relativos menores de C_{max} a 120 mg/m² indican que los altos percentiles a 100 mg/m² son una desviación.

	40 mg/m ²	50 mg/m ²	65 mg/m ²	80 mg/m ²	100 mg/m ²	120 mg/m ²
C1, D1	29 %	24 %	43 %	42 %	61 %	69 %
C1, D8	39 %	29 %	63 %	42 %	81 %	74 %
C1, D15	43 %	31 %	72 %	44 %	89 %	79 %
C2, D1	33 %	26 %	52 %	45 %	94 %	62 %
C2, D8	37 %	40 %	61 %	50 %	102 %	67 %
C2, D15	41 %	35 %	52 %	43 %	111 %	67 %
C3, D1	28 %	30 %	52 %	39 %	109 %	
C3, D8	30 %	29 %	71 %	53 %	121 %	
C3, D15	26 %	35 %	73 %	41 %	142 %	
C4, D1	24 %	24 %			125 %	
C4, D8	30 %	45 %			123 %	
C4, D15	35 %	42 %			135 %	
Promedio (%)	33 %	33 %	60 %	44 %	108 %	69 %

	40 mg/m ²	50 mg/m ²	65 mg/m ²	80 mg/m ²	100 mg/m ²	120 mg/m ²
<i>Desviación estándar</i>	6 %	7 %	11 %	4 %	24 %	6 %

Tabla 11b

	Conc. Faltante a Cmax teor. [mg/m ²]					
	40 mg/m ²	50 mg/m ²	65 mg/m ²	80 mg/m ²	100 mg/m ²	120 mg/m ²
<i>C1, D1</i>	19,3	25,7	24,9	31,5	26,5	25,4
<i>C1, D8</i>	16,4	24,2	16,3	31,4	13,0	21,6
<i>C1, D15</i>	15,5	23,5	12,2	30,5	7,2	17,5
<i>C2, D1</i>	18,2	24,9	21,2	29,7	4,3	31,2
<i>C2, D8</i>	16,9	20,3	17,3	27,0	-1,5	26,6
<i>C2, D15</i>	16,0	21,9	21,2	31,0	-7,7	26,8
<i>C3, D1</i>	19,4	23,8	21,3	33,0	-6,0	
<i>C3, D8</i>	19,1	24,2	12,8	25,8	-14,4	
<i>C3, D15</i>	19,9	21,9	11,7	32,1	-28,4	
<i>C4, D1</i>	20,6	25,8			-17,1	
<i>C4, D8</i>	19,0	18,8			-15,8	
<i>C4, D15</i>	17,7	19,7			-24,1	
<i>Promedio</i>	18,6	23,0	17,7	29,9	6,8	
<i>SD</i>	1,5	2,4	4,7	1,0	13,2	

Tabla 11c Tablas 11b y 11c: CX se refiere al número de ciclos. C1 es el ciclo 1, en donde cada ciclo es de 21 días de duración seguido por una semana libre de tratamiento (o cada ciclo se considera 28 días de duración sin administración el día 22). DX es el día dentro del ciclo en el cual el inmunoc conjugado se administra; D8 es el día 8 del ciclo. En 11b se muestran las concentraciones (mg/m²) en términos absolutos que, con base en Cmax actual, faltan en cada nivel de dosis para llegar a Cmax teórica. En 11c los números actuales por administración se ilustran, en el lado derecho, las concentraciones promedio en cada ciclo se ilustran. También es notable que la concentración promedio (11c) dentro de un ciclo y sobre los tres ciclos mostrados es comparable y constante. Aparte de una desviación a 100 mg/m², la concentración faltante también permanece relativamente constante.

	Concentración promedio faltante a Cmax teor. por ciclo					
	40 mg/m ²	50 mg/m ²	65 mg/m ²	80 mg/m ²	100 mg/m ²	120 mg/m ²
<i>C1, D1</i>	17,1	24,5	17,8	31,1	15,6	21,5
<i>C1, D8</i>						
<i>C1, D15</i>						
<i>C2, D1</i>	17,0	22,4	19,9	29,2	-1,7	28,2
<i>C2, D8</i>						
<i>C2, D15</i>						
<i>C3, D1</i>	19,5	23,3	15,3	30,3	-16,3	
<i>C3, D8</i>						
<i>C3, D15</i>						
<i>C4, D1</i>	19,1	21,4			-19,0	
<i>C4, D8</i>						
<i>C4, D15</i>						

La **Tabla 11d** representa los valores promedio del nivel de plasma (µg/ml) de inmunoc conjugado a niveles de dosis entre 40 y 120 mg/m² antes y después de la administración semanal. El nivel en plasma promedio antes de la siguiente administración ("antes de la siguiente dosis") empieza a aumentar ligeramente. A 65 y 80 mg/m², niveles en plasma antes de la siguiente dosis permanece sobre 1 µg/ml. A 100 y 120 mg/m², el nivel antes de la siguiente administración está entre aproximadamente 2 y 4 µg/ml, de esta manera los niveles en plasma de tratamiento posteriores, son algo superiores que aquellos en el primer ciclo, indicando algo de acumulación antes de la siguiente inyección.

ES 2 684 950 T3

Dosis (mg/m ²)	Tiempo (días)	Paciente	Nivel en Plasma/ Prom. (µg/ml)	SD (µg/ml)
40	Pre-dosis	4	0	0
40	0 (día de administración), 2 (h después de completar la administración)	4	7,78	2,23
40	Antes de la siguiente dosis	4	0,69	0,33
40	7,2	4	10,67	4,93
40	Antes de la siguiente dosis	4	0,63	0,55
40	14,2	4	11,61	5,50
40	Antes de la siguiente dosis	4	0,70	0,62
50	Pre-dosis	3	0	0
50	0,2	3	8,20	0,90
50	Antes de la siguiente dosis	3	0,45	0,46
50	7,2	3	9,70	3,58
50	Antes de la siguiente dosis	3	0,49	0,45
50	14,2	3	10,43	3,47
50	Antes de la siguiente dosis	2	0,38	0,53
65	Pre-dosis	4	0	0
65	0,2	4	19,18	8,43
65	Antes de la siguiente dosis	4	1,41	0,66
65	7,2	4	27,83	8,95
65	Antes de la siguiente dosis	4	1,63	0,66
65	14,2	4	31,94	18,12
65	Antes de la siguiente dosis	4	1,77	0,93
80	Pre-dosis	3	0	0
80	0,2	3	22,81	3,20
80	Antes de la siguiente dosis	3	1,30	0,53
80	7,2	3	22,91	6,37
80	Antes de la siguiente dosis	3	1,27	0,68
80	14,2	3	23,81	6,46
80	Antes de la siguiente dosis	3	1,41	0,70
100	Pre-dosis	4	0	0
100	0,2	4	41,40	23,02
100	Antes de la siguiente dosis	3	3,77	0,78
100	7,2	3	54,85	24,34
100	Antes de la siguiente dosis	3	4,13	1,82
100	14,2	3	60,70	29,81
100	Antes de la siguiente dosis	3	6,04	2,63
120	Pre-dosis	2	0	0
120	0,2	2	56,00	32,46
120	Antes de la siguiente dosis	2	2,35	2,74
120	7,2	2	59,85	30,96
120	Antes de la siguiente dosis	2	2,50	6,68
120	14,2	2	63,90	28,82
120	Antes de la siguiente dosis	2	3,05	10,42

Tabla 12: Ocupación de Receptor (RO) en Régimen de Múltiples Dosis Repetidas: Ocupación de receptor de médula ósea se mide por citometría de flujo. Células de mieloma en aspirados de médula ósea se caracterizaron por tinción CD138 y CD38 (*no mostrado*). BT062 ligados se tiñen con anticuerpos anti-May (Muestra 1). El total de

CD138 se mide con anticuerpos anti-May después de saturación de receptor con BT062 (Muestra 2). La incubación con un anticuerpo de isotipo IgG1 determina enlace no específico a la muestra (Muestra 3). La ocupación de CD138 se calcula con la siguiente ecuación.

ID de Paciente	Nivel de Dosis Semanal (mg/m ²)	N.º de Ciclos a Term.	Ocupación de Receptor (RO)
12	80	C8D15*	99 %
12	80	C13D15**	37 %
12	80	C14D15**	51 %
22	140	C1D1*	86 %
23	140	C1D1*	Fondo a alto
26	140	C1D1*	95 %
28	140	C1D8**	58 %
24	140	C1D1*	94 %
25	140	C1D1*	98 %
30	160	C1D1*	98 %
31	160	C1D1*	76 %

$$5 \quad RO = (MFI \text{ Muestra 1} - MFI \text{ Muestra 3}) / (MFI \text{ Muestra 2} - MFI \text{ Muestra 3})$$

en donde, MFI = Intensidad de Fluorescencia Promedio

10 Cada ciclo duró 28 días con una administración de la dosis indicada los días 1, 8 y 15. C13D15, por ejemplo indica la dosis administrada el día 15 en el 13^{avo} ciclo. En tres de las anteriores, las mediciones se basan en muestras que se toman justo antes (dentro de 12 horas) a la siguiente administración y se marcan con doble asteriscos (**) y de esta manera más de 6 días después de la última administración. El resto de las mediciones se tomó directamente después de una administración de BT062, aquí con 4 o 12 o 24 horas después de completar la administración (*). Como puede verse, RO fue relativamente baja justo antes de la siguiente administración, mientras que RO fue alta después de administración.

15 La Figura 13 ilustra la rápida eliminación en plasma para administraciones de una sola dosis en el intervalo de 40 mg/m² a 120 mg/m², mientras que dosis superiores como se ilustra aquí con una dosis de 160 mg/m², mostraron eliminación de plasma cercana al valor teórico. La Figura 17 aclara que la rápida eliminación de plasma no puede atribuirse a un efecto tampón provocado por CD138 soluble. La Figura 14 muestra los valores Cmax medidos de BT062 comparados con los valores Cmax teóricos.

20 Las Figuras 19A y 19A así como la Tabla 11a ilustran la rápida eliminación de plasma en un esquema de administración que involucra múltiples dosis. Como puede verse en un esquema que involucra dosis individuales que se administran los días 1, 8 y 15 y que se agregan dentro de un ciclo (por ejemplo 21 días) casi a una dosis que corresponde a DLT de una dosis sencilla repetida (3x50 mg/m²= 150 mg/m², contra 160 mg/m²) del inmunoc conjugado, los valores Cmax actuales permanecen bien por debajo de 50 % del valor Cmax teórico, mientras que los niveles DLT en una sola dosis repetida, los valores Cmax actuales están bien por encima de 50 % el valor Cmax teórico.

25 La Tabla 11b muestra que a concentraciones en las cuales Cmax actual está en promedio bien por encima de 50 % de Cmax teórica, la concentración que falta para Cmax teórica, permanece en promedio, similar en los ejemplos suministrados, es decir alrededor de 20 µg/ml (véase también la Figura 19B). Esto puede dirigir hacia un "hundimiento", que "ab/adsorbes" una cierta porción del inmunoc conjugado rápidamente, pero se vuelve menos notable a medida que aumentan las dosis. De hecho, a 100 mg/m² este efecto parece que sólo ocurre durante la primera dosis individual. Sin embargo, rebotó a 120 mg/m² haciendo probable que 100 mg/m² sea una desviación. Sin embargo, el hundimiento de 20 µg/ml se observa aquí también a superiores ciclos.

30 De acuerdo con esto, la invención también se dirige a un método de pretratamiento con un agente dirigido, preferentemente un anticuerpo no conjugado que se alimenta en este hundimiento en lugar del inmunoc conjugado, que contiene moléculas efectoras, que no son sólo tóxicas, sino que en general también son costosas. Como una persona con destreza en la especialidad comprenderá, el hundimiento puede incluir células diana de tumor así como células que expresan CD138 de otros tejidos. De esta manera, en un aspecto de la invención, la cantidad constante de +/-20 µg/ml del inmunoc conjugado que consistentemente falta en llegar al valor Cmax teórico (Figura 19B) muy rápidamente después o durante infusión, por lo tanto se considera rápidamente que se ad-/absorba por/ligue al hundimiento (también aquí referido como "hundimiento de antígeno"). Este hundimiento se llena en esta realización no por el inmunoc conjugado sino por otro agente, preferentemente un agente que liga a CD138. En esta realización, en vez de tener que el inmunoc conjugado se ad-/absorba durante/después de administración, se administra un ad-/absorbente alterno, por ejemplo anticuerpo no conjugado. Considerando que el inmunoc conjugado se pierde en el hundimiento, y de esta manera potencialmente no contribuye al efecto terapéutico, puede emplearse un pretratamiento para a) reducir al mínimo las toxicidades que pueden relacionarse con el "hundimiento" y b) reducir la cantidad requerida de inmunoc conjugado para obtener resultados equivalentes.

Este pretratamiento puede consistir en administración de 20 µg/ml (+/-) de un anticuerpo anti-CD138 no conjugado o su fragmento, preferentemente nBT062 y puede llenar este hundimiento.

5 A dosis sencillas repetidas de 160 mg/m² que constituyen una baja dosis en comparación con esquemas de administración de otros inmunocombinados, perfiles de liberación o eliminación terminal fueron cercanos a lo normal, esto es, cercanos a los valores C_{max} teóricos. Sin embargo, una rápida reducción de FLC en el suero puede observarse después de sólo una administración sencilla, que se manifiesta en una respuesta parcial después de la 2^a, 3^a y 4^a administraciones (Figura 26).

10 Análogos y Derivados

15 Un experto en la materia de agentes terapéuticos, tales como agente citotóxicos, fácilmente comprenderá que cada uno de estos agentes aquí descritos puede ser modificado de manera tal que el compuesto resultante todavía retiene la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El experto también comprenderá que muchos de estos compuestos pueden utilizarse en lugar de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento. De esta manera, los agentes terapéuticos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en el presente documento.

20 Para propósitos ilustrativos de los usos de los inmunocombinados, ahora se verán e ilustrarán algunas aplicaciones no limitantes.

Materiales y Métodos

25 Construcción de Anticuerpo Quimérico (cB-B4: nBT062)

B-B4

30 El anticuerpo murino B-B4 como se caracterizó previamente (Wijdenes *et al.*, Br J Haematol., 94 (1996), 318) se empleó en estos experimentos.

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

35 Se realizaron técnicas de ADN recombinante convencionales como se describe en detalle en libros de texto como por ejemplo en J. Sambrook; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 2da Ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU., o como se recomienda por instrucción de los fabricantes en el caso en donde se emplean kits. Clonación PCR y modificación de las regiones variables de ratón se han realizado utilizando metodología PCR convencional. Se han empleado cebadores indicados en la sección de resultados respectivos.

40 Expresión de cB-B4/nBT062

45 Células COS de crecimiento exponencial, cultivadas en DMEM suplementado con FCS al 10 %, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina se recolectaron por tripsinización y centrifugación y lavaron en PBS. Las células se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1x10⁷ células/ml. 700 µl de suspensión celular COS se transfirieron a una cubeta Gene Pulser y se mezcló con ADN de vector de expresión de cadena pesada y ligera kappa (10 µg cada uno o 13 µg de Suprvector). Las células se sometieron a electroporación a 1900 V, 25 µF utilizando un Bio-Rad Gene Pulser. Las células transformadas se cultivaron en DMEM suplementado con FBS libre de gama globulina al 10 %, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina durante 72 horas antes de que se recolectaran sobrenadantes de cultivo celular que contiene anticuerpo.

50 ELISA de captura para medir niveles de expresión de cB-B4/nBT062

55 Placas de 96 pocillos se revistieron con alícuotas de 100 µl de 0,4 µg/ml de anticuerpo IgG antihumano cabra diluido en PBS (4 °C, durante la noche). Se recolectaron placas tres veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS+ Tween-20 al 0,1 %). Los pocillos se bloquearon con BSA al 0,2 %, Tween-20 al 0,02 % en PBS, antes de adición de 200 µl de sobrenadantes de cultivo celular que contienen el anticuerpo secretado (incubación a 37 °C durante una hora). Los pocillos se lavaron seis veces con tampón de lavado, antes de detección de anticuerpo ligado con conjugado de peroxidasa de cadena ligera kappa antihumano de cabra.

60 Purificación de cB-B4/nBT062 de sobrenadantes de cultivo celular

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

65 Ensayo de unión y competición de cB-B4

El análisis de actividad de enlace de B-B4 y cB-B4 a CD138 se realizó utilizando Diaclone (Besançon, Francia) kit sCD138 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, considerando los cambios descritos en la sección de resultados.

5 *Preparación de ARN y síntesis de ADNc*

Las células B-B4 de hibridoma se desarrollaron y se procesaron utilizando el Qiagen Midi kit (Hilden, Alemania) para aislar ARN siguiendo el protocolo de los fabricantes. Aproximadamente 5 µg de ARN B-B4 se someten a transcripción inversa para producir ADNc B-B4 utilizando el kit de síntesis de 1^{er} hebra de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo del fabricante.

Clonación de ADNc inmunoglobulina B-B4

15 El ADNc de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) se amplifica por PCR utilizando el cebador IgH MHV7 (5'-ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG-3') [SEQ ID NO:3] 0,02 % y el cebador de región constante IgG1 MHCG1 (5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3') [SEQ ID NO:4]. Similarmente, cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) se amplificó utilizando los tres diferentes cebadores Igk MKV2 (5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGG-TG-3') [SEQ ID NO:5], MKV4 (5'-ATGAGGGCCCTGCTCAGTTTTTGGCTTCTTG-3') [SEQ ID NO:6] y MKV9 (5'-ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') [SEQ ID NO:7], cada uno en combinación con cebador MKC (5'-ACTG-GATGGTGGGAAGATGG-3') [SEQ ID NO:8]. Todos los productos de amplificación se ligaron directamente con el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

25 Bacterias TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) transformadas con las construcciones de vector pCR2.1 ligado se seleccionaron en placas de agar LB-ampicilina-Xgal. Los cultivos a pequeña escala se inocularon con colonias blancas sencillas, se desarrollaron durante la noche y se aislaron plásmidos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Determinación de secuencia de ADNc

30 Se secuenciaron plásmidos utilizando el BigDye Termination v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI, Foster City, CA). Cada plásmido selecto se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores 1210 y 1233 en ciclo en una máquina GeneAmp9600 PCR. El análisis de secuencia electroforética se realizó en un secuenciador capilar ABI.

35 El ciclo completo de clonación RT-PCR y análisis de secuencias de ADN se repitió para obtener tres conjuntos completamente independientes de información de secuencia para cada cadena de inmunoglobulina.

Secuencia de ADN B-B4 Vk

40 Síntesis de 1^{er} hebra se realiza en tres reacciones independientes. Los productos PCR generados al utilizar los cebadores MKC y MKV2 (secuencias dadas anteriormente) se ligaron en vectores pCR2.1-TOPO de acuerdo con la instrucción del fabricante. Clones de cada conjunto independiente de reacciones RT-PCR se secuenciaron en ambas direcciones. Secuencia de producto cebado MKV2 fue altamente similar a transcripciones kappa estériles que se originan del socio de fusión de mieloma tal como MOPC-21, SP2 y Ag8 (Carroll *et al.*, Mol Immunol., 25 (1988), 991; Cabilly *et al.*, Gene, 40 (1985); 157) y por lo tanto se descartó.

Los productos PCR que utilizan MKC con cebadores MKV4 y MKV9 fueron similares entre si y difieren solo en las posiciones de oscilación dentro del cebador de secuencia líder.

50 *Secuencia de ADN B-B4 VH*

Síntesis de 1^{er} hebra se realiza en tres reacciones independientes y productos PCR se clonaron y secuenciaron de cada producto de 1^{er} hebra. Cinco clones fueron secuenciados de cada 1^{er} hebra.

55 *Construcción de vectores de expresión cB-B4 quiméricos*

La construcción de los vectores de expresión quiméricos involucra agregar una secuencia líder conveniente a VH y Vk, precedido por un sitio de restricción *Bam*HI y una secuencia Kozak. La secuencia de consenso Kozak es crucial para la traducción eficiente de una secuencia de región variable. Define el codón AUG correcto del cual un ribosoma puede iniciar la traducción, y la base más crítica sencilla es la adenina (o menos preferible una guanina) en la posición -3, corriente arriba del inicio AUG. La secuencia líder se elige como la secuencia más similar en la base de datos Kabat (Kabat *et al.*, NIH National Technical Information Service). Estas adiciones están codificadas dentro de los cebadores directos (For) (ambos que tienen la secuencia 5'-AGAGAAAGCTT**GCCGCCACC**ATGATTGCCTCTG-CTCAGTTCCTTGGTCTCC-3' [SEQ ID NO: 9]; sitio de restricción esta subrayado; secuencia Kozak ésta con negritas). Además, la construcción de los vectores de expresión quiméricos involucra introducir un fragmento 5' de la región constante gamma 1 humana, hasta un sitio de restricción *Ap*al natural, contiguo con el extremo 3' de la región

B-B4 y, para la cadena ligera, agregar un sitio donador de combinación y el sitio *HindIII*. La secuencia donadora de combinación es importante para la conexión en-cuadro correcta de la región variable a su región constante apropiada, de ésta manera cortando el intrón V:C. El intrón kappa + CK se codifica en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia la B-B4 Vk. Similarmente, gamma-4 CH se codifica en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia B-B4 VH.

Los genes B-B4 VH y VK primero se analizaron cuidadosamente para identificar cualesquiera sitios donadores de combinación indeseados, sitios aceptores de combinación, secuencias Kozak y para la presencia de cualesquiera sitios de restricción de sub-clonación extra que posteriormente interferirían con la sub-clonación y/o expresión de anticuerpo entero funcional. Un sitio *HindIII* indeseado se encontró en la secuencia Vk que necesariamente se retiró por mutagénesis dirigida por sitio por PCR sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Para estas reacciones, cebadores oligonucleótido BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEQ ID NO: 10] y BT04 (5'-CCACCGAACGTCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3') [SEQ ID NO: 11] se emplearon y se realizó mutagénesis de acuerdo con el protocolo del kit de Mutagénesis Stratagene (La Jolla, CA) Quickchange.

Cebadores de quimerización de cadena Kappa

La secuencia líder B-B4 Vk no ambigua, independiente de la secuencia de cebador PCR, se alineó con las secuencias líder murinas en la base de datos Kabat. La más cercana correspondencia para el líder B-B4 VH fue VK-10 ARS-A (Sanz *et al.*, PNAS, 84 (1987), 1085). Se pronostica que esta secuencia líder se corte correctamente por el algoritmo SignalP (Nielsen *et al.*, Protein Eng, 10 (1997); 1). Cebadores CBB4Kfor (véase anteriormente) y g2258 (5'-CGCGGGATCCACTCACGTTTGGATTTCAGCTTGGTGCCTCC-3') [SEQ ID NO: 12]; El sitio de restricción está subrayado) se diseñaron para generar un producto PCR que contiene un líder completo, la región B-B4 Vk, y sitios de restricción terminales *HindIII* y *BamHI*, para clonar en el vector de expresión pKN100. El cebador directo, CBB4K introduce un sitio de restricción *HindIII*, un sitio de inicio de traducción Kozak y la secuencia líder VK-10 ARS-A. El cebador inverso g2258 introduce un sitio donador de combinación y un sitio de restricción *BamHI*. El fragmento resultante se clonó en los sitio de restricción *HindIII/BamHI* de pKN100.

Cebadores de quimerización de cadena pesada

La secuencia líder B-B4 VH no ambigua, independiente de la secuencia de cebador PCR, se alineó con secuencia líder murina en la base de datos Kabat. La correspondencia más cercana para el líder B-B4 VK fue VH17-1A (Sun *et al.*, PNAS, 84 (1987), 214). Esta secuencia líder se pronostica que se corte correctamente por el algoritmo SignalP. Cebadores cBB4Hfor (véase anteriormente) y g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTG-ACTGAGGTTCC-3') [SEQ ID NO:13]; Sitio de restricción está subrayado) se diseñaron para generar un producto PCR que contiene un líder VH17-1A, la región B-B4 VH y sitios de restricción terminales *HindIII* y *Apal*, para clonar en el vector de expresión pG4D200. El cebador directo cBBHFor introduce un sitio de restricción *HindIII*, un sitio de inicio de traducción Kozak y la secuencia líder VH17-1A. El cebador inverso g22949 introduce el extremo 5' de la región gamma 4C y un sitio de restricción *Apal* natural. El fragmento resultante se clonó en los sitio de restricción *HindIII/Apal* de pG4D200, resultando en el vector pG4D200cBB4.

Producción de anticuerpo cBB4

Un vial de células COS 7 se descongeló y desarrolló en DMEM suplementado con suero Fetal clon I al 10 % con antibióticos. Una semana después, células (0,7 ml a 10^7 células/ml) se sometieron a electroporación con pG4D200cBB4 más pKN100cBB4 (10 µg de ADN cada uno) o sin ADN. Las células se revistieron en 8 ml de medio de cultivo durante 4 días. Se repitió la electroporación siete veces.

Detección de anticuerpo quimérico

Un ELISA sándwich se emplea para medir las concentraciones de anticuerpo en sobrenadantes COS 7. Células COS 7 transformadas de manera transitoria se trataron aproximadamente 6956 ng/ml de anticuerpo (datos no mostrados).

Actividad de unión de cB-B4

Para ensayar la actividad de unión de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo COS 7, el kit Diaclone sCD138 se ha empleado, un ELISA de sándwich de fase sólida. Un anticuerpo monoclonal específico para sCD138 se ha revestido sobre pocillos de las tiras de microtitulación proporcionadas. Durante la primera incubación, sCD138 y anticuerpo biotinilado B-B4 (bio-B-B4) se incuban simultáneamente en conjunto con una serie de diluciones de anticuerpo de prueba sin etiquetar (B-B4 o cB-B4).

Las concentraciones de bio-B-B4 en este ensayo se han reducido a fin de obtener competición con bajas concentraciones de anticuerpo no etiquetado (concentración de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo celular COS 7 fueron de otra forma muy bajas para obtener una competición suficiente). Resultados de este ensayo revelan que ambos anticuerpos tienen la misma especificidad para CD138 (datos no mostrados).

Purificación de cB-B4

B-B4 quimérico se purifica a partir de sobrenadantes de células COS 7 utilizando el Protein A ImmunoPure Plus kit (Pierce), de acuerdo con la recomendación del fabricante (datos no mostrados).

5

Determinación de K_D : Comparación nBT062/ BB4

Purificación de CD138 soluble

10 Antígeno CD138 soluble de sobrenadante de cultivo celular U-266 se purificó por FPLC utilizando columna de un 1 ml "HiTrap activated NHS HP" acoplada con B-B4. El sobrenadante de cultivo celular se cargó en tampón PBS pH 7,4 sobre la columna y posteriormente en el antígeno CD138 se eluyó con trietilamina 50 mM pH 11 en fracciones de 2 ml. CD138 eluido se neutralizó inmediatamente con 375 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 3 para evitar daños estructurales y/o funcionales.

15

Biotinilación de CD138

Sulfo-NHS-LC (Pierce) se empleó para etiquetar CD138. Biotinas activadas por NHS reaccionaron eficientemente con grupos aminos primarios como restos lisina en tampones pH 7-9 para formar enlaces amida estables.

20

Para biotinilación de CD138, 50 μ l de CD138 se desalan utilizando columnas de centrifugado-desalación de proteína (Pierce). El reactivo de biotinilación (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) se disolvió en H₂O desionizada enfriada por hielo a una concentración final de 0,5 mg/ml. El reactivo de biotinilación y la solución de reactivo de captura se mezclaron que tienen 12 veces de exceso molar de reactivo de biotinilación en comparación con el reactivo de captura (50 pmol CD138 a 600 pmol de reactivo de biotinilación) e incubaron 1 h a temperatura ambiente mientras que se agita suavemente la ampolleta. El reactivo de biotinilación no ligado se retiró utilizando columnas de desalación de proteína.

25

Inmovilización de bCD138

30

El sensorchip (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) empleado en el ensayo BIACORE se diseña para ligar moléculas biotiniladas para análisis de interacción en sistemas BIACORE. La superficie consiste en una matriz de dextrano carboximetilado pre-inmovilizada con estreptavidina y lista para captura de alta afinidad de ligandos biotinilados. La inmovilización de bCD138 se realizó en SENSOR CHIP SA utilizando un gasto de flujo de 10 μ l/min por inyección manual. La superficie de chip se acondiciono con tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1 M en NaOH 50 mM. Después se inyectó CD138 biotinilado durante 1 minuto.

35

Determinación de K_D de diferentes anticuerpos utilizando BIACORE

40 El soporte lógico o programa de BIACORE C utiliza mascarar predefinidas, así denominadas "Asistentes de instalación" para diferentes experimentos en donde solo ciertos ajustes pueden cambiarse. Ya que BIACORE C se desarrolló originalmente para medir concentraciones, no hay asistente de instalación de ingeniería para llevar a cabo medidas de afinidad. Sin embargo, con los ajustes adecuados, el asistente de instalación para "enlace no específico" puede emplearse para medir constantes de velocidad de afinidad y por lo tanto se empleó para determinación de K_D .

45

Con este asistente de instalación, dos celdas de flujo se midieron y la fase de disociación se ajustó a 90 s al realizar la "Regeneración 1" con tampón Solución Tampón de Corrida BIACORE. "Regeneración 2" que es equivalente a la regeneración real, se realizó con Glicina-HCl 10 mM pH 2.5. Después de ésta etapa, el ligando CD138 estaba en su estado competente de enlace de nuevo. Durante todo el procedimiento HBS-EP se emplea como solución tampón de corrida y dilución. Para determinar enlace de los diferentes anticuerpos (~150 kDa) a CD138, se analizan asociación y disociación a diferentes concentraciones (100, 50, 25 12.5, 6.25 y 3.13 nM). Las constantes de equilibrio de disociación se determinaron al calcular las constantes de velocidad k_a y k_d . Posteriormente, los valores K_D de los analitos se calcularon por el coeficiente de k_d y k_a con el programa BIAevaluation. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

50

55 **Tabla 13:** Análisis comparativo de valores K_D de nBT062 y B-B4. Las desviaciones estándar se dan para valores K_D promedio.

Anticuerpo	Afinidad	
	K_D (nM)	K_D promedio (nM)
nBT062	1,4	1,4 +/- 0,06
	1,4	
	1,5	
B-B4	1,7	1,6 +/- 0,06
	1,7	
	1,6	

Anticuerpo	Afinidad	
	K _D (nM)	K _D promedio (nM)
nBT062-SPDB-DM4	1,9	1,9 +/- 0,00
	1,9	
	1,9	
B-B4-SPP-DM1	2,6	2,6 +/- 0,06
	2,7	
	2,6	

Discusión

5 Los valores K_D promedio para cada anticuerpo se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que todas las medidas nBT062 exhibe valores K_D ligeramente disminuidos en comparación con B-B4 (valores K_D promedio fueron 1,4 y 1,6 nM, respectivamente).

Preparación de Inmunoconjugados

10 *nBT062-DM1* y *huC242-DM1*

15 El maitansinoide que contiene tiol DM1 se sintetiza del producto de fermentación microbiano P-3, como se describió previamente por Chari (Chari *et al.*, Cancer Res. 1 (1992), 127). Preparación de C242 humanizado (huC242) (Roguska *et al.*, PNAS, 91 (1994), 969) se ha descrito previamente. Conjugados anticuerpo-fármaco se prepararon como se describió previamente (Liu *et al.*, PNAS, 93 (1996), 8618). Un promedio de 3,5 moléculas DM1 se unió por molécula de anticuerpo.

nBT062-DM4

20 BT062 es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del fármaco maitansinoide citotóxico DM4, unido mediante uniones disulfuro a través de un enlazador al anticuerpo monoclonal quimerizado nBT062. Los maitansinoides son anti-mitóticos que inhiben polimerización de tubulina y estructura o ensamblado de microtúbulos (Remillard *et al.*, Science 189 (1977), 1002). Representaciones químicas y esquemáticas de BT062 (nBT062-DM4) se ilustran en las **FIGURAS 1 y 2**.

25

Análisis FACS y ensayos de citotoxicidad WST

Análisis FACS

30 Las células OPM-2 son líneas celulares de leucemia de células plasmáticas que muestran CD138 de alta expresión. Células OPM-2 se incubaron con nBT062, nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (indicado en la **Figura 6**). Las células se lavaron y anticuerpo ligado a CD138 o conjugado se detectaron utilizando un anticuerpo secundario etiquetado por fluorescencia en análisis FACS. La fluorescencia promedio medida en estos experimentos se trazó contra la concentración de anticuerpo.

35

Ensayo de viabilidad celular

40 Las células CD138⁺ MOLP-8 se sembraron en placas de fondo plano a 3000 células/pocillo. Células de control CD138⁻ BJAB se sembraron a 1000 células/pocillo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (indicado en la **Figura 7**) por cinco días. Reactivo WST (sal tetrazolio soluble en agua, ROCHE) se agrega a fin de medir la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). El reactivo se incubó por 7.5 horas en células MOLP-8 y por 2 horas en células BJAB. La fracción de células supervivientes se calcula con base en las densidades ópticas medidas en un lector de microplacas utilizando procedimientos estándar.

45

Discusión

50 Enlace de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 o nBT062 se analiza por FACS. CD138⁺ OPM-2 como células objetivo o diana se incuban con nBT062 o inmunoconjugados y se detectan moléculas ligadas a células utilizando un anticuerpo secundario etiquetado por fluorescencia. En la **Figura 6**, las fluorescencias promedio como se mide para la cantidad de anticuerpo ligado a células se traza contra diferentes concentraciones de conjugado o anticuerpo. Los resultados muestran que nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 presentan características de enlace muy similares. Además, los resultados sugieren fuertemente que las características de enlace del anticuerpo no conjugado no se afectan por las toxinas conjugadas.

55

En ensayos de viabilidad celular, se analizaron la actividad citotóxica del anticuerpo contra células objetivo o diana CD138⁺ MOLP-8 y contra células de control de linfoblastos B CD138⁻ BJAB. Ambas líneas celulares se sembraron

en placas de fondo plano e incubaron con concentraciones crecientes de los inmunocnjugados. Anticuerpo no conjugado se emplea como un control. La actividad citotóxica se analiza cinco días después de adición de los inmunocnjugados al utilizar reactivo WST a fin de medir la viabilidad celular. En la **Figura 7 (A)-(C)**, la fracción de células supervivientes respecto a células de control tratadas con control de vehículo se traza contra concentraciones crecientes de inmunocnjugado. Los resultados muestran que la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 contra células MOLP-8 es muy similar. Como se espera, células de control CD138⁺ BJAB no se exterminaron por los inmunocnjugados, indicando que todos los inmunocnjugados actúan mediante enlace específico de células a CD138. En experimentos de competición, en donde células MOLP-8 se preincubaron con un exceso molar de nBT062 no conjugado. La preincubación sustancialmente bloqueó la citotoxicidad de nBT062-SPDB-DM4, proporcionando mayor evidencia que los inmunocnjugados exterminan las células por enlace específico a CD138 sobre la superficie celular (**Figura 7 (D)**).

Indicador: Modelos de Xenoinjerto - Páncreas/ Mamario y otro Carcinomas - Disposición Experimental General

De acuerdo con el análisis de expresión de CD138 (análisis de inmunohistoquímica en micro hilera de tejido de tumor) se seleccionaron candidatos de tumor de una colección de tumores primarios, esto es, de tumores derivados de pacientes. Estos tumores exhiben similares características que los tumores de pacientes, ya que son pasados en ratones en bajos números para retener las características originales. Después de trasplante subcutáneo y establecimiento de tumores (tiempo de inducción 30 días), el inmunocnjugado BT062 se inyectó intravenosamente a 2 diferentes concentraciones de maitansinoide DM4, 450 µg/kg y 250 µg/kg (cada uno basado en el peso molecular de DM4 enlazado (1 mg de DM4 se conjuga a 52 mg de anticuerpo, igualando una masa total de 53 mg; 450 µg/kg DM4 = 23,850 µg). El inmunocnjugado se administró una vez a la semana por 10 semanas (en caso de tratamiento en ratones implantados con tumor pancreático) y 5 semanas (en caso de ratones implantados con tumor mamario, pulmonar y de vejiga). Un periodo de observación libre de tratamiento siguió para investigar un recrecimiento posible del tumor.

Ejemplo 1: Carcinoma de Páncreas

Se implantó tejido de tumor pancreático (PAXF 736 (Kuesters et al., 2006) (bilateral) en ratones NMRI. El tumor implantado se originó de un carcinoma pancreático primario de paciente (deficientemente diferenciado, adenocarcinoma infiltrante (un carcinoma exocrino)). No se observaron efectos secundarios. El tumor de este paciente se identificó como tejido de alta expresión de CD138 por estudios de Inmunohistoquímica. Sin embargo, CD138 no se expresa en un grado comparable con células plasmáticas mielomatosas en pacientes de mieloma múltiple, como se detecta en líneas celulares tumorigénicas por tinción de superficie citométrica de flujo.

El tratamiento con BT062 se inició después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 6-8 mm diámetro (mínimo 5 mm). Los diámetros de tumor se han medido dos veces a la semana. Los volúmenes de tumor se calcularon de acuerdo con la fórmula $a \times b \times b / 2$ en donde "a" es el eje más largo y "b" su eje perpendicular. La inhibición de volúmenes de tumor en los grupos de prueba respecto al grupo de control de vehículos se calcula como la proporción de los volúmenes de tumor relativos medianos (T/C).

La inhibición de tumor para un día particular (T/C en %) se calcula de la relación de los valores RTV promedio (volúmenes de tumor relativo) de los grupos de prueba contra control multiplicado por 100 %.

$$T/C (\text{Día } x) = \frac{\text{Volúmenes de tumor relativo medio de grupo de control Día}_x}{\text{volúmenes de tumor relativo medio del grupo de prueba Día}_x} \times 100 \%$$

El volumen de tumor puede reducirse significativamente por esta administración semanal de BT062. Como puede verse en la Figura 8, se observó remisión completa y parcial dependiente de dosis. La Figura muestra que a una dosis de 23,85 mg/kg, puede obtenerse remisión completa 28 días después de implante del tumor, mientras que a una dosis de 13,25 mg/kg, puede obtenerse remisión completa 35 días después de implante del tumor. De manera notable, después de 52 días todos los ratones en los regímenes de administración de 13,25 mg/kg todavía estaban vivos (8/8), que el octavo ratón del grupo de control se ha reducido a 1. Un valor T/C inferior a 10 % indica remisión completa (CR = Complete Remission) (Bissery et al., 1991). De acuerdo con estos criterios, CR se logra en ambos grupos de tratamiento, reflejando la remisión completa que se logró por BT062. En forma notable en una fase de observación libre de tratamiento, no se detecta recrecimiento de tumor, confirmando la curación completa en este modelo.

Tabla 14: Volumen de tumor es modelo de ratón-xenoinjerto de cáncer pancreático

Volumen Relativo de tumor (%)	Día 52: promedio (±)	Intervalo	T/C (%)
Control	2055	2055	
BT062-DM4; 13,25 mg/kg	0 (±1,0)	0 - 3,5	0,0

Volumen Relativo de tumor (%)	Día 52: promedio (±)	Intervalo	T/C (%)
Control	2055	2055	
BT062-DM4; 23,85 mg/kg	0 (±0,01)	0 - 0,1	0,0

Ejemplo 2: Carcinoma mamario

5 Ratonos NMRI (desnudos) fueron implantados (bilateral) con tumor mamario primario de un paciente (determinado por IHC análisis como CD138 fuerte positivo). Una metástasis en la piel de carcinoma de mama se tomó en la etapa M1. Un tumor que no responde a Herceptina, (bajo Her₂ con expresión intermedia). El tumor fue receptor negativo de estrógeno y receptor negativo de progesterona y de esta manera no responde a terapia de hormonas. Tumores a implantarse fueron seleccionados de acuerdo con los resultados de tinción IHC (fuerte, expresión homogénea de CD138 detectada por BT062 (expresión triple negativa de receptores de hormona estrógeno y progesterona);
 10 expresión Her2 calificó 2 o menos (respecto a Herceptina no responde).

El tratamiento con BT062 fue iniciado después de que los tumores alcanzaron tamaño aproximado de 100 mm³. Los volúmenes de tumor se calcularon de acuerdo con la fórmula $a \times b \times b / 2$, con "a" que es el eje más largo y "b" su eje perpendicular. Inhibición de volúmenes de tumor en los grupos de prueba respecto a un grupo de control de vehículo se calcula como la proporción de los volúmenes de tumor relativo medianos (T/C). BT062 se administró una vez a la semana a una dosis de carga de 13,25 mg/kg (que se suministró el día 1) seguido por dosis de 4 mg/kg una vez
 15 semanalmente. En el otro grupo de dosis, se administró una alta dosis de 23,85 mg/kg. El volumen de tumor pudo reducirse significativamente por administración semanal de BT062. Se observó una remisión parcial y completa dependiente de dosis. El inmunocombinado fue bien tolerado, sin influencia en peso corporal después de cada inyección. Un valor T/C inferior 10 % se obtuvo en ambos grupos de tratamiento, reflejando una completa remisión lograda por la administración de BT062. Como puede verse en la Figura 9, el efecto anti-tumor (es decir, remisión completa) se logró después de 21 días, que puede considerarse una rápida respuesta BT062. Como puede verse de las Figuras 35 y 36, también son efectivos regímenes de menores dosis. Como puede verse de la Figura 37, un modelo de ratón que no responde a tratamiento con Docetaxel, tampoco responde a tratamiento con BT062,
 20 mientras que un modelo que no responde a taxol responde bien a tratamiento con BT062 (Fig. 35). En comparación con el modelo pancreático, la duración del tratamiento pudo recortarse a la mitad (5 semanas en lugar de 10 semanas) y la dosis baja de 13,25 mg/kg se redujo a 4 mg/kg para lograr un efecto similar, es decir completa remisión y sin recrecimiento de tumor. El periodo de tratamiento más corto para carcinoma mamario no se esperaba, ya que el análisis IHC el nivel de expresión CD138 fue similar. De ésta manera, no pudieron sacarse conclusiones del nivel de expresión CD138 a una recomendación general para la duración de tratamiento. Después de 21 días
 25 todos los ratones de ambos grupos tratados así como el grupo de control todavía estaban vivos. En un periodo de observación libre de tratamiento (39 días después de la última administración del inmunocombinado) no se detectó recrecimiento de tumor, confirmando la curación completa.

35 **Tabla 15:** Volumen de tumor es un modelo de ratón-xenoinjerto de carcinoma mamario.

Volumen de tumor relativo (%)	Promedio (Día 21)	Intervalo	T/C
Control (PBS)	533 (± 149,5)	339 – 878	
BT062-DM4; 13,25 mg/kg/4 mg/kg	0 (± 0,02)	0 – 0,1	0,0
BT062-DM4; 23,85 mg/kg	0 (± 1,75)	0 – 6,6	0,0

Tabla 16: Expresión de CD138 en células de carcinoma mamario contra células de epitelio

Muestras de tejido FFPE	Calificación de tinción (membrana)	
	0,25 µg/ml	0,05 µg/ml
Mama, tumor Mets, -061909-13	3 Homo	2-3 Homo
Mama, tumor Desconocido, -061909-12	2-3 Homo	1-2 Hetero
Mama, tumor Mets, -061909-09	3 Hetero	2 Focal
Mama, tumor Primario, -111904-4	3 Hetero	1-3 Hetero
Mama, tumor Primario, -111904-1	3 Hetero	1 Hetero
Muestra de Piel Normal 1	3 Homo	3 Homo
Muestra de Piel Normal 1	3 Homo	3 Homo

Ejemplo 3: Carcinoma de Vejiga

40 Ratonos NMRI (desnudos) se implantan con un tumor de vejiga (determinado por análisis IHC como CD138 fuerte positivo), es decir un carcinoma de célula de transición.

Tratamiento con BT062 se inicia después de que los tumores alcanzaron un tamaño de aprox. 100 mm³. Volúmenes de tumor se calculan de acuerdo con la fórmula $a \times b^2 / 2$, con "a" que es el eje más largo y "b" su eje perpendicular. La inhibición de volúmenes de tumor en un grupo de prueba respecto al grupo de control de vehículos se calcula como la proporción de los volúmenes de tumor relativos medianos (T/C).

- 5 Volúmenes de tumor se busca reducir en forma significativa por administración semanal de BT062. Se le da seguimiento a cualquier remisión parcial y completa dependiente de dosis.

Ejemplo 4: Carcinoma Pulmonar

- 10 Se implantan ratones NMRI (desnudos) con un carcinoma pulmonar (determinado por análisis IHC como CD138 fuerte positivo).

El tratamiento con BT062 se inicia después de que los tumores alcanzaron un tamaño mayor que 5 mm. Los diámetros de tumor se miden dos veces a la semana. Los volúmenes de tumor se calculan de acuerdo con la fórmula $a \times b^2 / 2$, con "a" que es el eje más largo y "b" su eje perpendicular. La inhibición de volúmenes de tumor en grupos de prueba respecto al grupo de control de vehículo se calcula como la proporción de volúmenes de tumor relativos medios (T/C).

- 15

La remisión completa puede lograrse en ambos grupos de dosis (4 mg/kg y 23,85 mg/kg una vez por semana). En un periodo libre de tratamiento, no se observó re-crecimiento, confirmando la erradicación completa de los tumores.

20

Ejemplo 5:

Para investigar tumores metastásicos, se implantaron ratones NMRI (desnudos) con tejidos de paciente metastásico derivados de un tumor de vejiga (determinado por análisis IHC como positivo fuerte CD138).

25

La remisión completa pudo lograrse también en este modelo, en ambos grupos de dosis (4 mg/kg y 23,85 mg/kg una vez por semana). En un periodo libre de tratamiento, no se observó re-crecimiento, confirmando la erradicación completa de los tumores.

Ejemplo 6:

Para investigar la efectividad de BT062 a menores dosis y en comparación con fármacos clínicamente empleados taxol (Paclitaxel), se implantaron ratones NMRI (desnudos) con el tumor mamario del ejemplo 2. Menores dosis de BT062 (0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg y 4 mg/kg) se administraron una vez por semana (Figura 35). A 4 y 2 mg/kg una vez por semana, se observó una remisión completa, sin re-crecimiento en un periodo libre de tratamiento. Los ratones tratados con Taxol mostraron sólo un menor retraso en el crecimiento de tumor a 10 mg/kg. DM4 se empleó en una cantidad correspondiente a 4 mg de BT062, pero no resultó en respuesta de tumor. A concentraciones de 1 mg/kg pudo lograrse una "estasis de tumor", es decir el tumor no creció aunque el volumen no disminuyó. Esto también se llama la dosis efectiva mínima, ya que en este grupo de 2/7 ratones tuvieron remisión parcial y 3/7 ratones tuvieron remisión completa sin recrecimiento del tumor.

35

40

La dosis eficaz mínima también puede ser algo menor que 1 mg/kg pero superior a 0,5 mg/kg.

Ejemplos 7 y 8:

45

Aquí BT062 se investigó a menores dosis y se compara con el fármaco empleado clínicamente docetaxel (10 mg/kg), como en el Ejemplo 6. Menores dosis de BT062 (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg) se administraron una vez a la semana. A 8 mg/kg una vez a la semana, se observó una remisión completa durante tratamiento en ratones que tuvieron tumores que muestran tinción CD138 IHC con calificación 2-3 y que también responden a docetaxel mientras que ratones que tuvieron tumores que muestran una tinción IHC con calificación 1-2 y no responden a docetaxel tampoco responden a BT062 (Figuras 36 y 37).

50

Ejemplo 9:

Para investigar la efectividad de BT062 a menores dosis y en comparación con un fármaco clínicamente empleado docetaxel (10 mg/kg), se implantaron ratones NMRI (desnudos) con un tumor pancreático primario. El tumor derivado de paciente tuvo una tinción CD138 alta pero heterogénea determinada por análisis IHC y calificaron con 3. Menores dosis de BT062 (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg) se administran una vez a la semana (Figura 38). A 4 y 8 mg/kg una vez a la semana, se observó remisión completa, pero re-crecimiento en un periodo libre de tratamiento ocurrió que pudo ser un efecto de la heterogeneidad del tumor. Ratones tratados con docetaxel mostraron remisión completa durante el periodo de tratamiento así como el periodo libre de tratamiento.

60

Pruebas en Humanos con BT062

- 65 En el contexto de la presente invención, los sujetos humanos respondieron bien a un régimen de baja dosis. Este incluso fue el caso en ausencia de cualesquiera tratamientos adicionales que pudieran compensar variaciones

potenciales en expresión cualitativa o cuantitativa de CD138 en las células diana (en comparación con MYLOTARG). Mientras que modelos de ratón demostraron que BT062 tiene actividad antimieloma altamente significativa a dosis que son bien toleradas en ratones, la efectividad fue considerablemente mejor a dosis relativamente altas (*resultados no mostrados*), presentando la duda de cómo se han tolerado dosis superiores por sujetos humanos que expresan CD138 en una amplia variedad de células no tumorales.

Estudio de investigación Fase I

Este estudio se realizó para probar los efectos (buenos y malos) y determinar la dosis tolerada máxima (MTD = Maximum Tolerated Dose) de BT062 para tratar pacientes con mieloma múltiple con relapso o con relapso refractario.

Hasta ahora, se reclutaron 32 pacientes. Al menos 12 de 32 pacientes experimentaron disminuida progresión de la enfermedad como se representa al recibir al menos un cuarto ciclo de tratamiento. La prueba se realiza en diferentes sitios, con grupos de 3 y 4 pacientes tratados con diferentes niveles de dosis (10 mg/m², 20 mg/m², 40 mg/m², 80 mg/m², 120 mg/m², 160 mg/m², 200 mg/m²) en cualquier punto entre 1 a 31 ciclos de tratamiento (*resultados no mostrados*). Como la persona con destreza en la técnica apreciará, una cantidad superior de ciclos de tratamiento es posible y dentro del alcance de las presentes invenciones, tales como 10 a 50, 10 a 100, 10 a 200 y más.

El avance de la enfermedad disminuyó con niveles de dosis relativamente bajos, es decir 20 mg/m², 40 mg/m², 80 mg/m² y 120 mg/m² con un paciente en el 2^o nivel de dosis en 20 mg/m² que no exhibe progresión de la enfermedad por 10 ciclos de tratamiento de 21 días. En algunos pacientes, pudieron observarse enfermedad estable y respuestas incluyendo respuestas menores y parciales.

A estos niveles de dosis, como se describió anteriormente (véase Tablas 9 y 10), también se observó rápida eliminación de BT062 1000 del plasma. Algunos perfiles farmacocinéticos de estos esquemas de administración de baja dosis se ilustran en la Figura 13. Dosis de 160 mg/m² y 200 mg/m² también se administran.

Una dosis de 160 mg/m² se identificó como MTD y estudios en este grupo fueron sometidos a expansión. Una dosis de 200 mg/m² se identificó como MAD.

Regímenes de dosis sencillas repetidas de 10 mg/m², 20 mg/m², 40 mg/m², 80 mg/m², 120 mg/m², 160 mg/m², 200 mg/m² se realizaron cada 21 días, significando el día 1, día 22, día 43, día 64, día 85, día 106, y así en adelante. La enfermedad ha sido y será supervisada por evaluación de hematología por el médico, síntomas clínicos y química clínica así como al medir niveles de Proteína M en el suero y orina de pacientes (en g/dl) y niveles de cadena ligera libre (FLC = Free Light-Chain) en el suero de pacientes con el tiempo (*resultados no mostrados*).

Evaluación de Inmunoglobulina

La cantidad de anticuerpos Ig incluyendo la determinación de subgrupos IgG, se analizó en la exploración.

Cuantificación de Proteína M y Ensayo de Cadena Ligera Libre de Suero

Inicialmente, la respuesta a tratamiento se evaluó el día 1 de los ciclos de tratamiento 1-3 por cuantificación de proteína M utilizando inmunoelectroforesis (IEP) e inmunofijación electroforesis (IFE) de suero y recolección de orina de 24 horas. Para los ciclos de tratamiento 3 y más allá, la cuantificación de proteína M se realizó en la visita del Día 15 a fin de que los resultados estén disponibles para estimar respuesta antes de iniciar el siguiente ciclo de tratamiento. Una evaluación de inmunoglobulina cuantitativa general se realizó junto con la cuantificación de proteína M.

Las muestras en suero se emplearon para realizar ensayos FLC para examinar sujetos de mieloma múltiple sin proteína M detectable (mieloma no secretorio/oligosecretorio) y para permitir detección de respuesta temprana al tratamiento. Por lo tanto, ensayos FLC en suero se realizaron los días 1, 2, 3, y 8 del ciclo de tratamiento en los días 1, 2, 3, 8 y 15 del ciclo 4, así como en los días 1, 8 y 15 de todos los otros ciclos de tratamiento. Proteína M y FLC se analizaron en la evaluación y en la visita final. Evaluaciones el día 1 del ciclo 1 sirvieron como valores de referencia.

La **Tabla 17** proporciona observaciones hechas respecto a proteína M en Orina/Suero y mediciones de FLC en suero en pacientes selectos en un régimen de dosis sencillo repetido.

Dosis mg/m ²	Mediciones de proteína M en orina/suero y mediciones FLC
-------------------------	--

Dosis mg/m ²	Mediciones de proteína M en orina/suero y mediciones FLC
20	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Durante los primeros siete ciclos estabilización de enfermedad con base en síntomas clínicos y FLC en suero, ➤ Proteína M en orina disminuye después del 8^o tratamiento ➤ Criterios de Proteína M para Respuesta Menor alcanzaron después de 8^o tratamiento ➤ Disminución en nivel de Proteína M en orina de línea de referencia por más de 50 % ➤ Progreso de enfermedad después del Ciclo 10 ➤ Proteína M en suero entre 0,06 y 0,1 g/dl (definido como no medible)
40	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad estable por 14 semanas. ➤ Proteína M en suero disminuyó después del 1er tratamiento y estabilizó durante 14 semanas. ➤ Progreso de enfermedad observado después de tratamiento se mantiene al inicio del ciclo 6 (día 105) ➤ proteína M en orina aumenta de 0 al cribar a un máximo de aproximadamente 16 mg/24 h (definido como no medible)
160	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nivel de FLC en suero aumenta durante el periodo de criba empezando -21 días antes del día 1 del tratamiento. ➤ Nivel de FLC en suero disminuyen muy pronto después del 1er tratamiento y que está cerca del 25 % de disminución el día 8. ➤ En comparación con la línea de referencia, niveles FLC se reducen en aproximadamente 40 % durante el 1er ciclo y en más de 50 % después de 2do, 3ero y 4to tratamientos. ➤ Criterios FLC a Respuesta Parcial se alcanzaron muy temprano. ➤ Progreso de enfermedad después del fin del 4o ciclo de tratamiento. ➤ Proteína M en suero no es medible = 0; Proteína M en Orina disminuyó de 140 mg/24 h en la línea de referencia a 120 mg/24 h antes del 2o tratamiento (definido como no medible) => Mieloma no secretorio

En un régimen de dosis sencilla repetida de BT062, DLT se observan en la mucosa de pacientes tratados en el grupo de dosis 200 mg/m². El diana para BT062 (CD138) se expresa en la mucosa y toxicidades en estos tejidos y órganos pueden considerarse como relacionadas al objetivo o diana. Serios eventos adversos, que no califican para DLT, se observan en los ojos de los pacientes. Sin embargo, la toxicidad en los ojos se sugiere que más bien está relacionada con el compuesto efector, ya que ésta es una toxicidad típica que también se encuentra con otros conjugados DM4 tales como SAR3419, o IMG388 que no hacen diana en CD138. Esta toxicidad para los ojos ocurre en un paciente en el estudio de dosis sencilla repetida, 3 días después del 3^{er} ciclo y en los otros pacientes, 4 días después del 4^{to} ciclo. En el grupo de dosis administrado máximo (160 mg/kg) del estudio de dosis sencilla repetida, toxicidades relacionadas a CD138 ocurren durante los primeros días pero también después de ciclos repetidos, la mayoría de ellos se consideraron leves a moderadas.

La **Tabla 18** proporciona observaciones hechas respecto a proteína M en Orina/Suero y mediciones FLC en suero en pacientes selectos en un régimen de múltiples dosis repetidas.

Dosis	Fig.	Mediciones de proteína M en Orina/Suero y mediciones FLC
3 x 50 mg/m ²	20	Disminución de Proteína M en suero por 6 ciclos: Al menos enfermedad estable pudo lograrse durante 6 ciclos, con una disminución de proteína M en suero casi en 25 % durante/después del 3 ^{er} y 5 ^{to} ciclos de tratamiento
3 x 65 mg/m ²	21	Cadena ligera kappa-lambda libre Una fuerte disminución en el nivel FLC en suero pudo observarse después de sólo un ciclo de tratamiento sencillo
3 x 120 mg/m ²	24	Disminución de proteína M en orina Una disminución de proteína M en orina después de los ciclos primero y repetidos, con una reducción mayor que 50 % logrado después de los ciclos 3 ^{er} , 7 ^o y 10 ^o .

Determinación de BT062 y DM4 de plasma

Para estimar propiedades PK de una sola dosis de BT062, después de administración IV de BT062, se realizó muestreo extenso de plasma durante el primer ciclo de tratamiento. Se realizó la misma evaluación durante el ciclo de tratamiento 4. En una proporción menor, las muestras de plasma también se obtuvieron el día 1 y 8 de todos los otros ciclos de tratamiento, así como en la visita final y seguimiento. La cantidad de BT062 en el plasma, se determina mediante un método PK ELISA que se describe como sigue:

Descripción experimental:

Los pocillos de una placa de microtitulación primero se revisten con un anticuerpo anti-maitansinoide (anti-DM4) durante la noche a 2-8 °C y después de bloquear con tampón de ensayo (0,5 % BSA/TBS) se incuban el día siguiente con muestras de plasma. Estas se diluyen de antemano al menos 1:100 en tampón de ensayo. Los

anticuerpos BT062 contenidos en la muestra se ligan por el anticuerpo anti-DM4 inmovilizado en las placas. Después de incubación, material no ligado se retira por lavado. Después, se añade un anticuerpo secundario conjugado HRP, que liga a los anticuerpos BT062. El anticuerpo secundario no ligado se retira por otra etapa de lavado. Después de esto, solución de sustrato TMB se transfiere por pipeta a todos los pocillos.

5 Una reacción de color se desarrolla al proporcionar la cantidad de BT062 ligado durante incubación de la muestra. La reacción de color se determina utilizando una solución de parada, que provoca que el color cambie de azul a amarillo. La medición final se lleva a cabo con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

10 La relación entre concentración y densidad óptica se evalúa utilizando el programa Magellan V6.6. Si las muestras de pruebas clínicas se miden (muestras de plasma de pacientes con mieloma múltiple), por cada paciente en una curva estándar individual puede prepararse en plasma "predosis" diluido 1:100 (plasma antes de tratamiento con BT062). Si además de la dilución obligatoria 1:100 en tampón de ensayo, una muestra de prueba clínica tiene que diluirse más (debido a una alta concentración de BT062), esta dilución deberá prepararse en plasma predosis diluido
15 1:100 (del paciente involucrado). Para prueba de estabilidad (por ejemplo estabilidad de congelamiento/descongelado, estabilidad de almacenamiento), la norma BT062 y también muestras correspondientes o controles en proceso se preparan en acumulado de plasma heparina diluido 1:100.

20 **Determinación de Shed CD138 y HAPA**

Todas las muestras de plasma previas a la dosis se evaluaron para niveles de CD138 desprendido/soluble (sCD138) para investigar una correlación potencial entre niveles de sCD138 y actividad anti tumor. Estas mediciones también permiten determinar valores Cmax menores que lo esperado no dependen de la cantidad de sCD138 presente antes de administración de BT062 (véase Figura 17). Muestras de plasma pre-dosis del día 1 de cada ciclo de tratamiento
25 y de cada visita final y seguimiento, se evaluaron por la presencia de respuestas humorales contra BT062 (producto de fármaco) por evaluación de anticuerpos anti producto humano (HAPA = Human Antiprodukt Antibodies).

Mediciones de CD138 desprendido observado

30 En pacientes de mieloma, pueden observarse altos niveles de sCD138 y pueden ser un indicador de pronóstico de pacientes de mieloma (Maisnar et al., 2005).

Pacientes con MGUS y MM pueden exhibir altos niveles de CD138 soluble concomitantes con niveles superiores de β 2-microglobulina y elevado contenido de células en plasma en la médula ósea (Aref et al., 2003).

35 Se empleó un kit para determinar CD138 soluble. De manera sorprendente, se encontró que un paciente (identificado como 003-003) a 20 mg/m² de BT062 exhibió una respuesta menor respecto a niveles de proteína M en orina, aunque este paciente exhibió altos niveles de sCD138 antes de tratamiento.

40 El valor o valores CD138 solubles se determinaron en diferentes sujetos.

Tabla 19: El paciente 003-003 (dosis 20 mg/m²) exhibió valores muy altos de sCD138. Sin embargo este paciente logró una menor respuesta en nivel de Proteína M.

Sujeto	sCD138 (ng/ml)
002-003	61,3
001-002	196
002-004	56,7
003-003	2583
Promedio	724,1

45 **ESTUDIOS DE COMBINACIÓN**

En un estudio de escala de múltiples dosis Fase I/IIa, BT062 se combinó con Lenalidomida y Dexametasona en sujetos con Mieloma Múltiple de relapso o relapso/refractario.

50 Un ciclo de tratamiento consistió en 28 días, o en otras palabras, 21 días de tratamiento activo seguido de 7 días sin tratamiento (periodo de reposo). BT062 se administró los días 1, 8 y 15 a una concentración de 80 mg/m², lenalidomida (Len) (25 mg) se administra una vez diariamente los días 1 – 21 y dexametasona (Dex) (40 mg) se administra los días 1, 8, 15 y 22. El día 1 de tratamiento de BT062 en todos los ciclos deberá concurrir con el día 1 de Len y dexametasona. Como puede verse de la Figura 34, se observó una respuesta menor después del primer
55 ciclo de tratamiento y se mantuvo al inicio del 4° ciclo (día 99), aun cuando el inicio de los ciclos 2 y 3 se retrasó por una semana y el tratamiento con BT062 se saltó el día 85 y tratamiento con Len se saltó los días 85 a 91 y la dosis Dex se redujo a 20 mg/m² durante el ciclo 3. Como es claro para la persona con destreza en la técnica, ya sea

concentraciones de Lenalidomida, dexametasona o BT062 pueden reducirse dependiendo de las toxicidades y eficacia. Eficacia es fluidos corporales estimados, preferentemente por parámetros de eficacia en sangre tales como Proteína M o FLC (dependiendo del tipo de enfermedad MM), u otros marcadores de fluidos corporales o estado de enfermedad que refleja medula ósea.

5 Con este régimen de tratamiento descrito aquí, la combinación con Len/Dex es posible con menores toxicidades, o en combinación con este inmunocombinado, la administración de los socios de combinación puede ajustarse, por ejemplo disminuirse para reducir al mínimo las toxicidades asociadas con su administración. Ya que este régimen proporciona mejor tolerabilidad, es aplicable para combinación con otros fármacos, que tienen menores o al menos no superiores números de toxicidad pero la misma o incluso mejor eficacia.

Los candidatos posibles de fármacos antimieloma se han evaluado como socios de combinación para BT062 en líneas celulares.

15 **Estudios de Líneas Celulares**

Los estudios de combinación en modelos de ratón-xenoinjerto fueron precedidos por estudios en líneas celulares. La determinación de sinergia en diferentes líneas celulares se realizó de acuerdo con Chou y Talalay (1984), utilizando el análisis de efecto medio. Aquí, se calculan valores IC₅₀ para los efectos citotóxicos para cada fármaco y cada línea celular, y después proporciones IC₅₀ para cada par de fármacos. Las células después se expusieron a series de dilución de cualquiera de estas mezclas de fármacos o los fármacos solos. Datos experimentales se analizaron utilizando el programa CompuSyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ). Índices de Combinación (CI = Combination Indexes) por cada experimento independiente, se calcularon e informaron por separado. En el análisis, CI menor a 1, igual a 1 y más que 1 indica sinergia, aditividad y antagonismo, respectivamente. De acuerdo con la clasificación User's guide, 2004), el autor del método, la escala de sinergia y el antagonismo es como sigue:

Índice de Combinación	Descripción
< 0,1	Muy fuerte sinergia
0,1-0,3	Fuerte sinergia
0,3-0,7	Sinergia
0,7-0,85	Sinergia moderada
0,85-0,9	Ligera sinergia
0,9-1,1	Casi aditivo
1,1-1,2	Ligero antagonismo
1,2-1,45	Moderado antagonismo
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Fuerte antagonismo
> 10	Muy fuerte antagonismo

Fármaco \ Células	RPMI 8226	MOLP8	U266
Bortezomib	Aditivo	Ligeramente antagonista	Antagonista
Talidomida	Aditivo a sinérgico	Aditivo ligeramente antagonista	Antagonista
Lenalidomida	Sinérgico	Aditivo a sinérgico	Antagonista ligero a moderado
Melfalan	Aditivo a sinérgico	Antagonista ligero a moderado	Sinérgico aditivo a ligeramente sinérgico
Dexametasona	No determinado	Aditivo	Aditivo

30 **Tabla 20:** Estimados de resultados sinérgicos obtenidos en líneas celulares de acuerdo con el método de Chou y Talalay (1984).

En este ejemplo se emplearon líneas de células MOLP 8 para combinación de BT062 con bortezomib, talidomida, lenalidomida, melfalan y dexametasona.

35 La combinación con talidomida o bortezomib, no resulta en un efecto sinérgico ni aditivo, sino más bien un efecto antagonista. En contraste a estos estudios de cultivo celular la combinación con bortezomib fue sinérgica en el modelo de xenoinjerto descrito a continuación.

Los posibles candidatos de fármaco anti-mieloma se han evaluado como socios de combinación para BT062 en estudios de Xenoinjerto utilizando células de mieloma múltiple de humano MOLP8.

40

Ejemplo 1

Efecto anti-mieloma de terapia de combinación con BT062 y Lenalidomida

5 Los ratones hembra se inocularon subcutáneamente con células de mieloma humano MOLP 8. Tratamiento con BT062 solo o en combinación con Lenalidomida se inició el día 11 posterior a inoculación de tumor. BT062 se emplea en concentraciones de 100 µg, 200 µg y 400 µg solo y en combinación con Lenalidomida que se dosifica en forma intraperitoneal a 100 mg/kg los días 1 a 5 y los días 8 a 12. Un grupo de control de animales recibieron Salino amortiguado con fosfato (PBS) utilizando el mismo programa y ruta de administración. El crecimiento de tumor se supervisó al medir el tamaño de tumor y calculó con la fórmula de longitud x ancho x altura x 1/2, determinado los días 10, 14, 18 y 21.

La sinergia se calcula como sigue (Yu et al., 2001; Gunaratnam et al., 2009):

15 **PROPORCIÓN (r) = FTV esperado (combinación)/FTV observado (combinación)**

FTV: Volumen de tumor fraccional = volumen de tumor promedio (prueba)/volumen de tumor promedio (control)

Una relación $A > 1$ se considera sinérgica, mientras que $r < 1$ es menos que aditivo.

20 La relación (r), cuando es superior a 1, se denomina en el presente documento "RELACIÓN DE SINERGIA".

Como puede verse en la Tabla 21, la sinergia se observó después de 28 días en concentraciones de BT062 de 200 µg y 400 µg.

25 **Tabla 21:** Volumen de tumor fraccional en xenoinjertos MOLP 8. Concentraciones diferentes de BT062 ya sea solas o en combinación con Lenalidomida se han administrado en xenoinjerto que contiene tumor. FTV representa el volumen de tumor relativo. Se determinan efectos sinérgicos utilizando valores de relación de FTV esperado contra FTV observado. Una relación >1 indica sinergia.

Días	BT062 100	Lenalidomida	BT062 100 + Len (observado)	BT062 100 + Len esperado	Proporción (exp/obs)
10	0,93	1,00	0,97	0,93	0,96
14	0,75	0,82	0,59	0,61	1,04
17	0,52	0,45	0,23	0,23	1,02
21	0,53	0,42	0,19	0,22	1,19
24	0,44	0,55	0,18	0,24	1,30
28	0,33	0,46	0,17	0,15	0,90
	BT062 200	Lenalidomida	BT062 200 + Len (observado)	BT062 100 + Len esperado	Proporción (exp/obs)
10	1,02	1,00	1,00	1,02	1,02
14	0,45	0,82	0,51	0,37	0,73
17	0,13	0,45	0,14	0,06	0,41
21	0,08	0,42	0,07	0,03	0,45
24	0,11	0,55	0,06	0,06	1,08
28	0,13	0,46	0,03	0,06	1,86
	BT062 400	Lenalidomida	BT062 400 + Len (observado)	BT062 100 + Len esperado	Proporción (exp/obs)
10	0,94	1,00	0,91	0,95	1,04
14	0,44	0,82	0,24	0,36	1,49
17	0,09	0,45	0,06	0,04	0,63
21	0,04	0,42	0,04	0,02	0,44
24	0,04	0,55	0,03	0,02	0,80
28	0,04	0,46	0,01	0,02	1,43

Tabla 22: Combinación de Lenalidomida BT062: efectos a diferentes dosis.

Agente	Dosis por inyección	Dosis total	T/C (%) (DÍA 17)	Regresiones		Supervivientes libres de tumor día 77	Resultado
				Parcial	Completa		
PBS	(0.2 ml)	-	-	0/6	0/6	0/6	
BT062	100 ug/kg	100 ug/kg	35	0/6	0/6	0/6	Activo
BT062	200 ug/kg	200 ug/kg	14	0/6	0/6	0/6	Activo
BT062	400 ug/kg	400 ug/kg	9	4/6	1/6	0/6	Altamente activo
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg	31	0/6	0/6	0/6	Activo
BT062	100 ug/kg	100 ug/kg	19	0/6	0/6	0/6	Activa
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					
BT062	200 ug/kg	200 ug/kg	12	2/6	0/6	0/6	Activa
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					
BT062	400 ug/kg	400 ug/kg	6	5/6	4/6	0/6	Altamente activa
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					

Las Figuras 30 y 31 muestran el efecto de la terapia de combinación en volumen de tumor mediano (TV) en un modelo de ratón de xenoinjerto. El resultado en la Figura 30 muestra efectos aditivos de la combinación. En forma notable la combinación resultó en una dosis de 100 µg/kg del inmunocombinado, cuando se combina con una dosis de 100 mg/kg lenalidomida. Para proporciones de sinergia, por favor hagan referencia a la tabla anterior.

Ejemplo 2

10 Efecto anti-mieloma de la terapia de combinación con BT062 y VELCADE

VELCADE se ha evaluado como un socio de combinación de fármaco de mieloma múltiple potencial para BT062 en estudios de Xenoinjerto utilizando células de mieloma múltiple MOLP8 (IMGN Inc.). Tratamiento con BT062 solo o en combinación con VELCADE se inició 11 días posterior a implante de tumor. BT062 se empleó en concentraciones de 100 µg, 200 µg y 400 µg solo y en combinación con VELCADE que se dosificó a 1 mg/kg los días 1, 4, 8 y 11. Un grupo de control de animales recibió Salino amortiguado con fosfato (PBS) utilizando el mismo programa y ruta de administración. El crecimiento de tumor se supervisó al medir el tamaño de tumor y calcular con la fórmula longitud x altura x ancho x 1/2, determinado los días 10, 14, 17, 21, 24 y 28, respectivamente

20 Se calculó sinergia como en el Ejemplo 1 de los estudios de combinación.

Como puede verse en la Tabla 23, se observa sinergia en la combinación BT062 con VELCADE el día 25 en todos los regímenes de dosis BT062. Los valores R informados en la bibliografía son incluso superiores (Yu et al., 2001).

25 **Tabla 23: Tratamiento de combinación con VELCADE.** El volumen de tumor fraccional (FTV) representa el volumen de tumor promedio (prueba) / volumen de tumor relativo promedio (control). La relación de FTV esperado (combinación) contra FTV observado (observado). Valor de proporción > 1 indica sinergia, valores menores a 1 indican un efecto aditivo.

Día	BT062 100	Velcade	BT062 100 + Velcade (observado)	esperado	proporción exp/obs)
10	1,06	1,05	1,04	1,12	1,07
14	0,74	0,84	0,56	0,62	1,11
18	0,44	0,96	0,28	0,42	1,54
21	0,39	0,80	0,23	0,31	1,38
25	0,48	0,95	0,26	0,46	1,75
Días	BT062 200	Velcade	BT062 200 + Vel (observado)	esperado	proporción exp/obs)
10	1,02	1,05	1,07	1,12	1,07
14	0,52	0,84	0,45	0,44	0,98

Día	BT062 100	Velcade	BT062 100 + Velcade (observado)	esperado	proporción exp/obs)
18	0,13	0,96	0,10	0,12	1,19
Días	BT062 200	Velcade	BT062 200 + Vel (observado)	esperado	proporción exp/obs)
21	0,10	0,80	0,05	0,08	1,47
25	0,10	0,95	0,04	0,09	2,09
Días	BT062 400	Velcade	BT062 400 + Vel (observado)	esperado	Relación de sinergia (exp/obs)
10	1,09	1,05	1,04	1,15	1,10
14	0,45	0,84	0,43	0,38	0,88
18	0,08	0,96	0,09	0,08	0,89
21	0,05	0,80	0,04	0,04	0,98
25	0,04	0,95	0,02	0,03	1,36

Tabla 24: Combinación VELCADE BT062: efectos a diferentes dosis.

Agente	Dosis por inyección	Días de tratamiento (TX fecha de inicio = día 10 post inoc.)	T/C (%)	(T-C) en días	Exterminio de células log	Regresiones		Supervivientes libres de tumor día 67	Resultado
						Parcial	Completo		
PBS	(0,2 ml)	Día 1	-	-	-	0/6	0/6	0/6	
BT062	100 ug/kg	Día 1	43	5,5	0,5	0/6	0/6	0/6	Inactivo
BT062	200 ug/kg	Día 1	11	14,5	1,3	1/6	0/6	0/6	Activo
BT062	400 ug/kg	Día 1	7	31,5	2,8	4/6	2/6	0/6	Altamente activo
Velcade	1 mg/kg	días 1, 4, 8, 11	100	0,5	0,0	0/6	0/6	0/6	Inactivo
BT062	100 ug/kg	Día 1	20	10,5	0,9	1/6	0/6	0/6	Activo
Velcade	1 mg/kg	días 1, 4, 8, 11							
BT062	200 ug/kg	Día 1	7	23,5	2,1	4/6	1/6	0/6	Altamente activo
Velcade	1 mg/kg	días 1, 4, 8, 11							
BT062	400 ug/kg	Día 1	7	36,5	3,2	6/6	0/6	0/6	Altamente activo

La Figura 31 muestra el efecto de la terapia de combinación en volumen de tumor medio (TV) en un modelo de ratón de xenoinjerto. El resultado muestra que en el modelo empleado, tratamiento con VELCADE solo no tuvo efecto en el volumen de tumor. La combinación con BT062 proporciona efectos sinérgicos. En forma notable, el sinergismo resultó en una dosis de 100 µg/kg del inmunocombinado cuando se combina con una dosis de 100 mg/kg de VELCADE. Para proporciones de sinergia, por favor haga referencia a la tabla anterior.

10 Ejemplo 3: BT062/Melfalan

Células RPMI se han implantado en forma subcutánea en ratones desnudos. Ratones se aleatorizaron cuando el tumor alcanzó un volumen total de aproximadamente 100 mm³. BT062 se inyectó en forma intravenosa a 2 diferentes concentraciones: 400 µg/kg y 100 µg/kg; cada uno con base en el peso molecular de DM4 enlazado. PBS sirvió como control negativo. Por grupo, se emplearon 8 ratones con un tumor cada uno (implante unilateral). BT062 se dosificó semanalmente seguido de Melfalan una vez a la semana (3 mg/kg) un día después de inyección intraperitoneal de BT062 (*resultados no mostrados*).

20 Ejemplo 4: Estudios de combinación de fármaco in vivo de BT062/lenalidomida/dexametasona

Mientras que diferentes líneas celulares *in vitro* mostraron una disminución de CD138 dependiente de concentración después de incubación por 24 horas de lenalidomida (Figuras 32(A) a (D)), estudios de combinación de fármaco *in vivo* mostraron que una combinación de 4 mg/kg, 20 mg/kg de lenalidomida y 1,25 mg/kg de dexametasona fue altamente efectiva en un modelo de xenoinjerto MM L363.

25

En este modelo, una línea celular L363 en plasma que expresa CD138 altamente agresiva se implantó en forma subcutánea en ratones NOD/SCID. El tratamiento empezó cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 100 mm³. BT062 se inyectó intravenosamente una vez por semana los días 1, 8, 15, 22, 29 a concentraciones de 2 mg/kg o 4 mg/kg ya sea solo o en combinación con lenalidomida, que se suministró oralmente los días 0-4, 7-11, 14-18, 21-25 y 28-32 y Dexametasona, que se suministró intraperitonealmente los días 0, 7, 14, 21 y 28. El tamaño de tumor se midió una vez a la semana. 4 mg/kg de BT062 solo fue activo para reducir el crecimiento de tumor. La combinación de 4 mg/kg de BT062 con Len/Dex mostró superior actividad respecto a inhibición de crecimiento de tumor lleva a los agentes sencillos (Len/Dex solo; BT062 solo) (Figura 33).

10 Bibliografía

- Abdelkefi et al.; "Single autologous stem-cell transplantation followed by maintenance therapy with thalidomide is superior to double autologous transplantation in multiple myeloma: results of a multicenter randomized clinical trial;" *Blood*; 111; 2008; pp.: 1805-1810.
- Akkina et al.; "Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse;" *Blood*; 84; 1994; pp.: 1393-1398.
- Armour et al.; "Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities;" *Eur J Immunol*; 29(8); 1999; pp.: 2613-24.
- Anderson et al.; "Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches;" *Hematology*; 2000; pp.: 147-165.
- Anderson et al.; "Multiple Myeloma;" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 2002; pp.: 214-40.
- Anttonen et al.; "Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma;" *Br J of Cancer* 79 (3/4), 1999, pp.: 558-564.
- Anttonen et al.; "High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery;" *Lung Cancer*; 32(3); Junio 2001; pp.: 297-305.
- Aref et al.; "Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors;" *Hematology*; 8; 2003; pp.:221-228.
- Barbareschi et al.; "High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis;" *Cancer*; 98(3); 1 agosto, 2003; pp.: 474-83.
- Bartlett et al.; "A phase 1 multidose study of SGN-30 immunotherapy in patients with refractory or recurrent CD30+ hematologic malignancies;" *Blood*, vol. 111, 2008, pp.: 1848-1854.
- Bataille et al.; "The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy;" *Haematologica*; 91(9); Septiembre 2006; pp.: 1234-40.
- Bayer-Garner et al.; "Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions;" *Mod Pathol.*; 14(10); Octubre 2001; pp.: 1052-8.
- Beeram et al.; "A phase I study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with advanced HER2+ breast cancer (BC);" *ASCO Meeting; Abstracts*; 20 Mayo, 2008; pp.: 1028.
- Berenson et al.; "New drugs in multiple myeloma;" *Curr Opin Support Palliat Care*; 2(3); Septiembre 2008; pp.: 204-10.
- Bernfield et al.; "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans;" *Annu Rev Cell Biol*; 8; 1992; pp.: 365-393.
- Beste et al.; "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold;" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96; 1999; pp.: 1898-1903.
- Bhattacharyya et al.; "Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin;" *FEBS Lett.*; 75; 1977; pp.: 159-162.
- Bisping et al.; "Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups;" *Blood*; 107(5); 1 marzo, 2006; pp.: 2079-89.
- Bissery et al.; "Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue", *Cancer*

- Resarch 51, 1991, PP.: 4845-4852.
- Bladé et al.; "Advances in therapy of multiple myeloma;" *Curr Opin Oncol*; 20(6); Noviembre 2008; pp.: 697-704.
- 5 Blum et al.; "Maytansine: A Phase I study of an ansa macrolide with antitumor activity;" *Cancer Treat Rep*; 62; 1978; pp.: 435-438.
- Brand et al.; "Management of high risk metastatic prostate cancer: the case for novel therapies;" *J Urol Dec*; 176 (6Pt 2); 2006; pp.: S76-80.
- 10 Blättler et al.; "Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs;" Ojima, I., Vite, G.D. and Altmann, K.-H., Editors; *Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, 2001; 2001; pp.: 317-338.
- 15 Bross et al.; "Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia;" *Clin Cancer Res*; 7; 2001; pp.: 1490-1496.
- Burris et al.; "A Phase I study of a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate in subjects with HER2-overexpressing metastatic breast cancer;" 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS); Poster Abstract n.º 2070; 2006.
- 20 Cabanillas et al., "Phase I study of maytansine using a 3 day schedule;" *Cancer Treat Rep*; 62; 1978; pp.: 425-428.
- 25 Carbone et al.; "AIDS-related plasma- blastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. Ann;" *Otol. Rhinol. Laryngol*; 108; 1999; pp.: 95-99.
- Carlsson et al., "Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent;" *Biochem J*; 173; 1978; pp.: 723-737.
- 30 Carter P; "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies;" *Nat Rev Cancer*; 1; 2001; pp.:118-129.
- Carter y Senter, "Antibody-Drug Conjugates", *The Cancer Journal*, Vol. 14(3), 2008, pp.: 154-169
- 35 Chabner et al.; "Initial clinical trials of maytansine, an antitumor plant alkaloid;" *Cancer Treat Rep*; 62; 1978; pp.: 429-433.
- Chanan-Khan et al.; "Phase I Study of huN901-DM1 (BB-10901) in Patients with Relapsed and Relapsed/Refractory CD56-Positive Multiple Myeloma;" *Blood*; 108(11); Abstract n.º 1174 (ASH Meeting); Noviembre 16, 2007.
- 40 Chanan-Khan et al.; "Phase I Study of IMGN901 in Patients with Relapsed and Relapsed/Refractory CD56-Positive Multiple Myeloma;" *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*; 112; Noviembre 2008; pp.: 3689.
- 45 Chari et al.; "Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs;" *Cancer Res*; 52; 1992; pp.: 127-131.
- Chari et al.; "Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation;" *Cancer Res.*; 55; 1995; pp.: 4079-4084.
- 50 Charnaux et al.; "RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44;" *Glycobiology*; 15(2); 2005; pp.: 119-130.
- 55 Chen et al.; "Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice;" *Blood*; 84; 1994; pp.: 2497-2505.
- Chilosi et al.; "CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies;" *Mod Pathol.*; 12; 1999; pp.: 1101-1106.
- 60 Choi et al.; "Syndecan-1, a key regulator of cell viability in endometrial cancer;" *Int J Cancer* 121(4); 2007; pp.: 741-50.
- 65 Chou y Talalay; "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors;" *Adv. Enzyme Regul.* 22; 1984, pp.:27-55.

- Clement et al.; "B-B2 and B-B4, two new mAb against secreting plasma cells;" *Leucocyte Typing V*; Oxford Press.; 1; 1995; pp.: 714-715.
- 5 Coiffier et al.; "Phase I/II study of the anti-CD19 maytansinoid immunoconjugate SAR3419 administered weekly to patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL)," 2011 ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, June 2011, Unpublished conference proceedings, 2011.
- 10 Conejo et al.; "Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers;" *Int J Cancer*; 88(1); 2000 Oct 1; pp.:12-20.
- Couturier et al.; "Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma;" *Clinical Cancer Research* 5(10 Suppl.); Oct 1999; pp.: 3165s-3170s.
- 15 Davies EJ et al.; "Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans;" *Ovarian Cancer Clin Cancer Res*; 10(15); 2004; pp.: 5178-86.
- DeGeorge et al.; "Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs;" *Cancer Chemother Pharmacol*; 41(3); 1998; p.: 173-85.
- 20 Dmoszyńska A.; "Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy;" *Pol Arch Med Wewn*; 118(10); Octubre 2008; pp.: 563-6.
- Dhodapkar et al.; "Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation;" *Blood*; 91; 1998; pp.: 2679-2688.
- 25 Dimopoulos et al.; "The role of novel drugs in multiple myeloma;" *Annals of Oncology*19 (Supplement 7); 2008; pp.: vii121-127.
- 30 Dore et al.; "Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies;" *FEBS Lett*; 26; 1998; pp.: 67-70.
- Dowell et al.; "Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse;" *J Clin Pharmacol*; 41; 2001; pp.: 1206-1214.
- 35 Durie et al.; "Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation;" *Hematol J*, 4(6); 2003; pp.: 379-98.
- Durie et al.; "International uniform response criteria for multiple myeloma;" *Leukemia*; 20(12); Diciembre 2006; pp.: 2220.
- 40 Eagan et al.; "Early clinical study of an intermittent schedule for maytansine (NSC-153858): brief communication;" *J Natl Cancer Insti (Bethesda)*; 60; 1978; pp. 93-96.
- 45 Edinger et al.; "Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models;" *Neoplasia*; 1; 1999; pp.:303-310.
- Facon et al.; "Superiority of melphalan–prednisone (MP) + thalidomide (THAL) over MP and autologous stem cell transplantation in the treatment of newly diagnosed elderly patients with multiple myeloma;" *J. Clin. Oncol.*; 24(Suppl. 18); Abstract 1; 2006.
- 50 Fossella et al.; "Phase II Trial of BB-10901 (huN901-DM1) given weekly for four consecutive weeks every 6 weeks in patients with relapsed SCLC and CD56-positive small cell carcinoma;" *J Clin Onco*, ASCO Annual Meeting Proceedings; 23(16S), Part I of II; 1 junio, 2005; 7159; Supplement.
- 55 Galsky et al.; "Phase I Trial of the Prostate-Specific Membrane Antigen–Directed Immunoconjugate MLN2704 in Patients With Progressive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer;" *Journal of Clinical Oncology*; 1 mayo, 2008; pp.: 2147-2154.
- 60 Gattei et al.; "Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells;" *Br J Haematol.*; 104; 1999; pp.: 152-162.
- Ghobrial et al.; "Emerging drugs in multiple myeloma;" *Expert Opin Emerg Drugs*; 12(1); marzo 2007; pp.: 155-63.
- 65 Giles et al.; "Phase I study of AVE9633, an AntiCD33-Maytansinoid Immunoconjugate, Administered as an Intravenous Infusion in Patients with Refractory/Relapsed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia (AML);" *Blood*; 108(11); 16 Noviembre, 2006.

- Greipp et al.; "International staging system for multiple myeloma," *J Clin Oncol*; 23(15); 20 mayo, 2005; pp.:3412-20.
- 5 Greipp y Lust; "Pathogenetic relation between monoclonal gammopathies of undetermined significance and multiple myeloma;" *Stem Cells. 13 Ago. Suppl 2*; 1995; pp.:10-21.
- Gunaratnum et al.; "G-quadruplex compounds and cis-platin act synergistically to inhibit cancer cell growth in vitro and in vivo;" *Biochemical Pharmacology*; 78; 2009; pp.: 115-122.
- 10 Hamann et al.; "An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia;" *Choice of linker; Bioconjug Chem*; 13; 2002; pp.: 40-46.
- Han et al.; "New insights into syndecan-2 expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells;" *J Mol Histol*; 35(3); 2004; pp.: 319-26.
- 15 Hashimoto et al.; "Colorectal Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical study of clinically annotated tumors;" *BMC Cancer* 8; 2008; p.185.
- 20 Helft et al.; "A phase I study of cantuzumab mertansine administered as a single intravenous infusion once weekly in patients with advanced solid tumors;" *Clin Cancer Res*; 10(13); 1 Jul 2004; pp.: 4363-8.
- Hideshima et al.; "Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells;" *Blood*; 107(10); 2006; pp.: 4053-62.
- 25 Hideshima et al.; "Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets;" *Nat Rev Cancer*; 7(8); 2007; pp.: 585-98.
- Hiroshi et al.; "The Monoclonal Antibody nBT062 Conjugated to Cytotoxic Maytansinoids Has Potent and Selective Cytotoxicity against CD138 Positive Multiple Myeloma Cells in Vitro and in Vivo;" *Blood*; (ASH Annual Meeting Abstracts); 112; Noviembre 2008; p.: 1716.
- 30 Holden et al.; "A phase I study of weekly dosing of trastuzumab-DM1 (T-DM1) in patients (pts) with advanced HER2+ breast cancer (BC);" *ASCO Meeting Abstracts*; 20 Mayo, 2008; p.: 1029.
- 35 Horvathova et al.; In: al. SFS, ed. *Leucocyte Typing V.*; Oxford: Oxford University Press; 1995; pp.: 713-714.
- Huang et al.; "Validation and reduction of FACT/GOG-Ntx subscale for platinum/paclitaxel-induced neurologic symptoms: a gynecologic oncology group study;" *Int J Gynecol Cancer*; 17; 2007; pp.: 387-93.
- 40 Hwang et al.; "New Frontiers in the Treatment of Multiple Myeloma;" *Scientific World Journal*; 6; 6 diciembre, 2006; pp.: 1475-503.
- 45 Ikeda et al.; "The monoclonal antibody nBT062 conjugated to maytansinoids has potent and selective cytotoxicity against CD138 positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo;" *Clin. Cancer Research*; 15(12); 2009.
- Ishitsuka et al.; "Targeting CD56 by the maytansinoid immunoconjugate IMG901 (huN901-DM1): a potential therapeutic modality implication against natural killer/T cell malignancy;" *Br. J. Haematol*; 141(1); Abril 2008; pp.:129-31.
- 50 Issell et al.; "Maytansine;" *Cancer Treat Rev*; 5; 1978; pp.: 199-207.
- Jemal et al.; "Cancer statistics;" *CA Cancer J Clin*; 58; 2008; pp.: 71-96.
- 55 Johnson et al.; "Novel and Targeted Agents for Small Cell Lung Cancer;" *ASCO Educational Book*; 1 enero, 2008; pp.: 363-367.
- Kovtun et al.; "Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen;" *Cancer Res*; 66(6); 2006; pp.: 3214-21.
- 60 Kuesters et al.; "Correlation of ErbB2 Gene Status, mRNA and Protein Expression in a Panel of >100 Human Tumor Xenografts of Different Origin;" *Onkologie*; 29; 2006; pp: 249-256.
- Krebs et al.; "High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies;" *J. Immunol. Methods*; 254; 2001; pp.: 67-84.
- 65

- Krop et al.; "A Phase I Study of Trastuzumab-DM1, a First-in-Class HER2 Antibody-Drug Conjugate (ADC), in patients with HER2+ Metastatic Breast Cancer;" 14th European Cancer Conference (ECCO 14); Poster n.º 2118; 2007.
- 5 Kupchan et al.; "Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids;" *J Med Chem*; 21; 1978; pp.:31-37.
- Kyle;" Benign monoclonal gammopathy-after 20 to 35 years of follow-up;" *Mayo Clin Proceedings* 68(1); 1993; pp.:26-36.
- 10 Kyle et al.; "Multiple myeloma;" *N Engl J Med*; 351(18); Octubre 28, 2004; pp.:1860-73.
- Kyle et al.; "Criteria for diagnosis, staging, risk stratification on response assessment of multiple myeloma;" *Leukemia*; 23; 2009; pp.: 3-9.
- 15 Kyoizumi et al.; "Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice;" *Blood*; 79; 1992; pp.:1704-1711.
- Kyoizumi et al.; "Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse;" *Blood*; 81; 1993; pp.:1479-1488.
- 20 Lambert JM; "Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer;" *Current Opinion in Pharmacology*; 5; 2005; pp.: 543-549.
- Langford et al.; "Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function;" *J Biol Chem*; 273(45); 6 Noviembre, 1998; pp.: 29965-71.
- 25 Legrand et al.; "An open label, dose escalation study of AVE9633 administered as a single agent by intravenous (IV) infusion weekly for 2 weeks in a 4-week cycle to patients with relapsed o refractory CD33-positive Acute Myeloid Leukemia (AML);" *Blood*; 118(11); Noviembre 16, 2007.
- 30 Li et al.; "Clinicopathological significance of expression of paxillin, syndecan-1 and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma;" *World J Gastroenterol*. 11(10); 2005; pp.:1445-51.
- Liu et al.; "Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids;" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93; 1996; pp.:8618-8623.
- 35 Loussouarn et al.; "Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas;" *Br J Cancer*; 28; 2008; pp.: 1993-1998.
- Lorigan et al.; "Phase I trial of BB-10901 (huN901-DM1) given daily by IV infusion for three consecutive days every three weeks in patients with SCLC and other CD56-positive solid tumors;" *European Journal of Cancer Supplements*; 4(12); 2006; pp.: 195.
- 40 Ludwig et al.; "Supportive care in multiple myelom Best Practice & Research Clinical Haematology;" 20; Issue 4; 2007; pp.:817-835.
- 45 McCann et al.; "Phase II trial of huN901-DM1 in patients with relapsed small cell lung cancer (SCLC) and CD56-positive small cell carcinoma;" *J Clin Onco*; ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1; 25(18S); 2007 June 20; Supplement; p.:18084.
- 50 Mateos et al.; "Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study;" *Blood*; 108; 2006; pp.: 2165–2172.
- McCune et al.; "The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function;" *Science*; 241; 1998; pp.: 1632-1639.
- 55 Mennerich et al.; "Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours;" *Eur J Cancer*; 40(9); junio 2004; pp.: 1373-82.
- 60 Milowsky et al.; "Phase I/II trial of the prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeted immunoconjugate MLN2704 in patients (pts) with progressive metastatic castration resistant prostate cancer (CRPC);" *J Clin Onco*; ASCO Annual Meeting Proceedings Part I; 24(18S); 2006 p.: 4500.
- 65 Mita et al.; "A phase I study of a CanAg-targeted immunoconjugate, huC242-DM4, in subjects with CanAg-expressing solid tumors;" *J Clin Onco*; ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1; 25(18S); 20 Junio 2007; Supplement; p.: 3062.

- Mitsogiannis et al; "Plasmacytoid transitional cell carcinoma of the urinary bladder;" *Urology*66(1); 2005; p. 194.
- Morgan et al.; "Advances in oral therapy for multiple myeloma;" *Lancet Oncol*; 7(4); Abril 2006; pp.:316-25.
- 5 Mosmann T.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays;" *J Immunol Methods*; 65; 1983 pp.:55-63.
- Munshi et al.; "Plasma cell disorders;" In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors; *Harrison's Principles of Internal Medicine*; 16a ed; New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. pp.: 700-707.
- 10 Namikawa et al.; "Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice;" *Blood*; 82; 1993; pp.:2526-2536.
- 15 NCCN Guidelines; "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology;" Multiple Myeloma V.2.2009; National Comprehensive Cancer Network; 9 Noviembre, 2008; *disponible en* www.nccn.org.
- Ning et al.; "Liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for relapsed o refractory multiple myeloma;" *Oncology (Williston Park)*; 21(12); Noviembre 277; pp.:1503-8.
- 20 Numa et al.;"Syndecan-1 expression in cancer of the uterine cervix: association with lymph node metastasis;" *Int J Oncol*. 20(1); pp.:2002 39-43.
- Ocio et al., "New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings;" *Lancet Oncol*: 9(12); Diciembre 2008; pp.:1157-65.
- 25 O'Connell et al.; "CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms;" *Am J Clin Pathol*; 121; 2004; pp.:254-263.
- 30 Ojima et al.; "Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates;" *J. Med. Chem.*; 45; 2002; pp. 5620–5623.
- Oken et al.; "Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group;" *Am J Clin Oncol*; 5; 1982; pp.: 649-655.
- 35 Olafsen et al.; "Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications;" *Prot. Eng. Design & Selection* 17; 1; 2004; pp.:21-27.
- Orosz et al.; "Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours;" *Anticancer Res*; 21(1B); 2001; pp.:733-7.
- 40 Padlan, EA; "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties;" *Mol. Immunol.*; 28; 1991; pp.: 489–498.
- Palacios et al.; "B-B4 monoclonal antibody and identification of human bone marrow plasma cells;" *Br J Haematol*; 96(3); marzo 1997; pp.:655-657.
- 45 Palumbo et al.; "Oral revlimid plus melphalan and prednisone (R-MP) for newly diagnosed multiple myeloma: results of a multicenter Phase I/II study;" *Blood*; 108; (ASH Annual Meeting Abstracts); Abstract 800; 2006.
- 50 Palumbo et al.; "Treatment of newly diagnosed myeloma;" *Leukemia*; 23; Noviembre 13, 2008; pp.: 449-456.
- Patriarca et al.; "Considerations in the treatment of multiple myeloma: a consensus statement from Italian experts;" *Eur J Haematol*; 82(2); February 2009; pp.:93-105.
- 55 Payne G.; "Progress in immunoconjugate cancer therapeutics;" *Cancer Cell*; 3; 2003; pp.:207-212.
- Pegram et al.; "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment;" *J. Clin. Oncol.*; 16; 1998; pp.: 2659–2671.
- 60 Podar et al.; "Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy;" *Leukemia*; 23(1); January 2009; pp.: 10-24.
- Qin et al.; "The pharmacokinetics and pharmacodynamics of IMG242 (huC242-DM4) in patients with CanAg-expressing solid tumors;" *Journal of Clinical Oncology*, 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition); 26(15S); May 20, 2008; Supplement; p.: 3066.
- 65

- Quach et al.; "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (ImiDS) in multiple myeloma," *Leukemia*; 24; 2010; pp.: 22-32.
- 5 Raje et al.; "Therapeutic use of immunomodulatory drugs in the treatment of multiple myeloma;" *Expert Rev Anticancer Ther*; 6(9); Septiembre 2006; pp.: 1239-47.
- Rajkumar et al.; "Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma;" *Blood*; diciembre 15, 2005; 106(13); pp.: 4050–4053.
- 10 Rajkumar et al.; "Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: A clinical trial coordinated by the Eastern cooperative Oncology Group;" *J Clin Oncol* 2006; 24; pp.: 431-436.
- 15 Rajkumar et al.; "A Randomized Trial of Lenalidomide Plus High-Dose Dexamethasone (RD) Versus Lenalidomide Plus Low-Dose Dexamethasone (Rd) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (E4A03): A Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group;" *Blood*; 110; 2007; p.: 74.
- 20 Rawstron et al.; "Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage;" *Br J Haematol*; 97; 1997; pp.: 46-55.
- Remillard et al.; "Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine;" *Science*; 198; 1975; pp.:1002-1005.
Richardson et al.; "New treatments for multiple myeloma;" *Oncology (Williston Park)*; 19(14); diciembre 2005; pp.:1781-92.
- 25 Richardson et al.; "Lenalidomide in multiple myeloma;" *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(8); agosto 2006; pp.:1165-73.
- Richardson et al.; "New Drugs for Myeloma;" *Oncologist Jun*; 12(6); 2007; pp.:664-89.
- 30 Richardson et al.; "Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone as front-line-therapy for patients with multiple myeloma (MM): preliminary results of a phase I/II study;" *Blood*; 110; 2007; p.: 63a.
- Riechelmann et al.; "Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma;" *Oral Oncol*; 44(9); Septiembre 2008; pp.:823-9.
- 35 Roh et al.; "Syndecan-1 expression in gallbladder cancer and its prognostic significance;" *Eur Surg Res*. 41(2); 2008; pp.:245-50.
- 40 Roguska et al.; "Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing;" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91; 1994; pp.:969-973.
- Ross et al.; "Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate;" *Cancer Res.*; May 1, 2002; 62(9) pp.:2546-53.
- 45 Ross et al.; "Anticancer Antibodies;" *Am J Clin Path*; 119; Abril 17, 2003; pp.: 472-485.
- Rowinsky et al.; "SB-408075, a tumor-activated immunoconjugate targeting the C242 CanAg antigen with a potent maytansinoid payload: phase I, pharmacokinetic (PK), and biological studies;" *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: Abstract n.º 118; 2002.
- 50 Rupp et al.; "Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study;" *Anticancer Drugs*; 18(4); Abril 2007; pp.:477-485.
- 55 Salfeld, "Isotype selection in antibody engineering", *Nat. Biotechnol.* 25 (12), 2007, pp. 1369–1372.
- Sanderson et al.; "B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation;" *Cell Regul.*; 1989; 1; pp.:27-35.
- 60 Sandhu et al.; "Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone;" *Blood*; 88; 1996; pp.:1973-1982.
- Sankhala et al.; "A phase I and pharmacokinetic study of a CanAg-targeted immunoconjugate, HuC242-DM4, in patients with CanAg-expressing solid tumors;" *AACR-NCI-EORTC "Molecular Targets and Cancer Therapeutics" International Conference*; Abstract n.º B70; 2007.
- 65 Sasaki et al.; "Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude

- mice;" *Cancer Res.*; 55; 1995; pp.: 3551-3557.
- 5 Sauter et al.; „Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck;" *Int J Oncol.*; 30(4); Abril 2007; pp.: 927-35.
- Schneider et al.; "Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen;" *Br J Haematol*; 97; 1997; pp.: 56-64.
- 10 Schuurman, et al.; "Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites;" *Immunology*; 97; 1999; pp.: 693-698.
- Sebestyen et al.; "Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*;" 104(2); 1999; pp.: 412-9.
- 15 Seftalioglu et al.; "Syndecan-1/CD138 expression in normal myeloid, acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells;" *Acta Histochem*; 105; 2003; pp.:213-221.
- Seftalioglu et al.; "Syndecan-1 (CD138) expression in acute myeloblastic leukemia cells--an immuno electron microscopic study;" *Acta Oncol*; 42; 2003; pp.:71-74.
- 20 Senter et al.; "Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates;" Abstract n.º 2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.); 2007; p.: 414.
- 25 Shah et al.; "Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma;" *Cancer* 101(7); 2004 ; pp.:1632-8.
- Shields et al.; "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R.;" *J Biol Chem*; 276(9); 2001; pp.:6591-604.
- 30 Sievers et al.; "Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse;" *J. Clin. Oncol.*; 19; 2001; pp. 3244–3254.
- 35 Sievers et al.; "Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age;" *Curr. Opin. Oncol.*; 13; 2001; pp. 522–527.
- Smith R.; "Single chain antibody variable region fragments;" *available at www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html* (last updated on May, 2001).
- 40 Strobeck M; "Multiple Myeloma therapies;" *Nature Reviews Drug Discovery*; 6(3); March 2007; pp.: 181-82.
- Studnicka et al.; "Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues;" *Protein Eng.*; 7(6); 1994 pp.: 805-814.
- 45 Tai et al; "Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications;" *Cancer Res.* 2005 Dic 15; 65(24):11712-20.
- 50 Takimoto et al.; "Principles of oncologic pharmacotherapy;" *Cancer Management: A multidisciplinary Approach*; 11ª Edición; Chapter 3; 2008; Abril 15, 2009; disponible en <http://www.cancernetwork.com/display/article/10165/1402628>.
- Tassone et al.; "Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4–DM1 against CD138⁺ multiple myeloma cells;" *Blood*; 104(12); 2004; pp.: 3688-3696.
- 55 Terpos et al.; "European Myeloma NetworkThe use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network;" *Ann Oncol.* 20(8); 2009; pp.:1303-17.
- 60 Tijink et al.; " A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck o esophagus;" *Clin Cancer Res*; 12(20 Pt 1); Octubre 15, 2006; pp.:6064-72.
- 65 Tolcher et al.; "A Phase I study of huC242-DM4 to assess the safety and pharmacokinetics of huC242-DM4 administered as a single intravenous infusion once every three weeks to subjects with solid tumors;" *European Journal of Cancer Supplements*; 12(4); 2006 p.: 66.

- Tolcher et al.; "Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study;" *J Clin Oncol*; 21; 2003; pp.: 211-222.
- 5 Tomayko et al., "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice;" *Cancer Chemother. Pharmacol*, 24; 1989; pp.: 148.
- Toyoshima et al.; "Expression of syndecan-1 is common in human lung cancers independent of expression of epidermal growth factor receptor;" *Lung Cancer* 31(2-3); 2001; pp.:193-202.
- 10 Udi, "In vitro analyse von Standard und innovativen anti-Multiplen Myelom (MM)-Therapien auf MM-Zelllinien und deren Interaktion mit dem Knochenmark (KM)-Milieu," Diss. Medical University Clinic and Polyclinic, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany, 2010.
- 15 Urashima et al; "The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow;" *Blood*; 90; 1997; pp.: 754-765.
- Vogel, CW; "Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties;" *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods*; 283; 2007 pp.: 87-108.
- 20 Vooijs et al; "Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins;" *Cancer Immunol Immunother*; 42; 1996; pp.: 319-328.
- Wang et al.; "Targeted proteasome inhibition by Velcade induces apoptosis in human mesothelioma and breast cancer cell lines;" *Cancer Chemother Pharmacol*; diciembre 4, 2009.
- 25 Ward et al.; "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*;" *Nature*; 341; 1989; pp.:544-546.
- 30 Wargalla et al.; "Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells;" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 86; 1989; pp.:5146-5150.
- Weber et al.; "Lenalidomide plus high-dose dexamethasone provides improved overall survival compared to high-dose dexamethasone alone for relapsed or refractory multiple myeloma (MM): results of 2 Phase III studies (MM-009, MM-010) and subgroup analysis of patients with impaired renal function;" *Blood*; 108; (ASH Annual Meeting Abstracts); Abstract 3547; 2006.
- 35 Wiksten et al.; "Comparison of the prognostic value of a panel of tissue tumor markers and established clinicopathological factors in patients with gastric cancer;" *Gastric: Anticancer Res.* 28(4C); 2008; pp.: 2279-87.
- 40 Wijdenes et al.; "A plasmocyte selective mAb (B-B4) recognizes syndecan-1;" *Br J Haematol*; 94(2) agosto 1996; pp.:318-23.
- Wijdenes et al.; "CD138;" *J Biol Regul Homeost Agents*; 16(2) Abril-June 2002; pp.: 152-155.
- 45 Witzig et al; "Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry;" *Cytometry*; 26; 1996; pp.: 113-120.
- Xie et al.; "Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice;" *J Pharmacol Exp Ther.*; 308(3); March 2004; pp.:1073-82.
- 50 Yang et al.; "Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models;" *Clin Cancer Res*; 5; 1999; pp.: 3549-3559.
- Yang et al.; "Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases;" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97; 200; pp.:1206-1211.
- 55 Yang et al.; "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy;" *Blood*; 110(6); Septiembre 15, 2007 pp.: 2041-8.
- 60 Yasui et al.; "Recent advances in the treatment of Multiple Myeloma;" *Curr Pharm Biotechnol*; 7(5); Octubre 2006; pp.:381-93.
- Yoshitake et al.; "Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide;" *Eur J Biochem*; 101; 1979; pp.: 395-399.
- 65 Yu et al.; "Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel;"

Cancer Research; 61; January 15, 2001; pp.: 517-525.

Zellweger et al.; "Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer;" Prostate 55(1); 2003; pp.:20-9.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotest AG ImmunoGen, Inc.

10

<120> USOS DE INMUNOCONJUGADOS DIRIGIDOS A CD138

<130> 332630WO/CJS

15

<140>

<141>

<150> 61/722.367

<151> 05-11-2012

20

<150> 61/568.640

<151> 08-12-2011

<160> 13

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos (predicha) de la cadena pesada de anticuerpo quimérico humano/ratón

35

<220>

<221> CDR1

<222> (31)..(35)

40

<220>

<221> CDR2

<222> (51)..(68)

45

<220>

<221> CDR3

<222> (99)..(111)

<400> 1

ES 2 684 950 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos (predicha) de la cadena ligera de anticuerpo quimérico humano/ratón

<220>

<221> CDR1

<222> (24)..(34)

15 <220>

<221> CDR2

<222> (50)..(56)

20 <220>

<221> CDR3

<222> (89)..(97)

<400> 2

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

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

25

ES 2 684 950 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador MHV7 IgH
 10 <400> 3
 atgggcatca agatggagtc acagaccag g 31
 <210> 4
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 684 950 T3

<220>
 <223> cebador MHCG1 de la región constante IgG1

 <400> 4
 5 cagtgatag acagatgggg g 21

 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador MKV2 de Ig kappa

 <400> 5
 15 atggagacag acacactcct gctatgggtg 30

 <210> 6
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador MKV4 de Ig kappa

 <400> 6
 25 atgagggccc ctgctcagtt tttggcttc ttg 33

 <210> 7
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador MKV9 de Ig kappa

 <400> 7
 35 atggtatcca cacctcagtt ccttg 25

 <210> 8
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador MKC

 <400> 8
 50 actggatggt gggaagatgg 20

 <210> 9
 <211> 50
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo (For)

 <400> 9
 60 agagaagctt gccgccacca tgattgctc tgctcagttc cttggtctcc 50

 <210> 10
 <211> 35
 <212> ADN

ES 2 684 950 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador BT03 de oligonucleótido

5

<400> 10
caacagtata gtaagctccc tcggacgttc ggtgg 35

<210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cebador BT04 de oligonucleótido

15

<400> 11
ccaccgaacg tcggaggag ctactatac tgttg 35

20

<210> 12
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> cebador g2258

<400> 12
cgcggatcc actcaggtt gattccagc ttggtgcctc c 41

30

<210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador g22949

<400> 13
cgatgggcc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttcc 45

40

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto humano,
- 5 donde el inmunoconjugado comprende al menos un anticuerpo dirigido a diana de ingeniería que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, donde dicho anticuerpo dirigido a diana de ingeniería se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoconjugado, donde preferentemente al menos parte del anticuerpo dirigido a diana de ingeniería confiere propiedades de isotipo
- 10 IgG4, donde la molécula efectora es al menos un maitansinoide, donde el anticuerpo dirigido a diana de ingeniería comprende:
- (i) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 51 a 68 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1; y
- 15 (ii) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 2, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 50 a 56 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2;
- donde el inmunoconjugado ha de administrarse en un régimen de múltiples dosis, donde la dosis de agregado a administrarse dentro de un ciclo de tratamiento activo es una dosis tolerable máxima agregada (AMTD) o una fracción de AMTD y donde dicha AMTD y/o dicha fracción excede la dosis que resulta en toxicidad limitante de dosis (DLT) cuando el inmunoconjugado se administra como una dosis única, incluyendo como parte de un régimen de dosis única múltiple dentro de dicho ciclo de tratamiento activo y/o excede la dosis tolerable máxima (MTD) cuando el inmunoconjugado se administra como una sola dosis, incluyendo como parte de un régimen de dosis única múltiple dentro de dicho ciclo de tratamiento activo,
- 25 donde la dosis tolerable máxima agregada es al menos 240 mg/m², preferentemente 300 mg/m², preferentemente 360 mg/m², preferentemente 420 mg/m², donde la dosis que resulta en dicha toxicidad limitante de dosis es 200 mg/m² y/o la dosis tolerable máxima al menos 160 mg/m² o al menos 180 mg/m²,
- 30 donde el inmunoconjugado ha de administrarse en un ciclo de tratamiento activo de 21 días, al menos tres veces dentro de dichos 21 días, donde el ciclo de tratamiento activo incluye la administración del inmunoconjugado realizándose al menos una vez a la semana, donde la enfermedad asociada a las células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata,
- 40 carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato-carcinoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de timo, carcinoma de útero, carcinoma urinario o carcinoma de ovario.
2. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple.
- 45
3. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
- (i) el inmunoconjugado ha de administrarse en dosis iguales; y/o
- 50 (ii) dicho régimen de dosis múltiples dura 3 semanas y se sigue de un periodo de reposo y preferentemente donde la supervivencia libre de progreso o enfermedad estable se mantienen durante el periodo de reposo, más preferentemente donde un nivel de dicho inmunoconjugado en un fluido corporal de dicho sujeto, durante el periodo de reposo es al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml o 6 µg/ml y/o donde más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % del CD138 de células diana aisladas se ocupan por dicho inmunoconjugado dentro de cuatro a veinticuatro horas después de completar la administración del inmunoconjugado.
- 55
4. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho efector es un maitansinoide, en particular DM4, y donde una cantidad total de maitansinoide a administrarse a dicho paciente dentro de los 21 días es mayor que 2 mg/m², mayor que 3 mg/m², mayor que 4 mg/m², mayor que 5 mg/m², mayor que 6 mg/m², mayor que 7 mg/m², mayor que 8 mg/m², mayor que 9 mg/m² o mayor que mayor que 10 mg/m².
- 60
5. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la AMTD excede la dosis de dicha DLT en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 % o al menos un 120 % y dicho MTD en
- 65

al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 120 % o al menos un 140 %.

6. El inmunoc conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ciclo de tratamiento activo incluye que dicho inmunoc conjugado se administre al menos una vez a la semana a dosis iguales durante al menos tres semanas y el ciclo de tratamiento activo preferentemente se sigue de un periodo de reposo de al menos una semana, que en conjunto definen un ciclo de tratamiento de al menos 28 días y donde después de uno, dos o más ciclos de tratamiento, el inmunoc conjugado es capaz de lograr al menos enfermedad estable,
y preferentemente donde

(i) dicho inmunoc conjugado ha de administrarse cada 3^{er} día, cada 4^o día, cada 5^o día o cada 6^o día durante dicho periodo de tres semanas; y/o
(ii) el inmunoc conjugado es capaz de mantener al menos enfermedad estable durante tres, cuatro, cinco, seis, siete ciclos de tratamiento, preferentemente donde después de alcanzar al menos enfermedad estable, el inmunoc conjugado ha de administrarse como una terapia de mantenimiento menor al doble dentro del ciclo de tratamiento activo preferentemente como una dosis sencilla repetida de entre 60 mg/m² y 280 mg/m², incluyendo aproximadamente 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 110 mg/m², aproximadamente 120 mg/m², aproximadamente 130 mg/m², aproximadamente 140 mg/m², 150 mg/m², aproximadamente 160 mg/m², aproximadamente 170 mg/m², aproximadamente 180 mg/m², aproximadamente 190 mg/m², aproximadamente 200 mg/m², aproximadamente 210 mg/m², aproximadamente 220 mg/m², aproximadamente 230 mg/m², aproximadamente 240 mg/m², aproximadamente 250 mg/m², aproximadamente 260 mg/m² y aproximadamente 270 mg/m² y lo más preferentemente donde el inmunoc conjugado es capaz de obtener al menos supervivencia libre de progreso, enfermedad estable y o una respuesta menor durante más de 3 meses durante dicha terapia de mantenimiento.

7. El inmunoc conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el inmunoc conjugado ha de administrarse como una dosis múltiple repetida en dicho ciclo de tratamiento activo y es capaz de dar como resultado una cantidad eficaz agregada y un primer nivel del inmunoc conjugado en un fluido corporal del sujeto y donde, una cantidad equivalente a dicha cantidad eficaz agregada ha de administrarse como una sola dosis o dosis sencilla repetida en el ciclo de tratamiento activo y es capaz de dar como resultado un segundo nivel del inmunoc conjugado en un fluido corporal de dicho sujeto, donde el primer nivel es igual a o inferior al segundo nivel, por ejemplo mayor del 10 %, mayor del 20 % o mayor del 30 % por debajo del segundo nivel,
y preferentemente donde:

(i) el ciclo de tratamiento activo dura 21 días y/o la dosis múltiple repetida consiste en 3 dosis iguales preferentemente equidistantes, más preferentemente que han de administrarse los días 1, 8 y 15; y/o
(ii) dicha cantidad eficaz agregada es al menos 240 mg/m², 260 mg/m² o 280 mg/m².

8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 en un sujeto humano, donde la composición farmacéutica comprende al menos un inmunoc conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable,
donde el inmunoc conjugado comprende al menos un anticuerpo que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, donde dicho anticuerpo dirigido se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado,
donde la molécula efectora es al menos un maitansinoide,
donde el anticuerpo dirigido comprende:

(i) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 51 a 68 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1; y
(ii) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 2, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los restos de aminoácidos 50 a 56 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2;

donde la composición farmacéutica ha de administrarse en un ciclo de tratamiento activo que se sigue opcionalmente por un periodo de reposo,
donde la composición farmacéutica ha de administrarse durante al menos tres semanas sola o en combinación con un agente citotóxico,
donde el ciclo de tratamiento activo ha de durar al menos 21 días y la composición farmacéutica ha de administrarse una vez a la semana a una dosis del inmunoc conjugado de aproximadamente 80 mg/m² a aproximadamente 140 mg/m²,
y donde la enfermedad asociada a las células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple, carcinoma de células

- renales, cáncer de endometrio, cáncer cervical, adenocarcinoma de próstata, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma mamario, hepato-carcinoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkiniano, carcinoma de timo, carcinoma de útero, carcinoma urinario o carcinoma de ovario, preferentemente donde la enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 es mieloma múltiple.
- 5
9. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
- 10 (a) dicha administración del inmunoconjugado o de la composición farmacéutica ha de seguirse, después de al menos dos ciclos de tratamiento de 21 días, cada uno opcionalmente seguido de un periodo de reposo, por una administración adicional de dicho inmunoconjugado o dicha composición farmacéutica como una terapia de mantenimiento y preferentemente donde la terapia de mantenimiento comprende administrar el inmunoconjugado o una composición farmacéutica que comprende el mismo (i) una vez cada tres a seis semanas o (ii) a múltiples dosis repetidas, donde cada dosis individual del inmunoconjugado es aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m² o aproximadamente 100 mg/m² menor que la dosis individual de una terapia primaria y/o en donde las dosis individuales se administran en intervalos que exceden el intervalo de las dosis individuales, por ejemplo en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días y/o
- 15
- 20 (b) la administración de dicho inmunoconjugado como un régimen de múltiples dosis es capaz de dar como resultado, 0-2 horas después de completar la administración en un nivel de plasma promedio de al menos 7 µg/ml, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60 o 70 µg/ml.
- 25
10. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el sujeto ha de recibir al menos un agente citotóxico, incluyendo dos o tres, al menos una vez a la semana o una vez en un ciclo de tratamiento, y preferentemente donde:
- 30 (i) dicho agente citotóxico es lenalidomida y/o dexametasona: y/o
(ii) lenalidomida ha de administrarse a una dosis de 5 a 35 mg, con preferencia a aproximadamente 25 mg, o a una dosis menor a 25, 20, 15 o 10 mg, por ejemplo oralmente una vez al día por 21 días y/o en donde dexametasona se administra a una dosis de 20 a 50 mg, preferentemente a aproximadamente 40 mg, o a una dosis menor a 40 o 30 mg, por ejemplo oralmente una vez al día durante 21 días.
- 35
11. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde
- 40 (i) dicho sujeto no ha sido expuesto previamente a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que hace diana en células que expresan CD138, a lenalidomida y/o a dexametasona; o
(ii) dicho sujeto se ha expuesto previamente a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que hace diana en células que expresan CD138, y/o lenalidomida y/o dexametasona y preferentemente:
- 45 (a) donde dicho sujeto tiene el relapso después de dicha exposición previa; o
(b) donde dicho sujeto responde a la exposición a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido a células que expresan CD138, lenalidomida y/o dexametasona, preferentemente donde dichas células diana que expresan CD138 son refractarias a exposición a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido a células que expresan CD138, lenalidomida y/o dexametasona.
- 50
12. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho sujeto padece un tumor sólido que comprende hacer diana en células que expresan CD138 y donde dicho tumor sólido es refractario a terapia de hormonas de cáncer o quimioterapia o el sujeto tiene relapso después de la terapia de hormonas o quimioterapia, donde el inmunoconjugado es capaz de dar como resultado al menos retraso de crecimiento de tumor o estasis de tumor; y preferentemente donde dicho tumor sólido es negativo receptor de estrógeno y/o negativo receptor de progesterona y/o negativo Her2/neu.
- 55
13. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto ha recibido una administración de un anticuerpo sin conjugar dirigido a células que expresan CD138, donde dicho inmunoconjugado ha de administrarse 1-6, preferentemente 2-4 horas después de completarse la administración de dicho anticuerpo sin conjugar y preferentemente donde:
- 60 (i) el anticuerpo sin conjugar se administró a una dosis que corresponde a un nivel de 10 a 30 µg/ml de inmunoconjugado en un fluido corporal del sujeto, en particular un nivel plasmático del sujeto, preferentemente donde la dosis administrada corresponde a aproximadamente una diferencia entre un nivel teórico y real de dicho inmunoconjugado en un fluido corporal, 0-2 horas después de completarse a una dosis de 10 a 40 mg/m², preferentemente 20-30 mg/m²; y/o
- 65 (ii) dicho anticuerpo se administró a una dosis de 10 a 40 mg/m², preferentemente 20-30 mg/m²; y/o
(iii) dicho inmunoconjugado ha de administrarse a una dosis individual que es hasta 10 mg/m² a 30 mg/m² menor

que la dosis que se administraría sin dicha administración de dicho anticuerpo sin conjugar.

14. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el al menos un maitansinoide es DM1, DM3 o DM4 y es preferentemente DM4.

5 15. El inmunoconjugado o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cadena ligera tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y la cadena pesada tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y preferentemente
10 donde la cadena ligera tiene SEQ ID NO: 2 y la cadena pesada tiene SEQ ID NO: 1.

FIG. 1

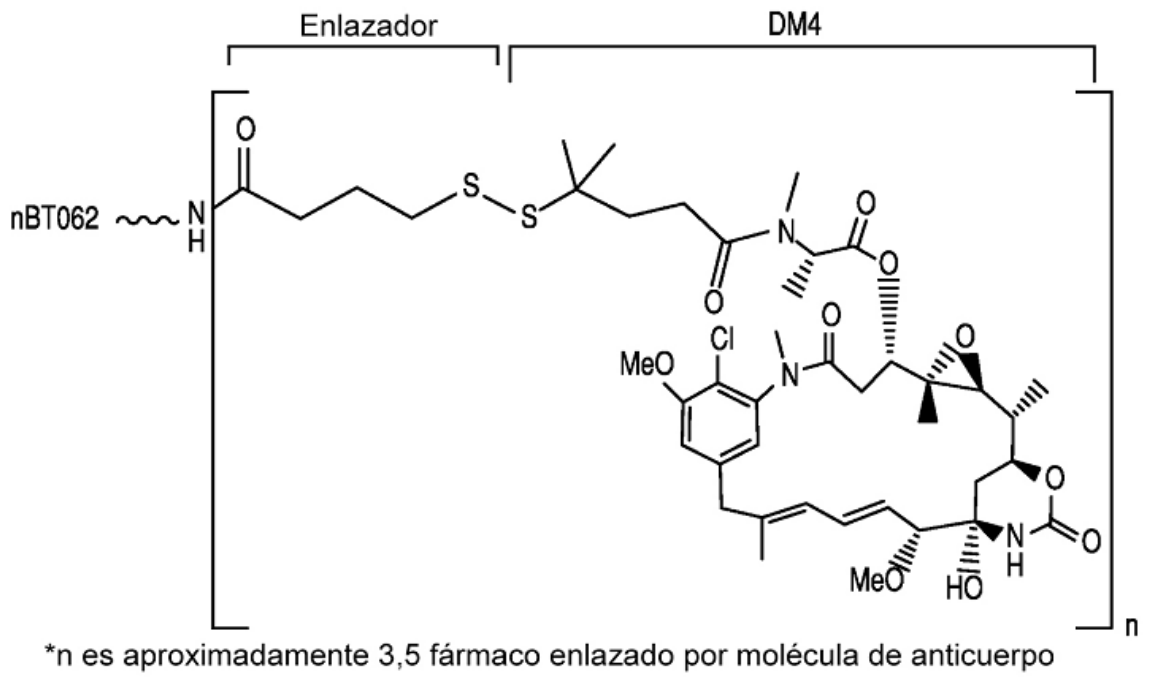
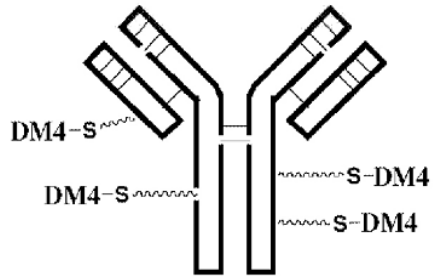


FIG. 2

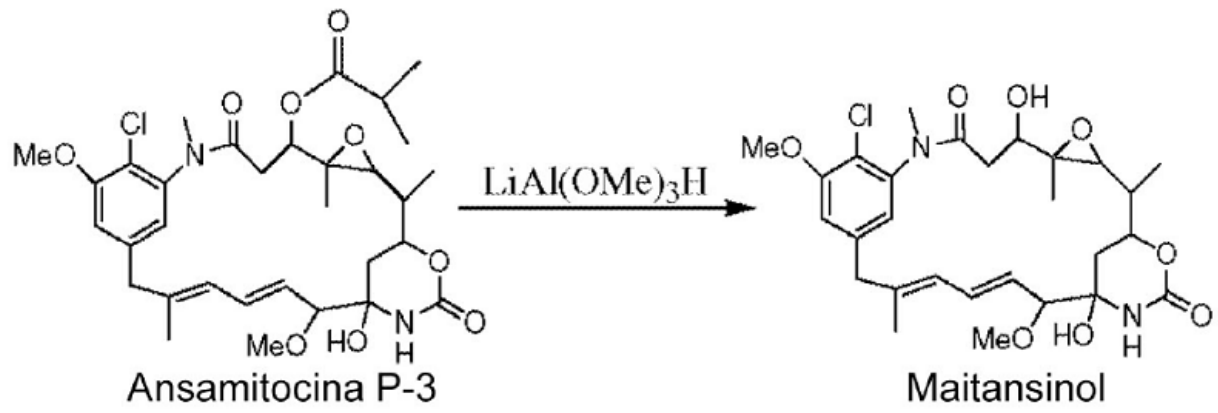


FIG. 3

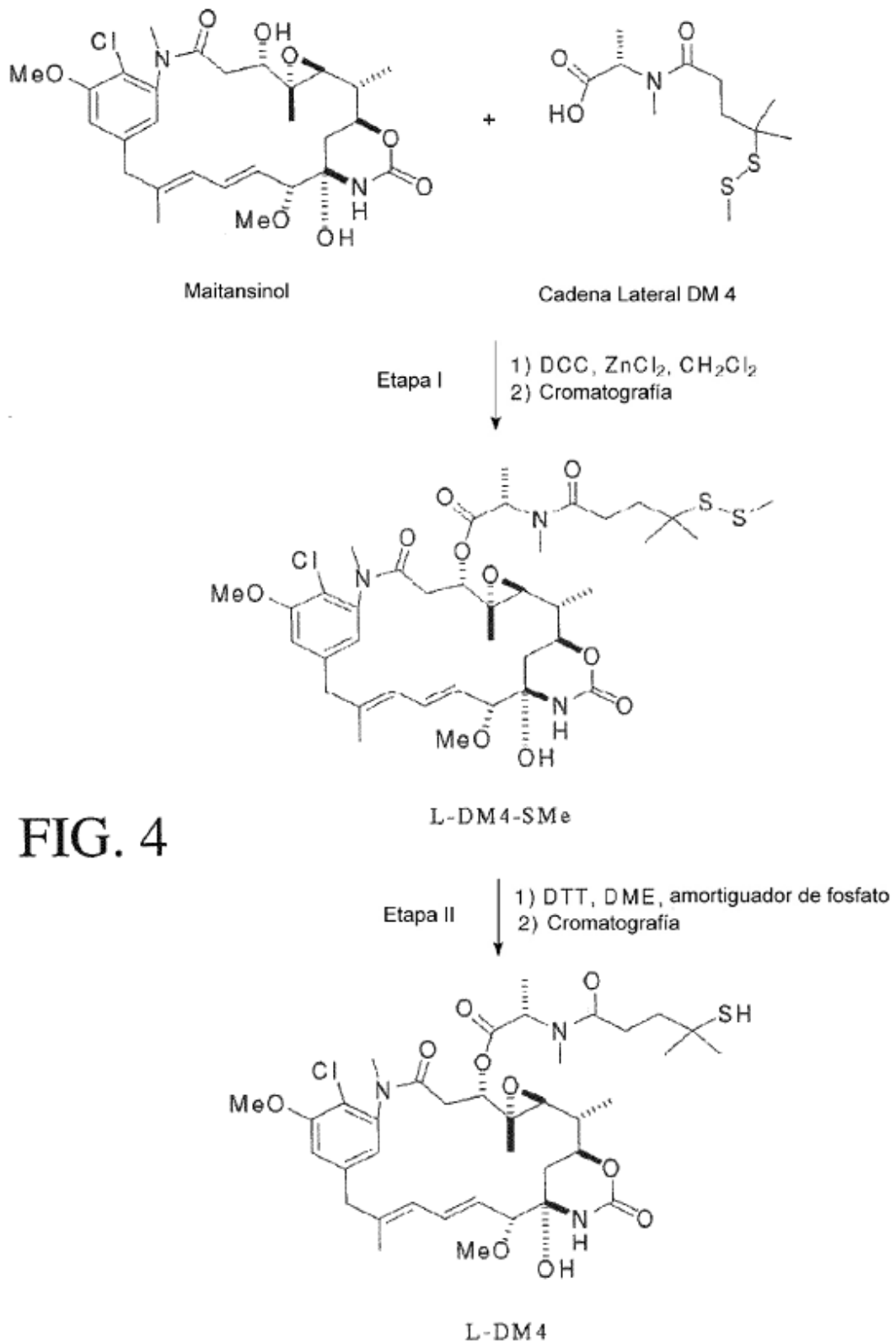


FIG. 4

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

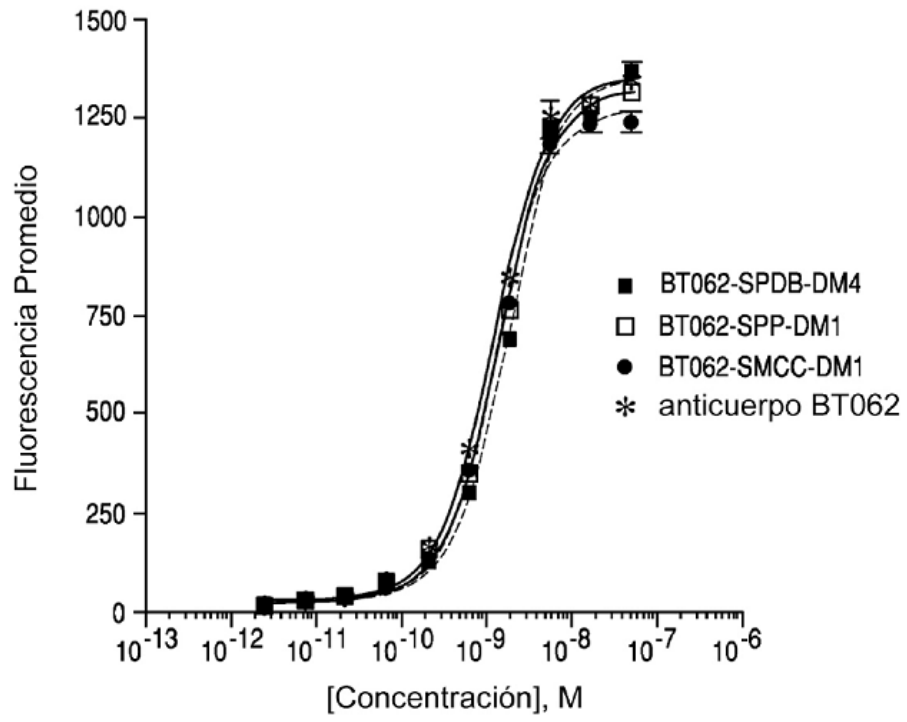


FIG. 6

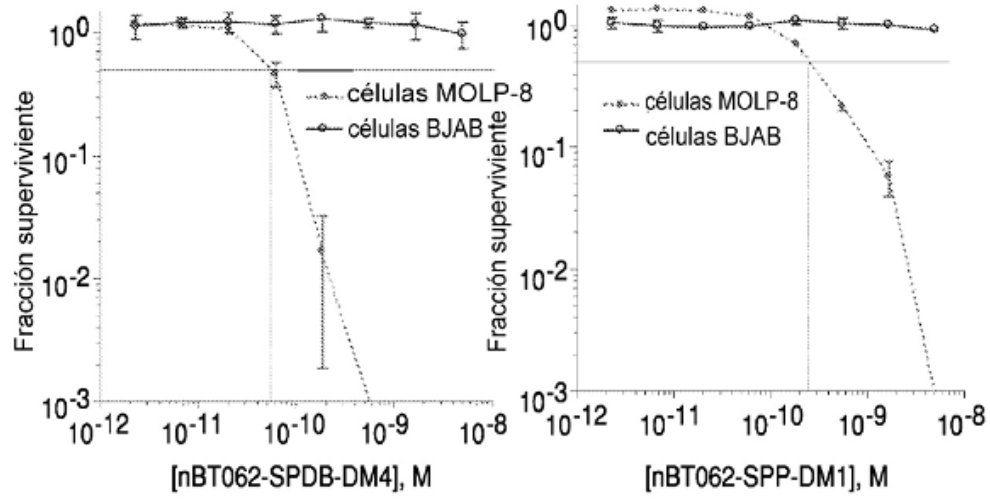


FIG. 7A

FIG. 7B

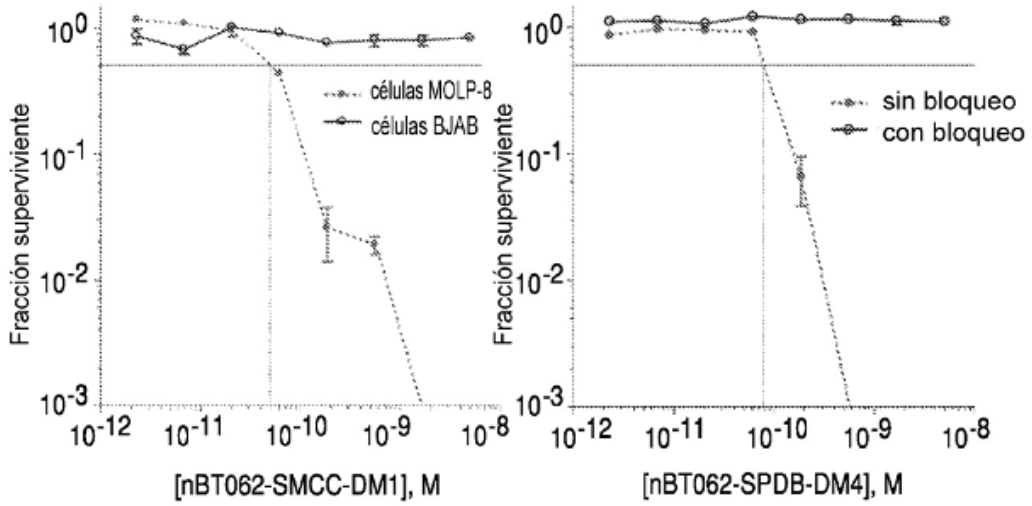


FIG. 7C

FIG. 7D

FIG. 8

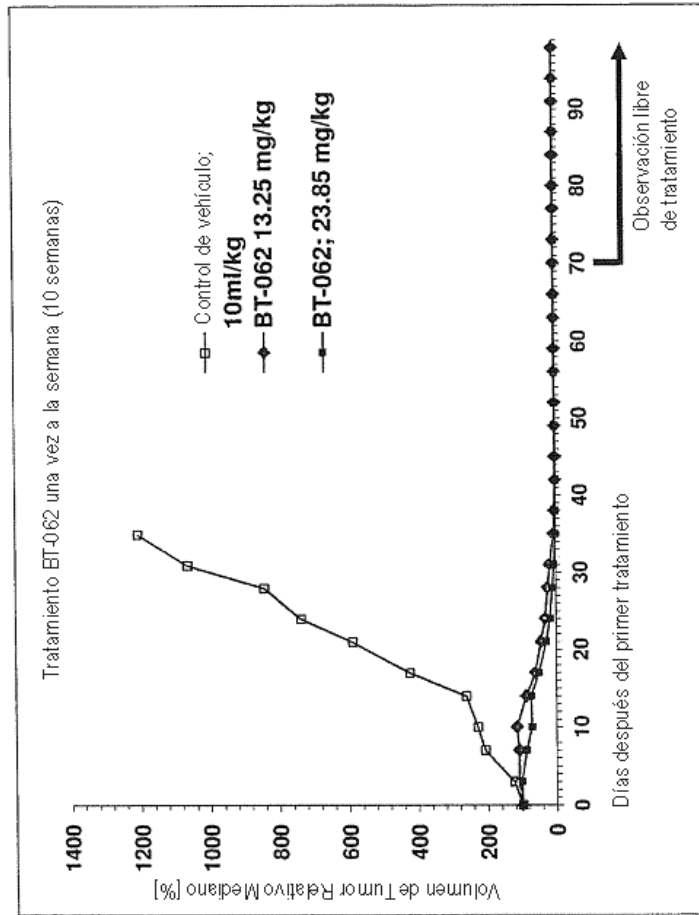


FIG. 9

Modelo de xenoinjerto: Carcinoma mamario:
Remisión completa en todos los ratones tratados con BT-062

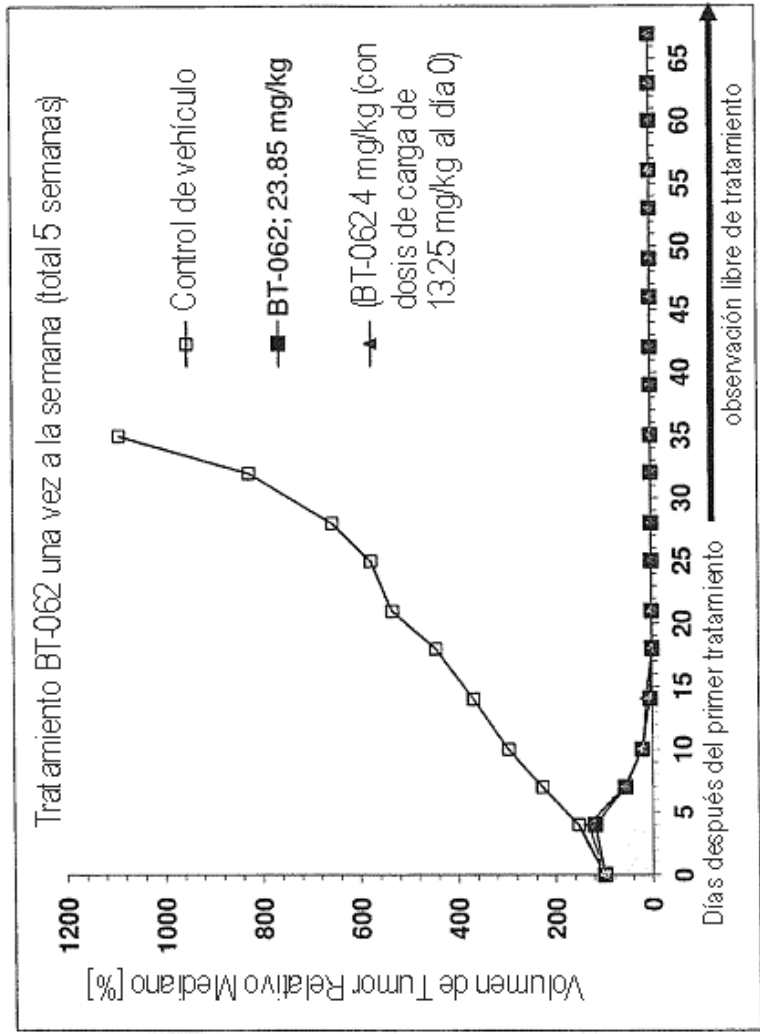


FIG. 10

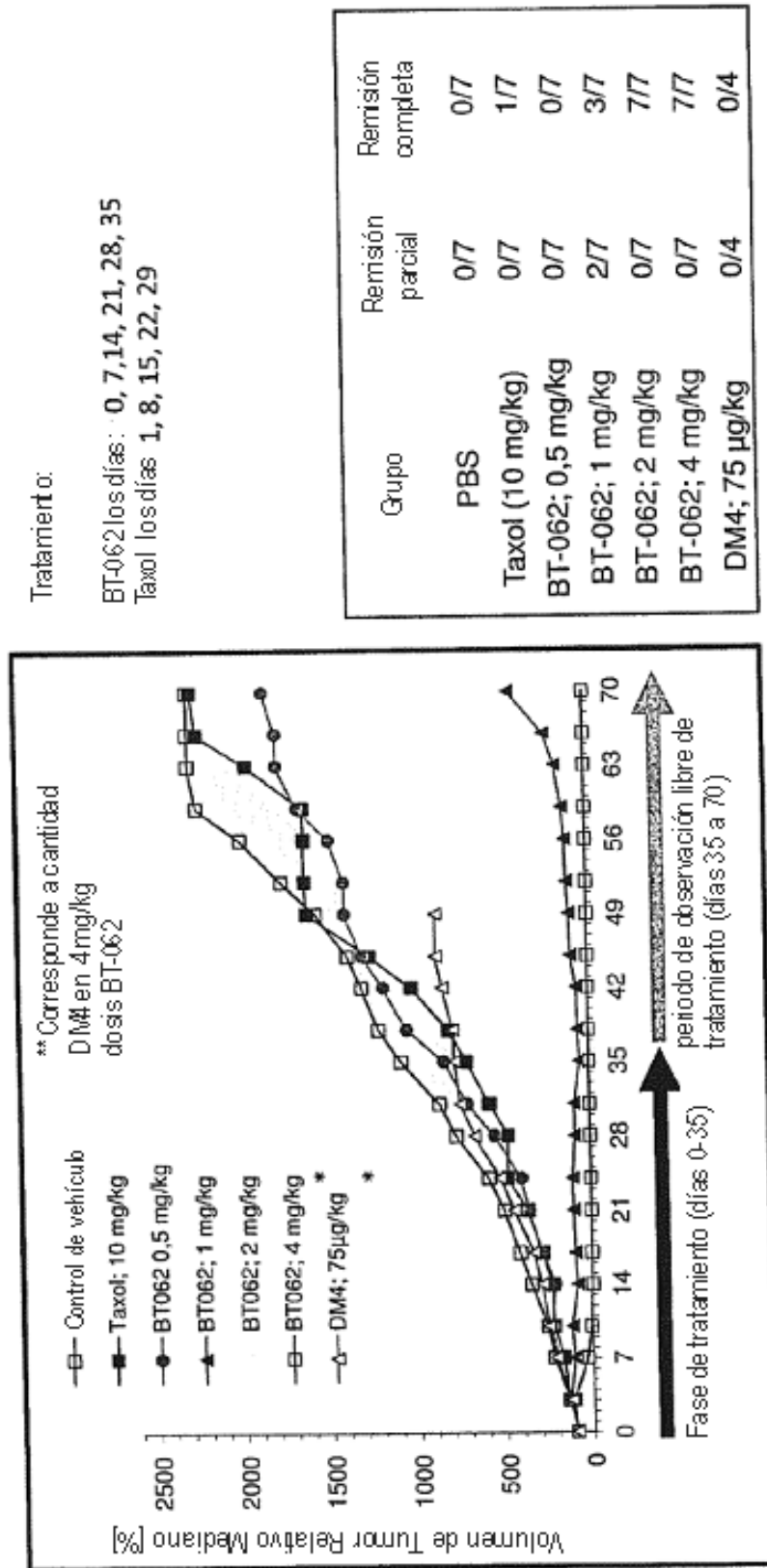


FIG. 11

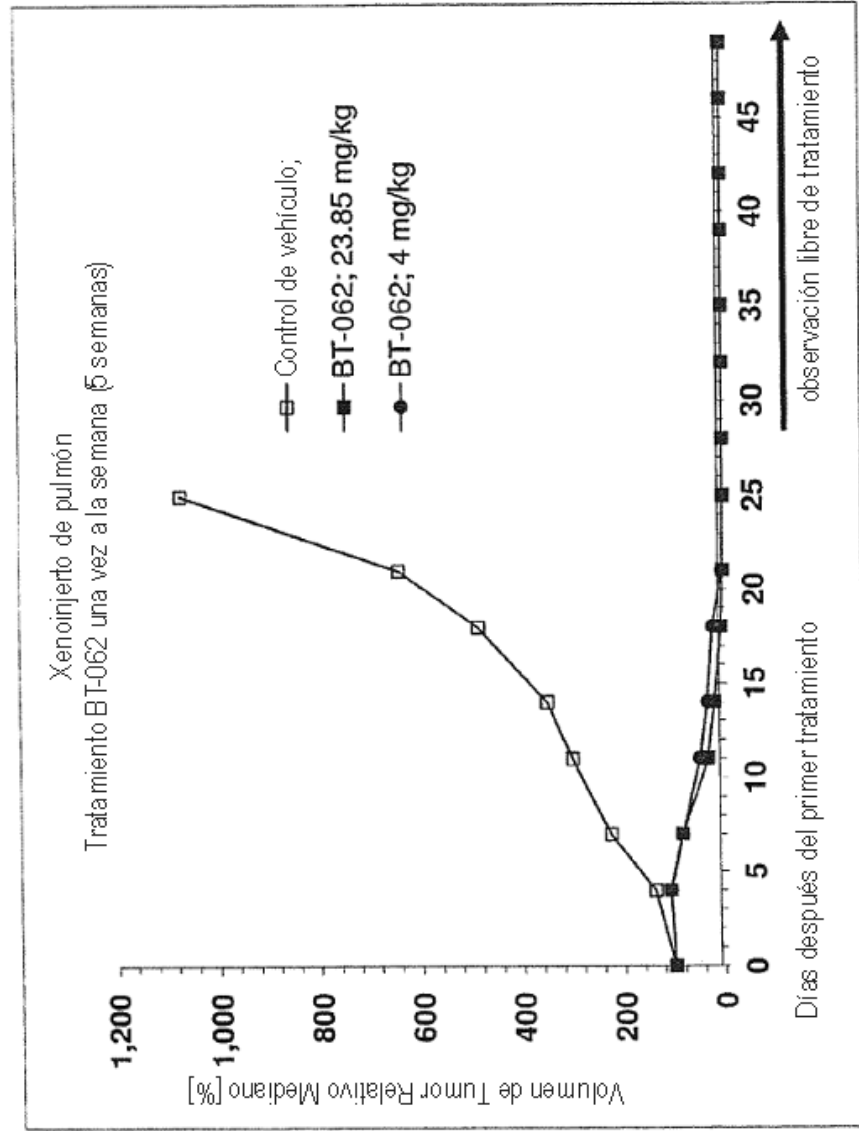


FIG. 12

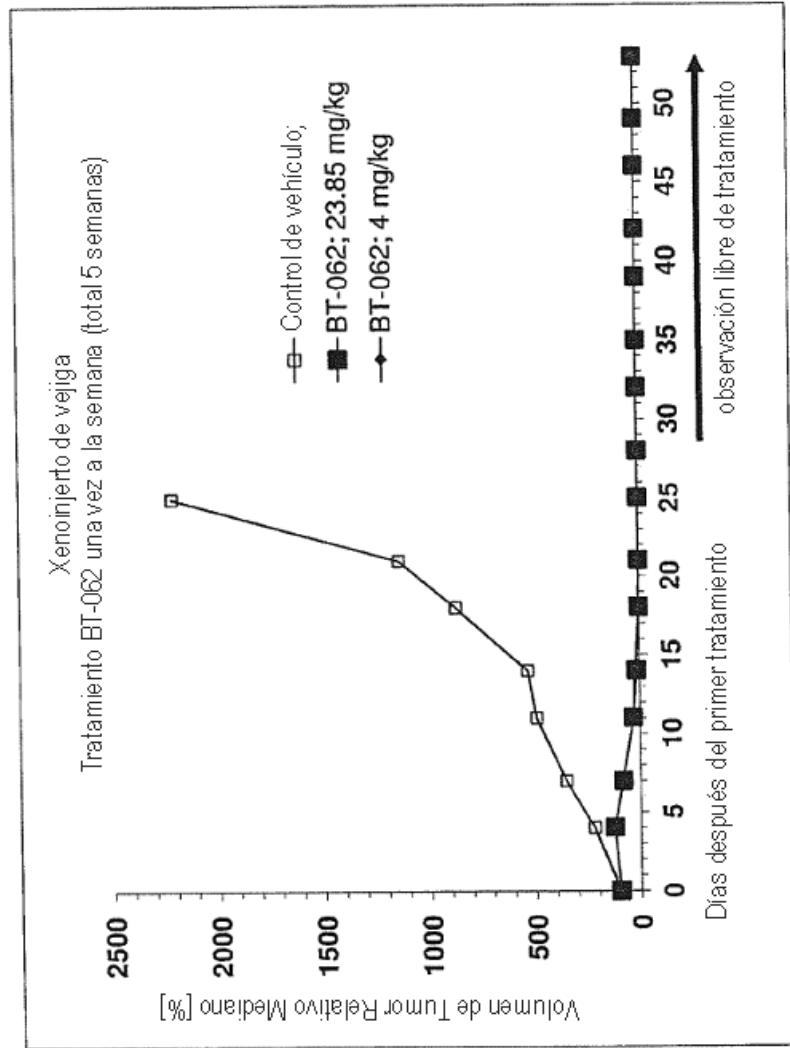


FIG. 13

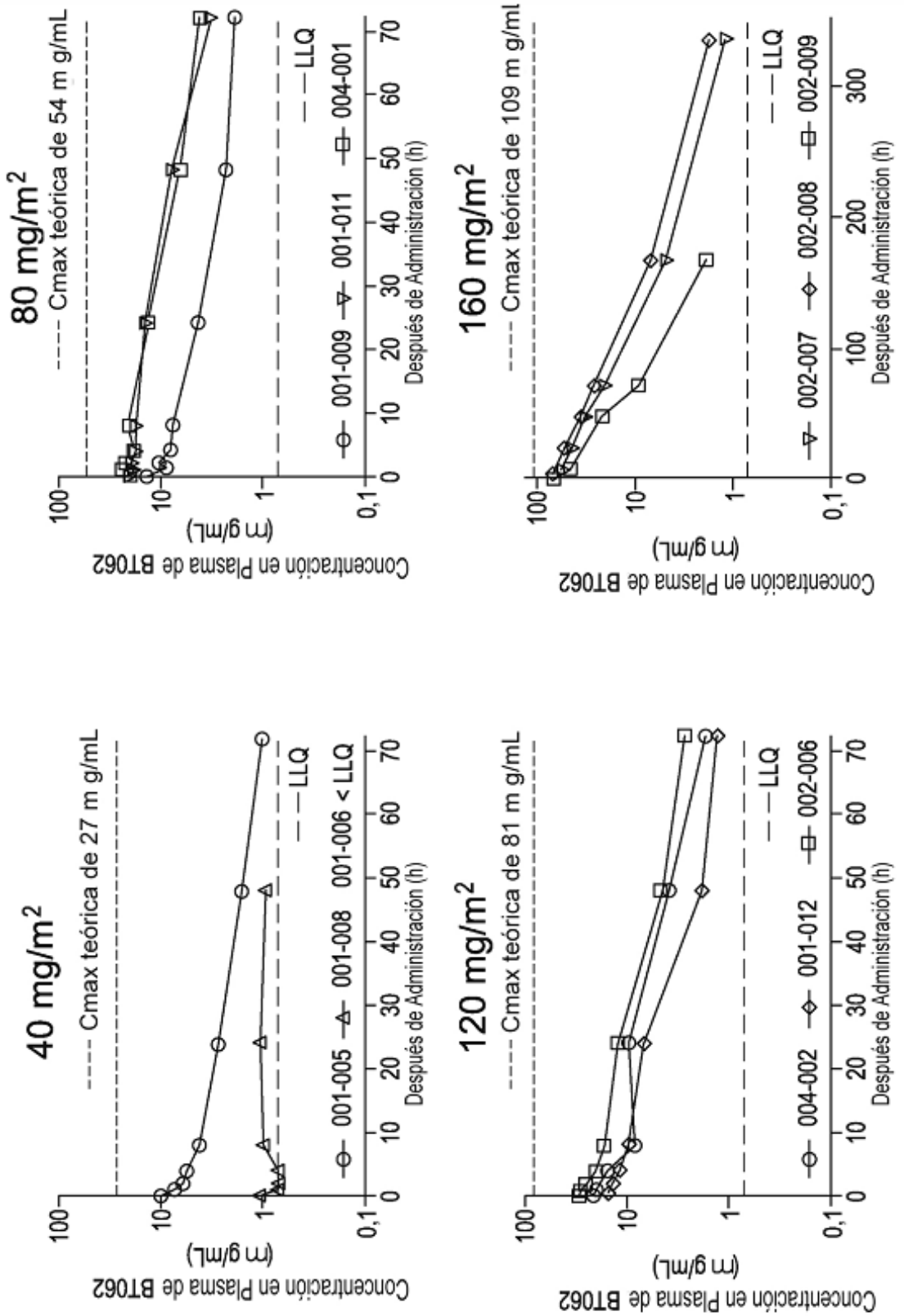


FIG. 14

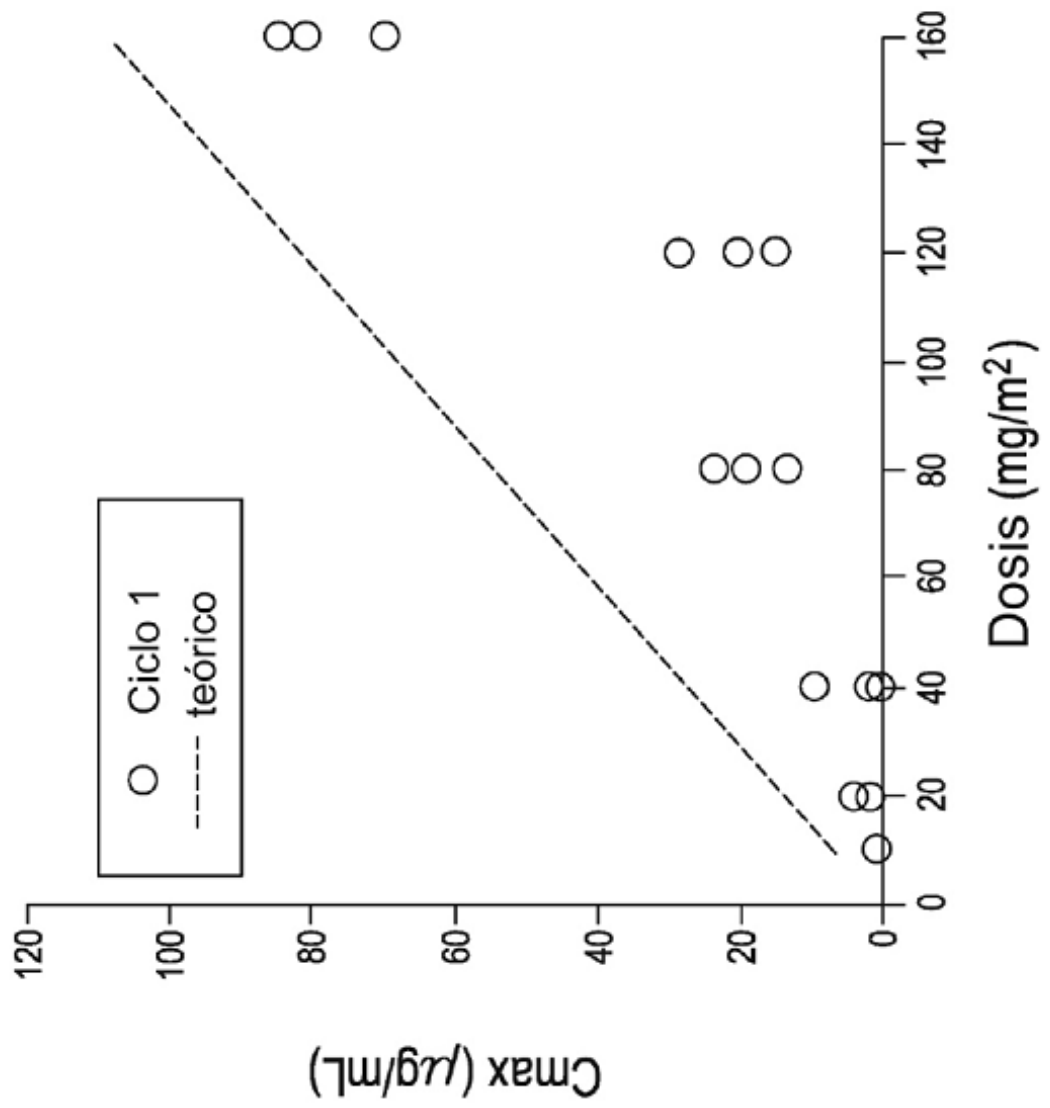


FIG. 15

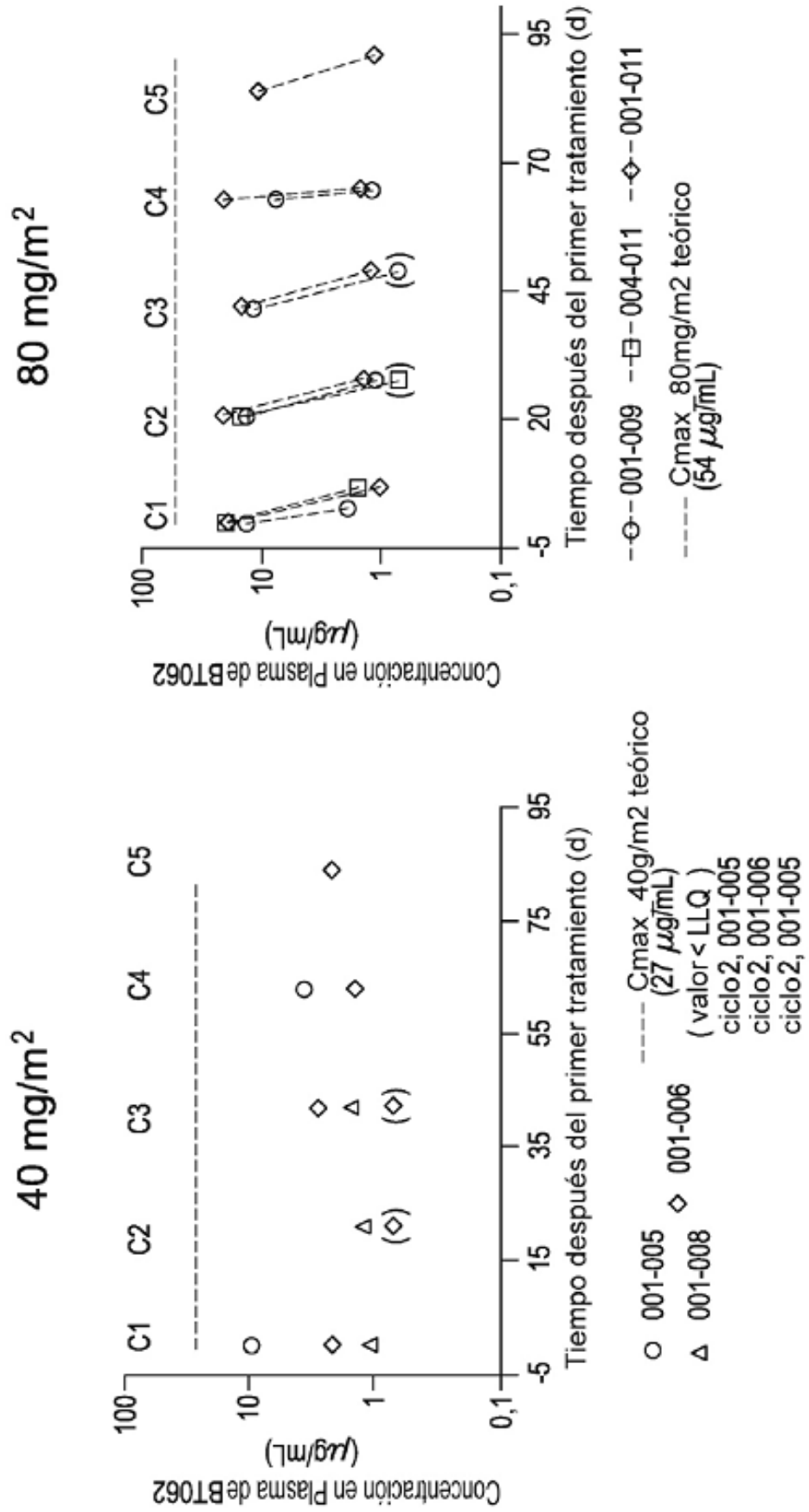


FIG. 16

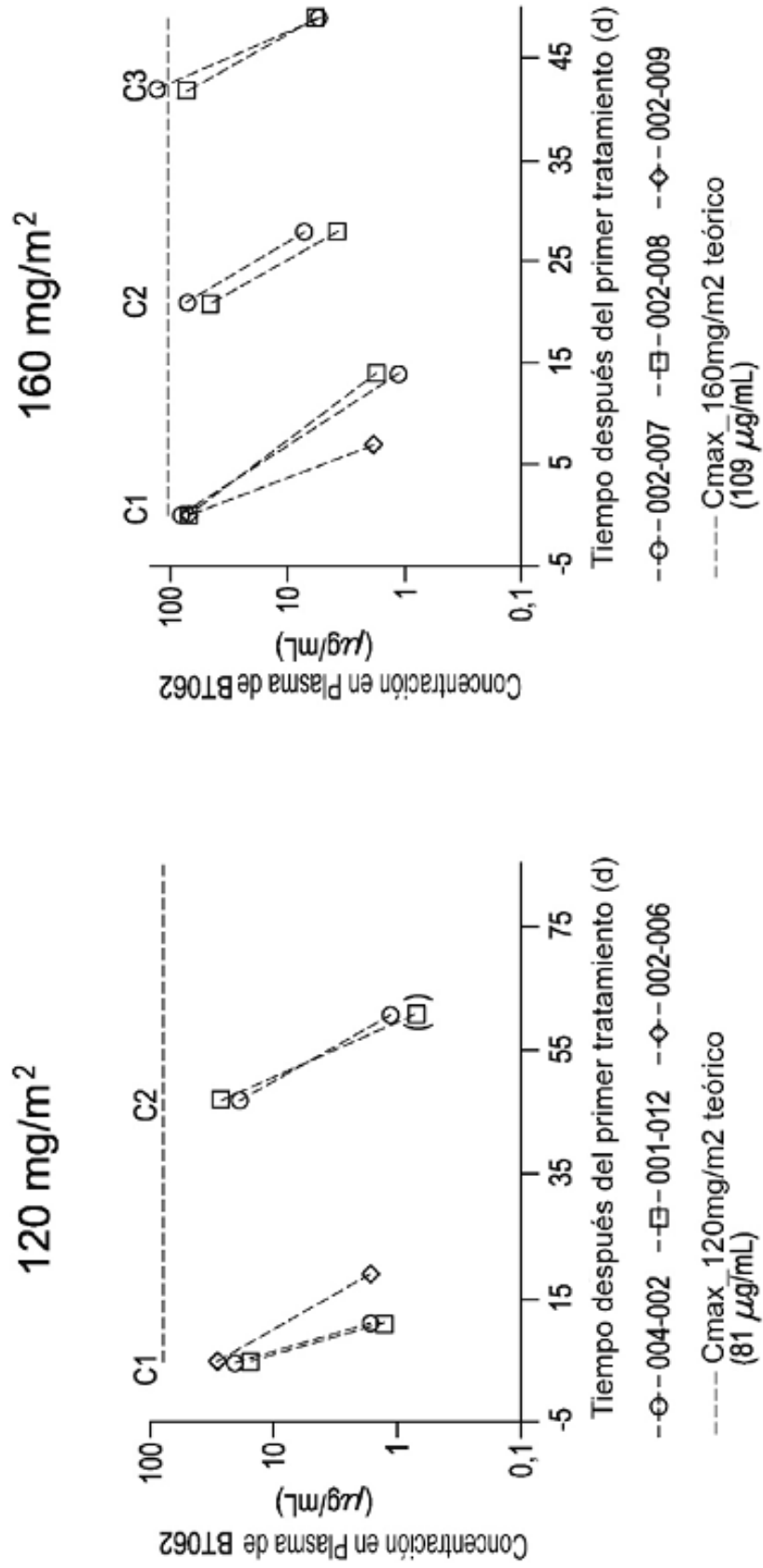
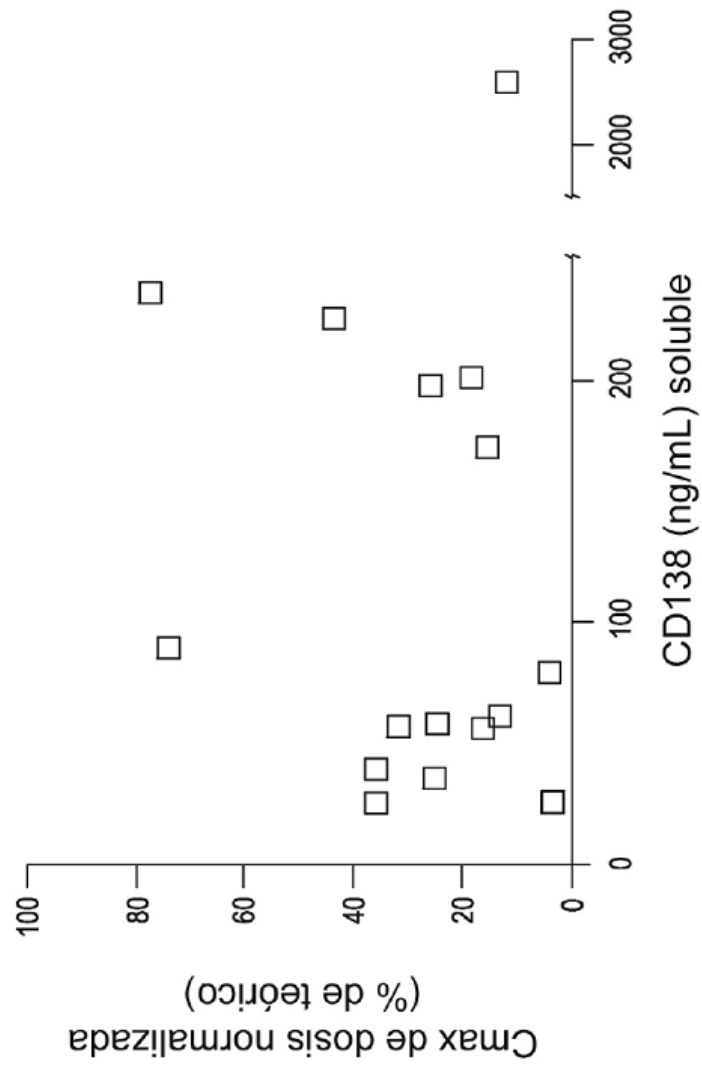


FIG. 17



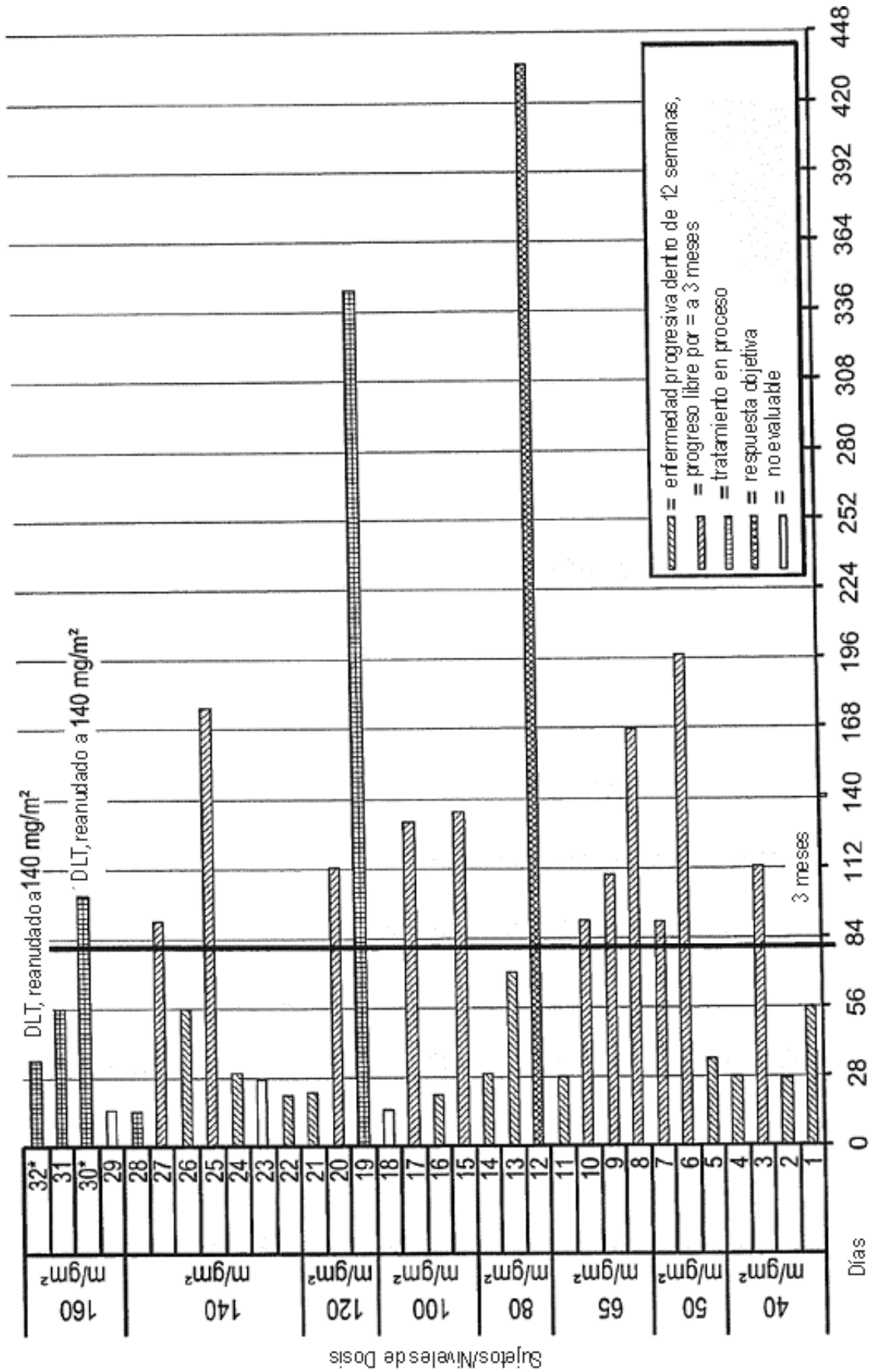


FIG. 18

Leyenda: Pacientes No. 30 y 32: DLT, reanudado a 140 mg/m²

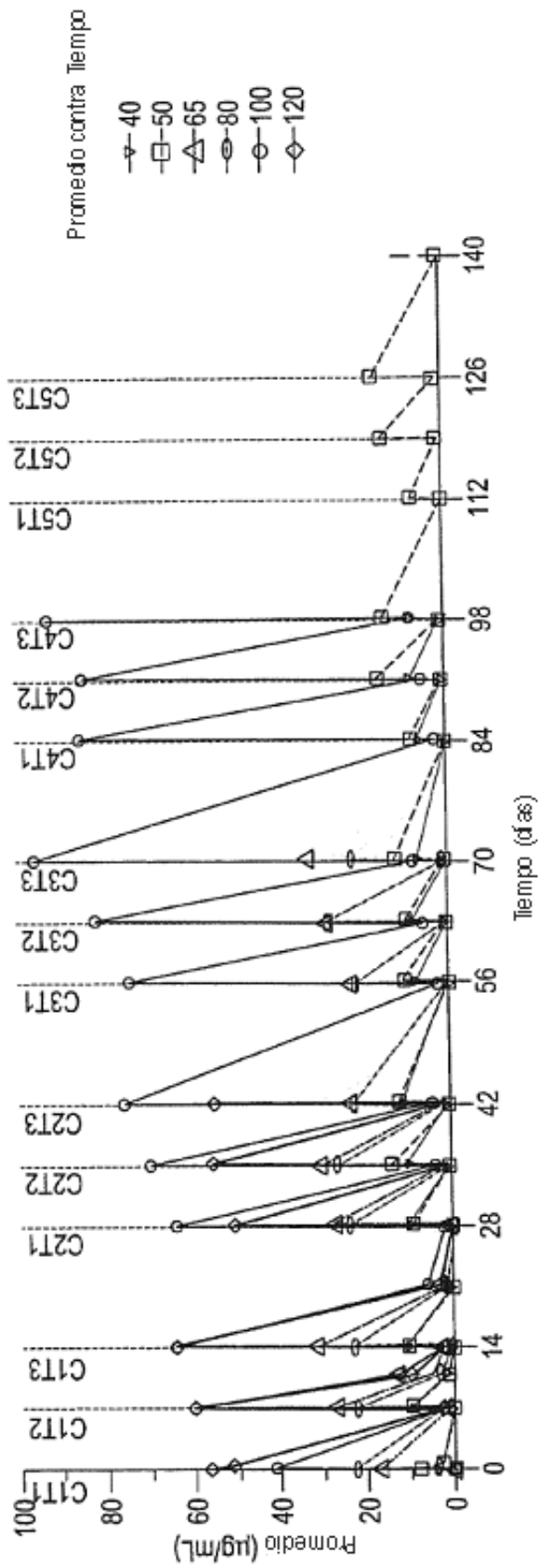


FIG. 19A

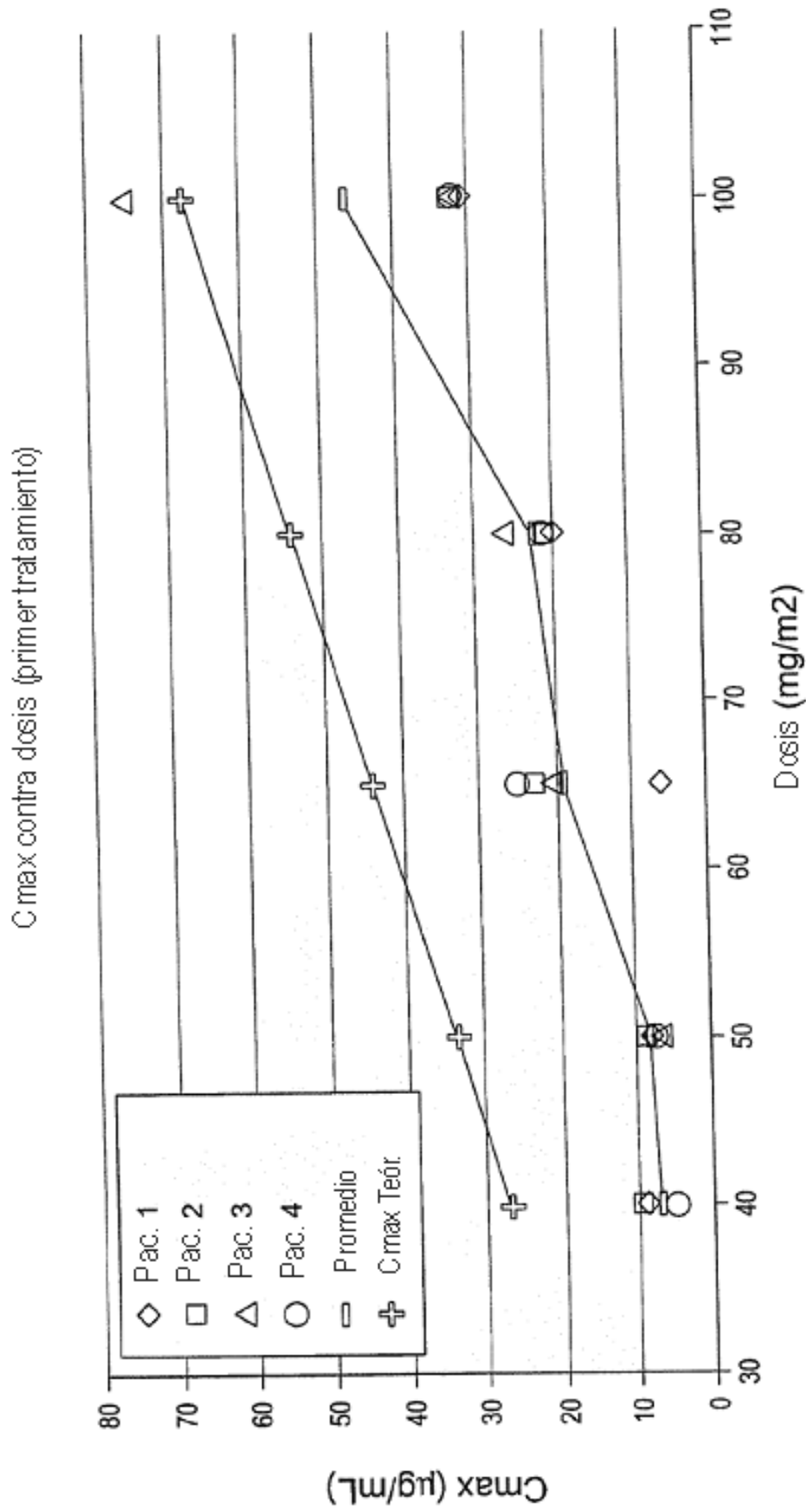


FIG. 19B

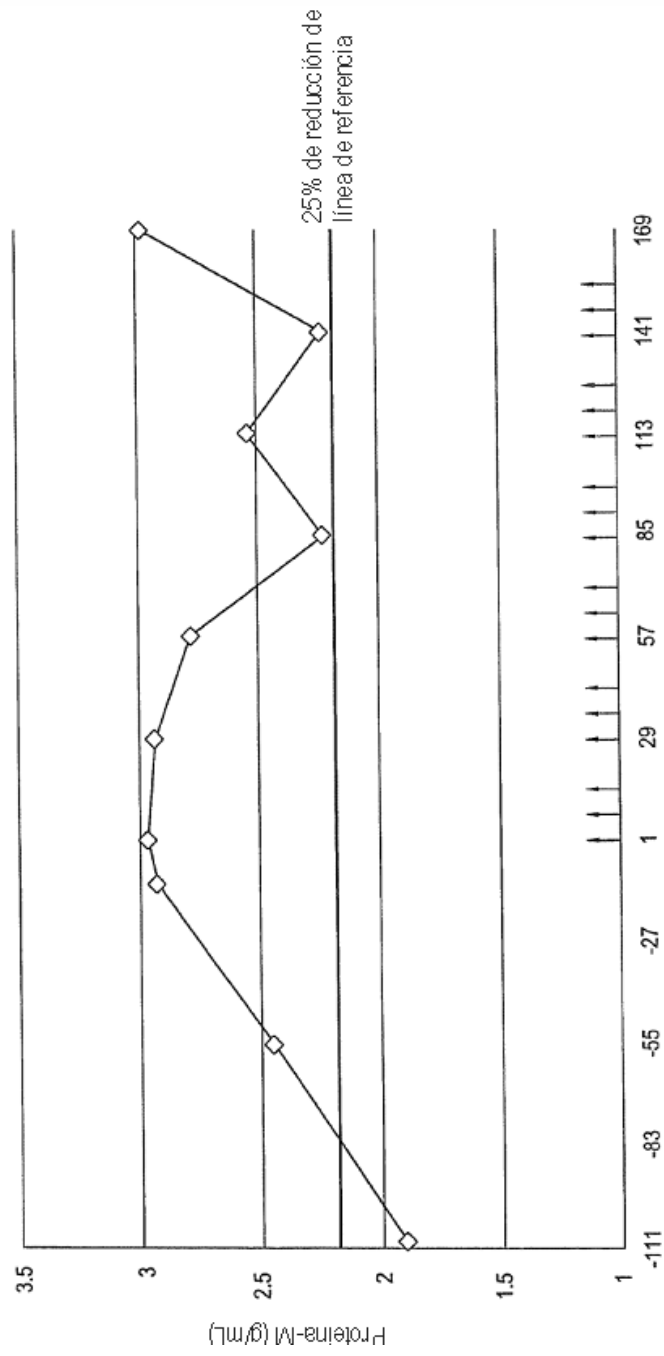


FIG. 20

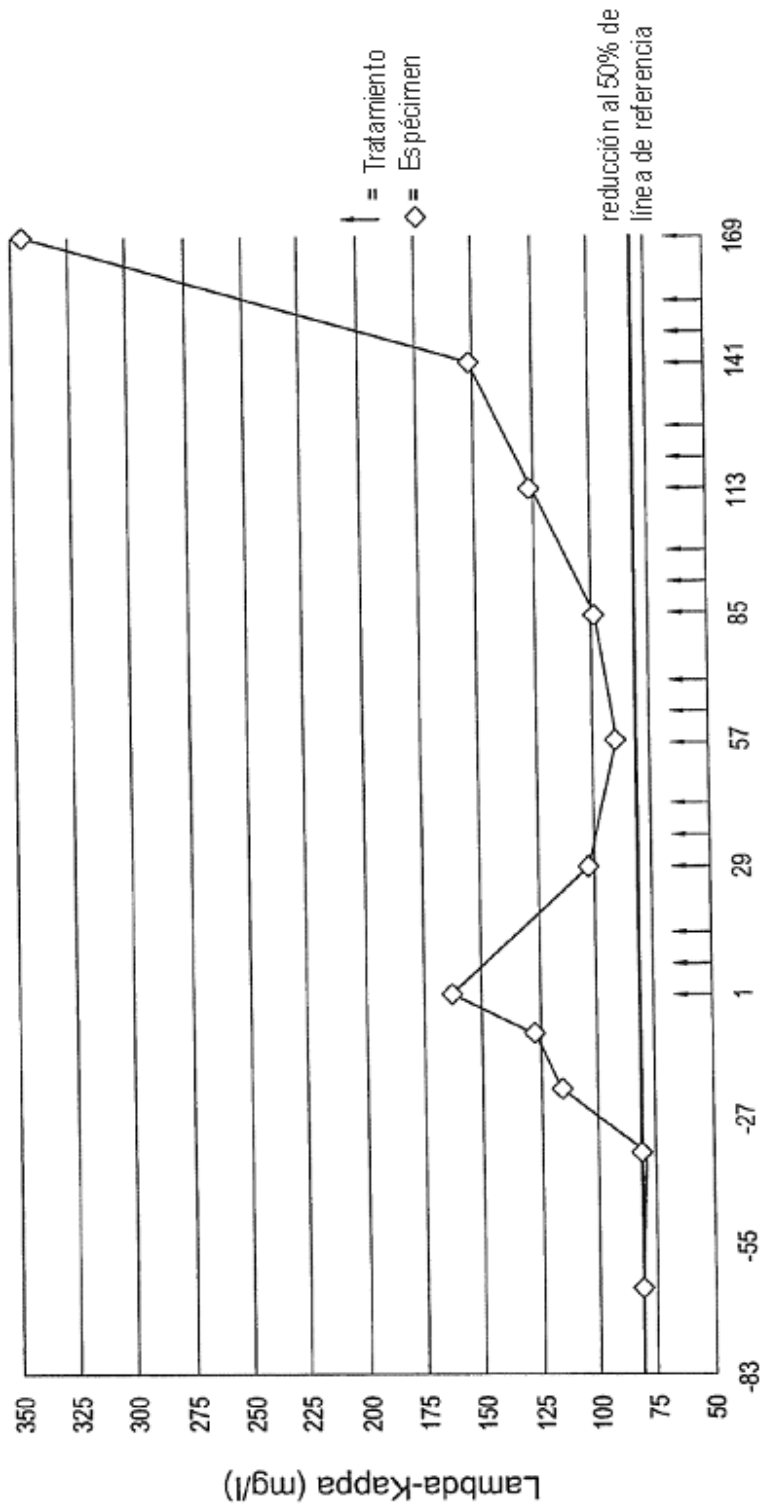


FIG. 21

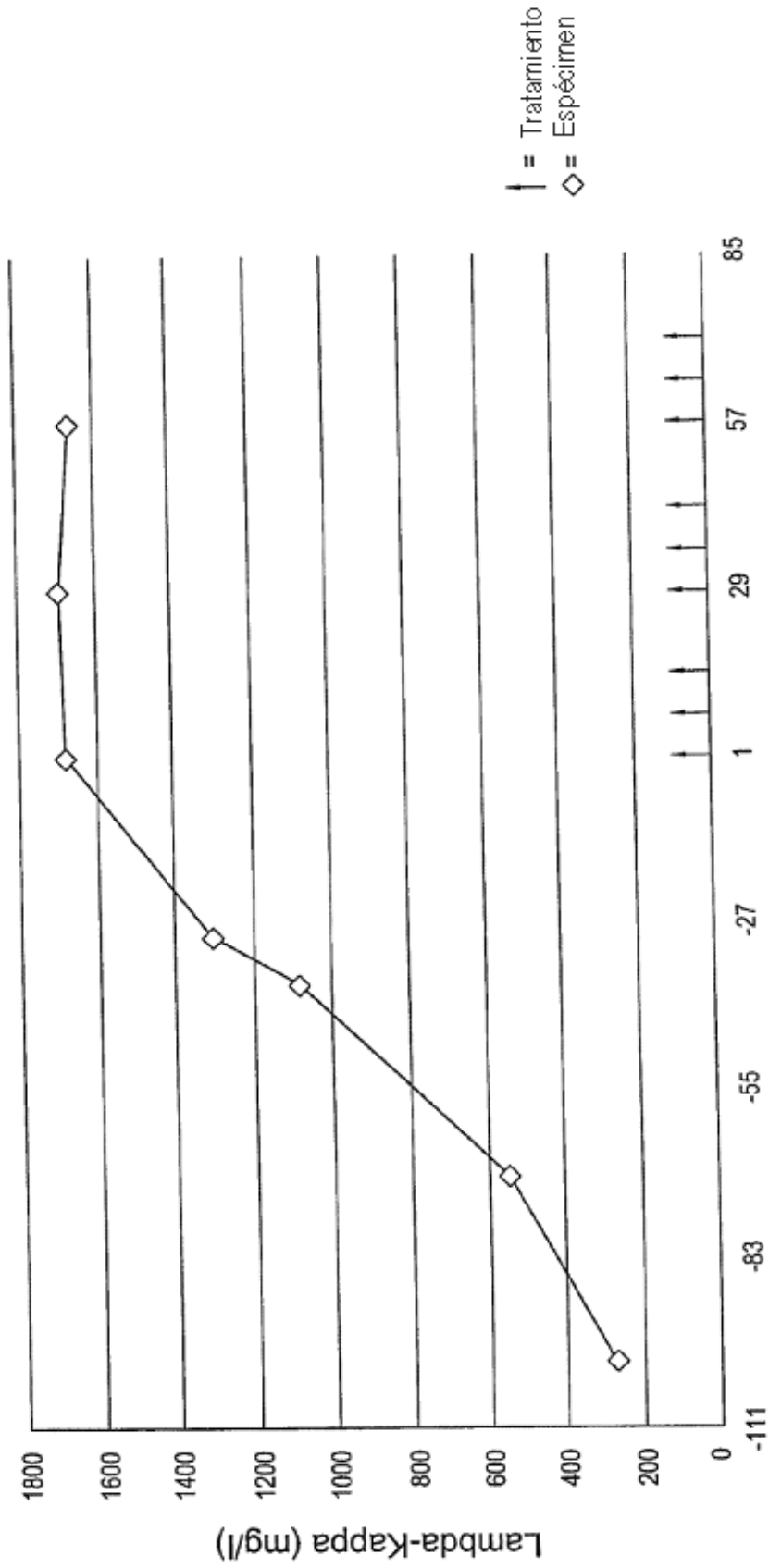


FIG. 22

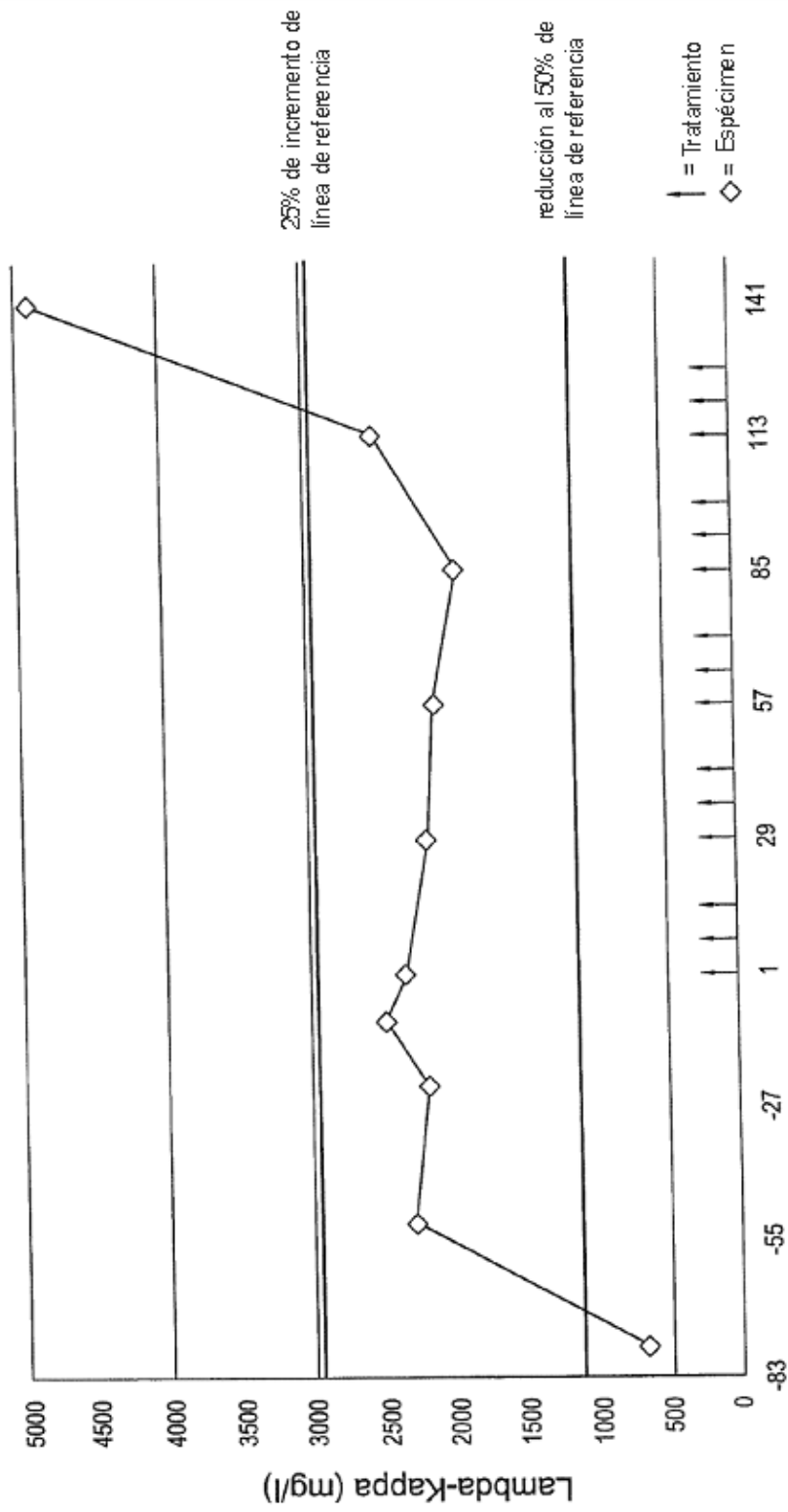


FIG. 23

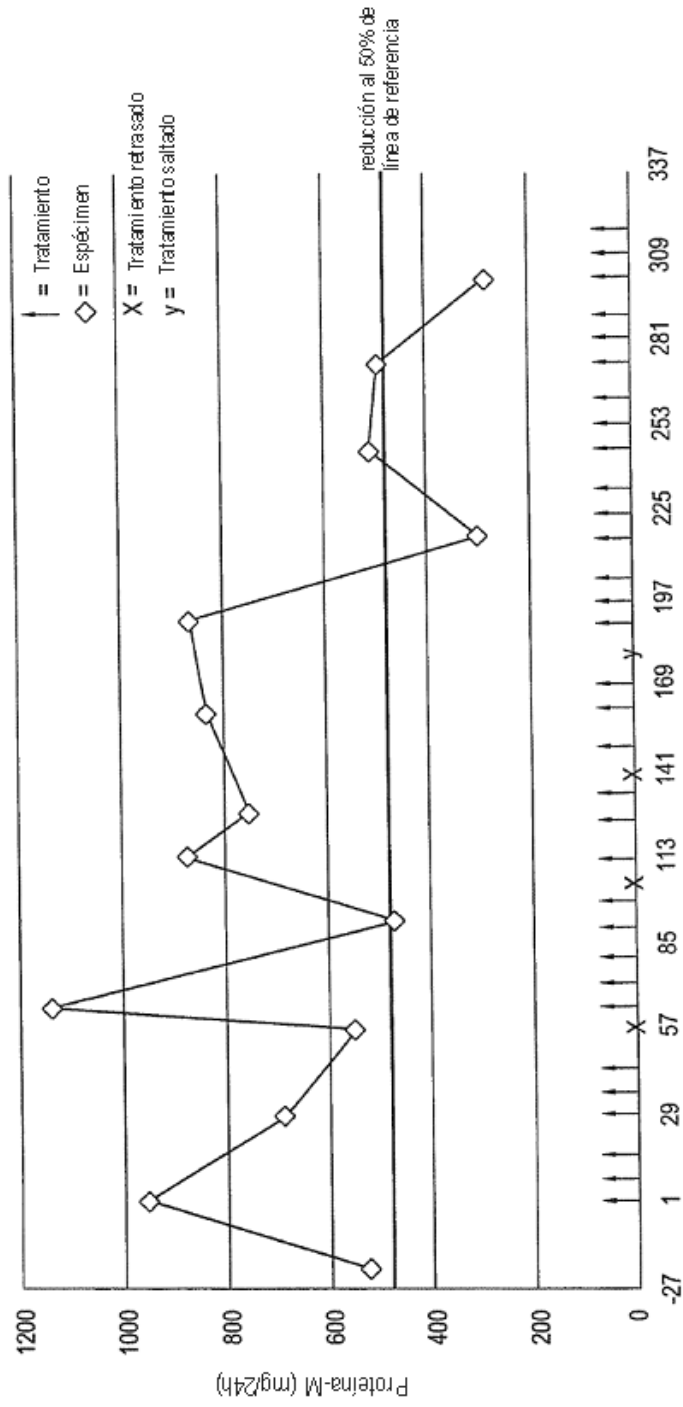


FIG. 24

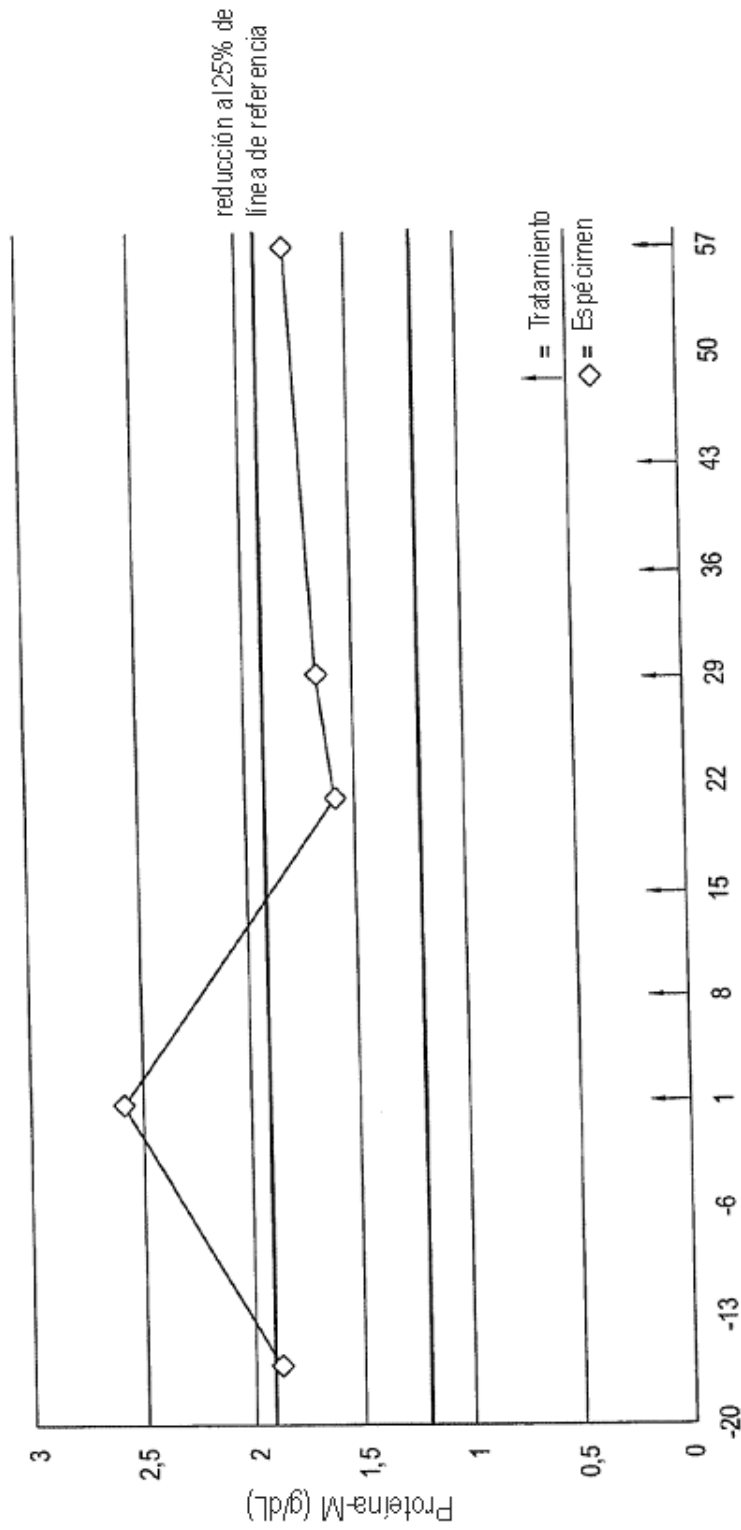


FIG. 25

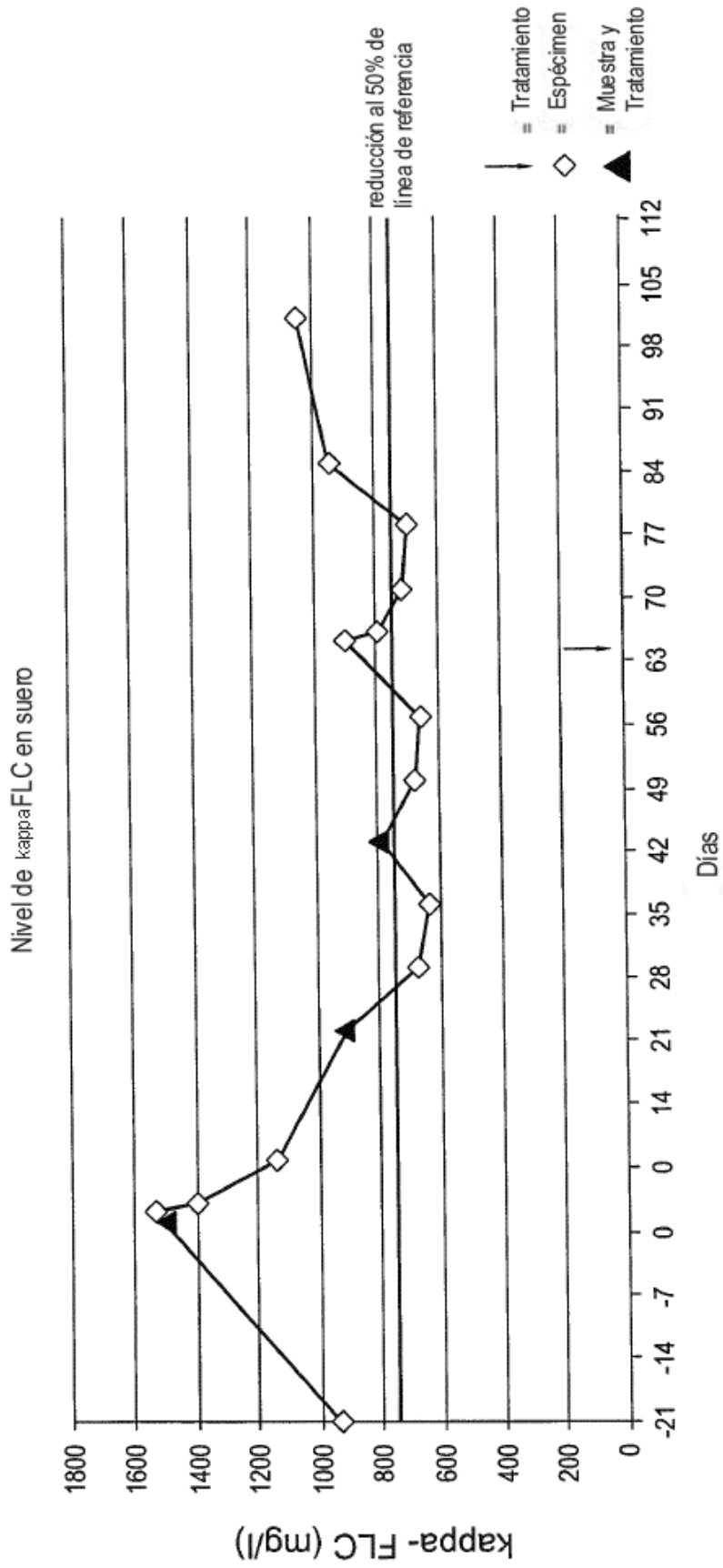


FIG. 26

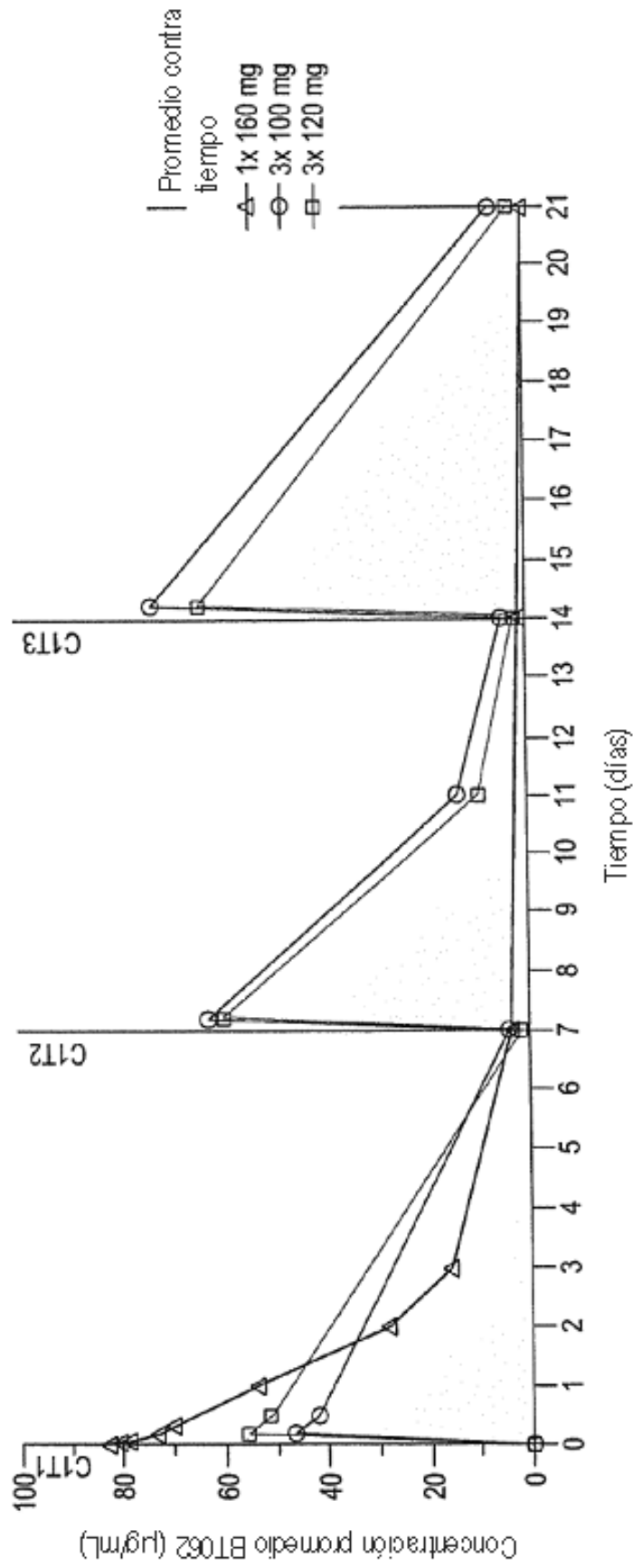


FIG. 27

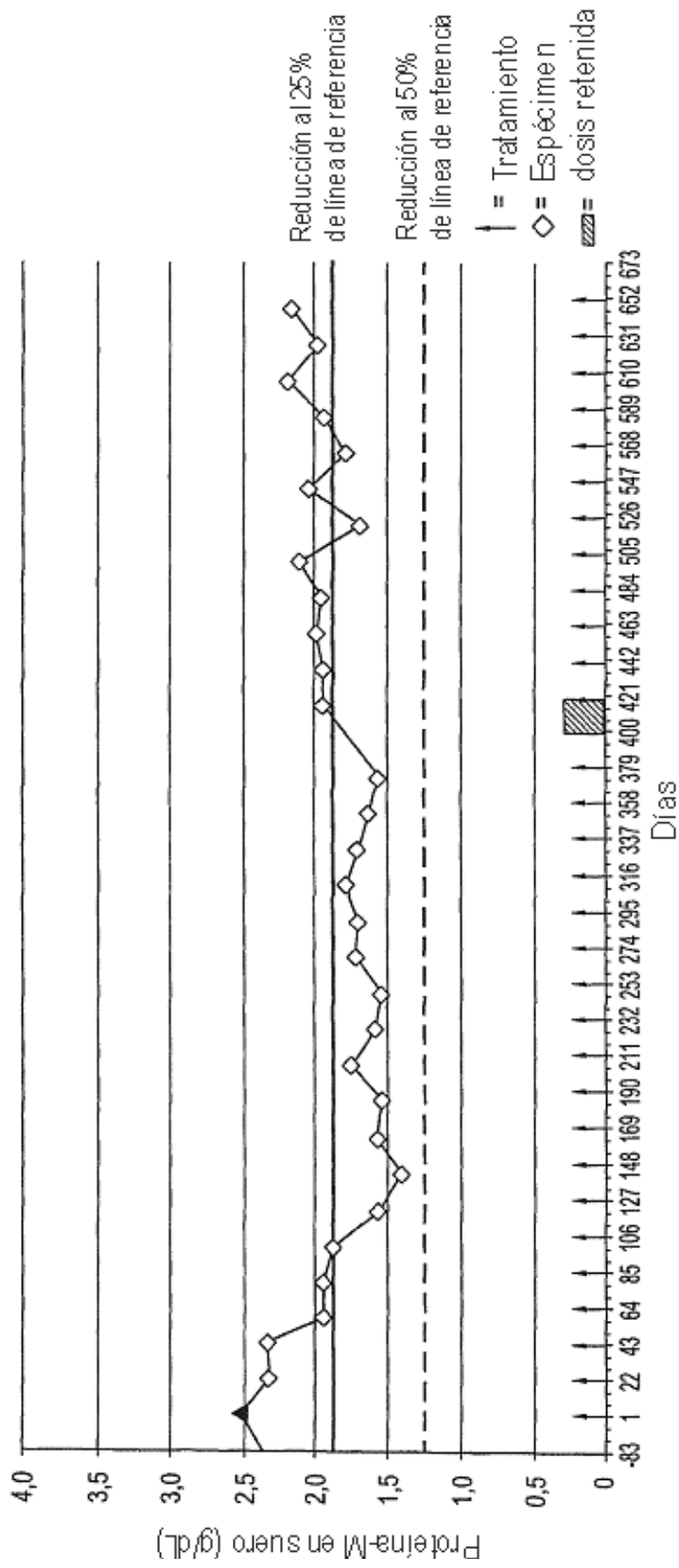


FIG. 28

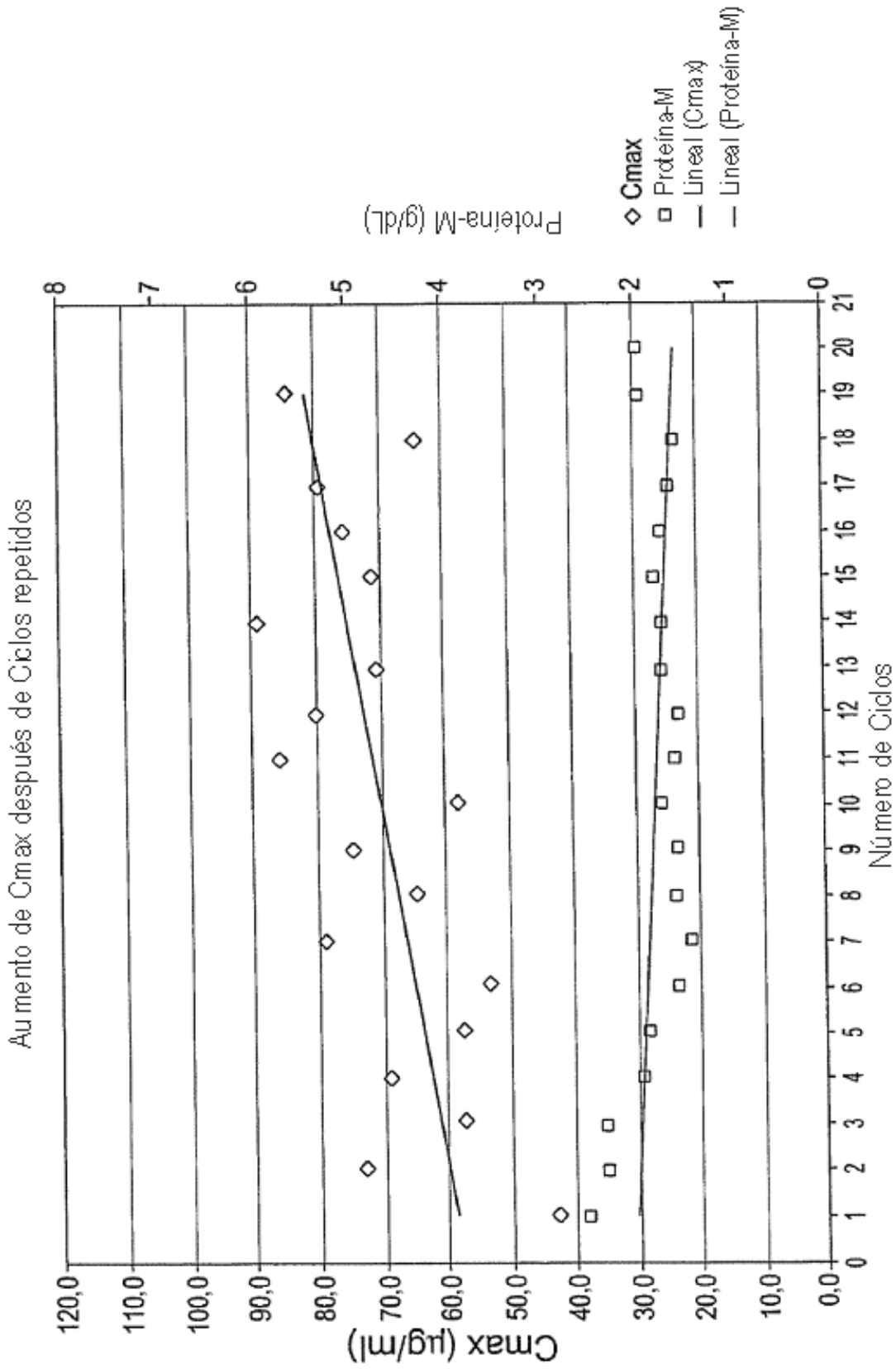


FIG. 29

Combinación de BT062 con lenalidomida en modelo de xenoinjerto en ratones MOLP-8

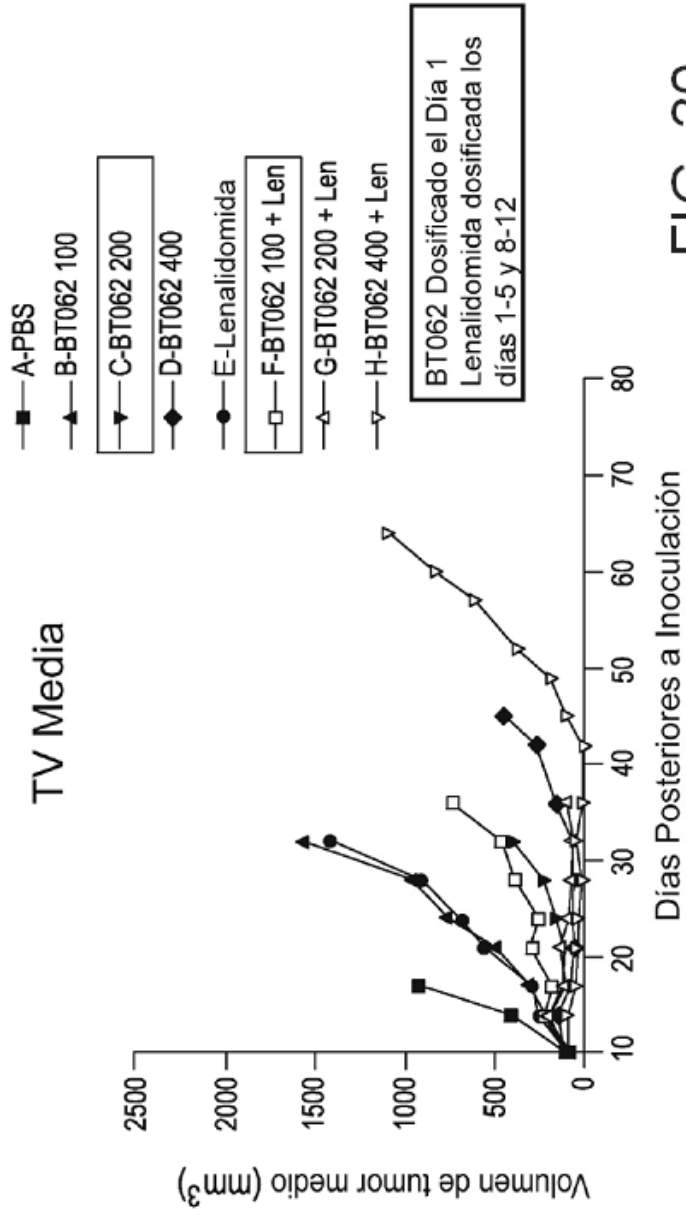


FIG. 30

Combinación de BT062 con VELCADE en modelo de xenoinjerto MOLP-8 MM en ratones

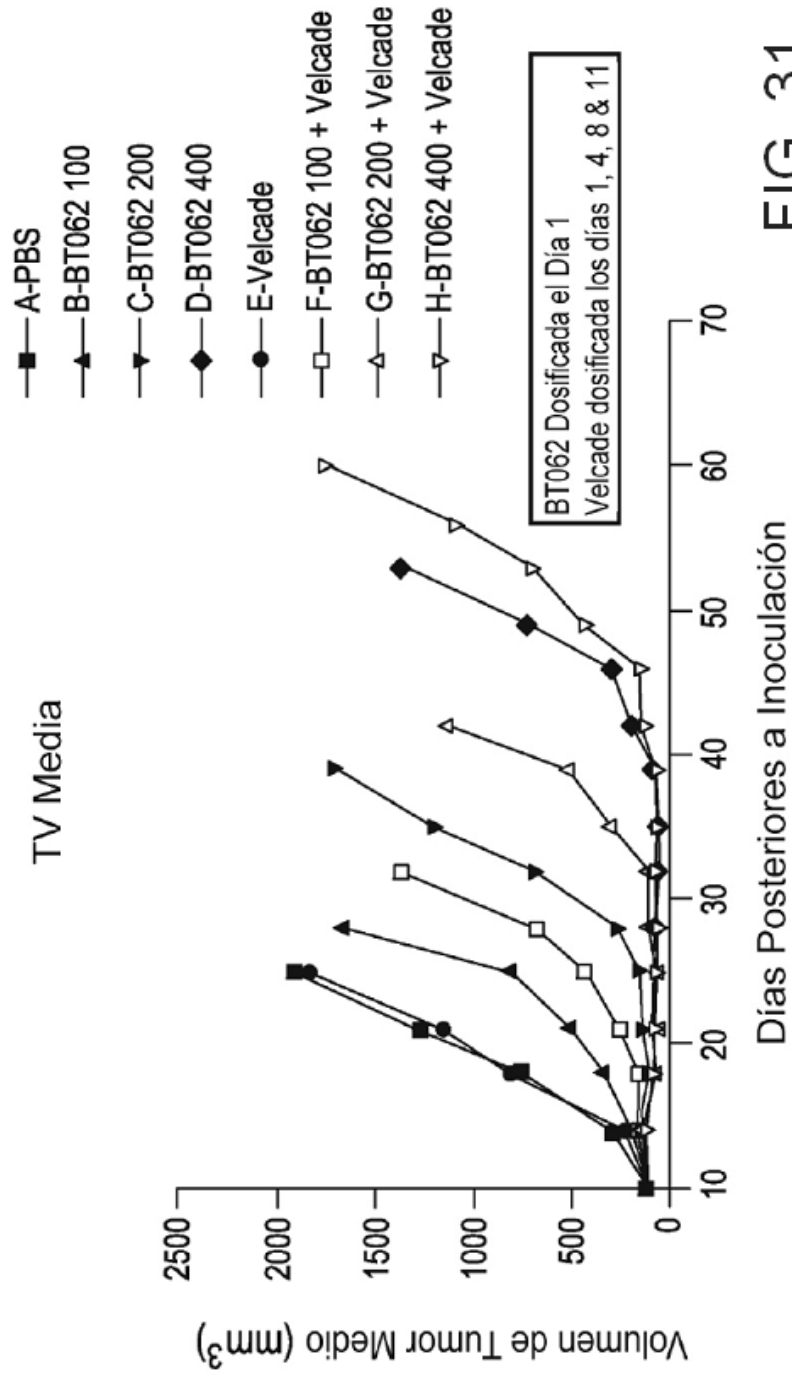


FIG. 31

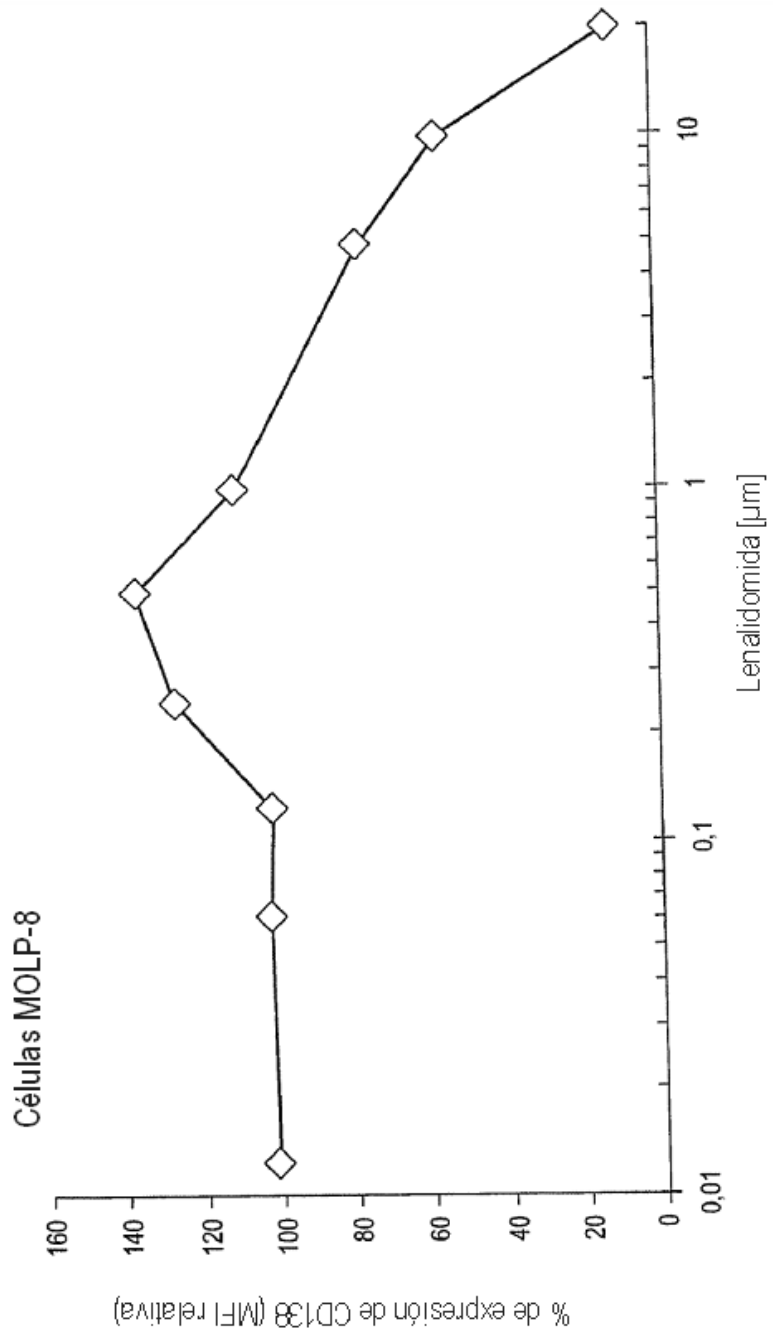


FIG. 32A

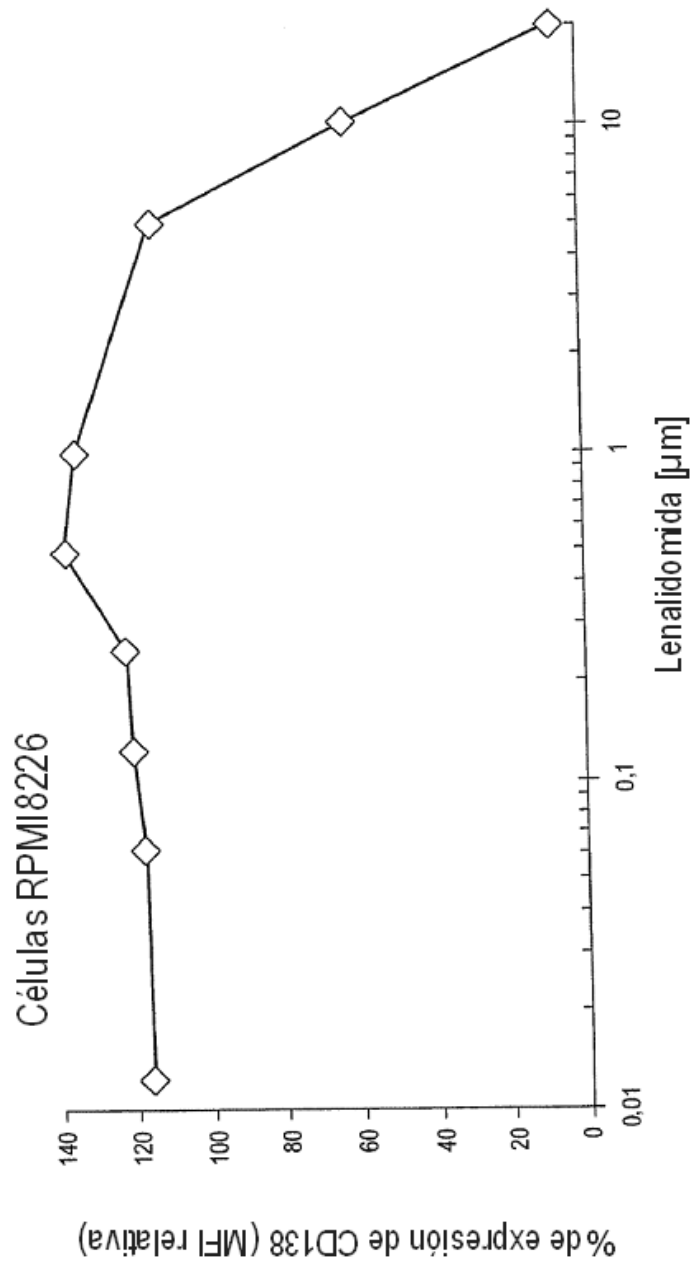


FIG. 32B

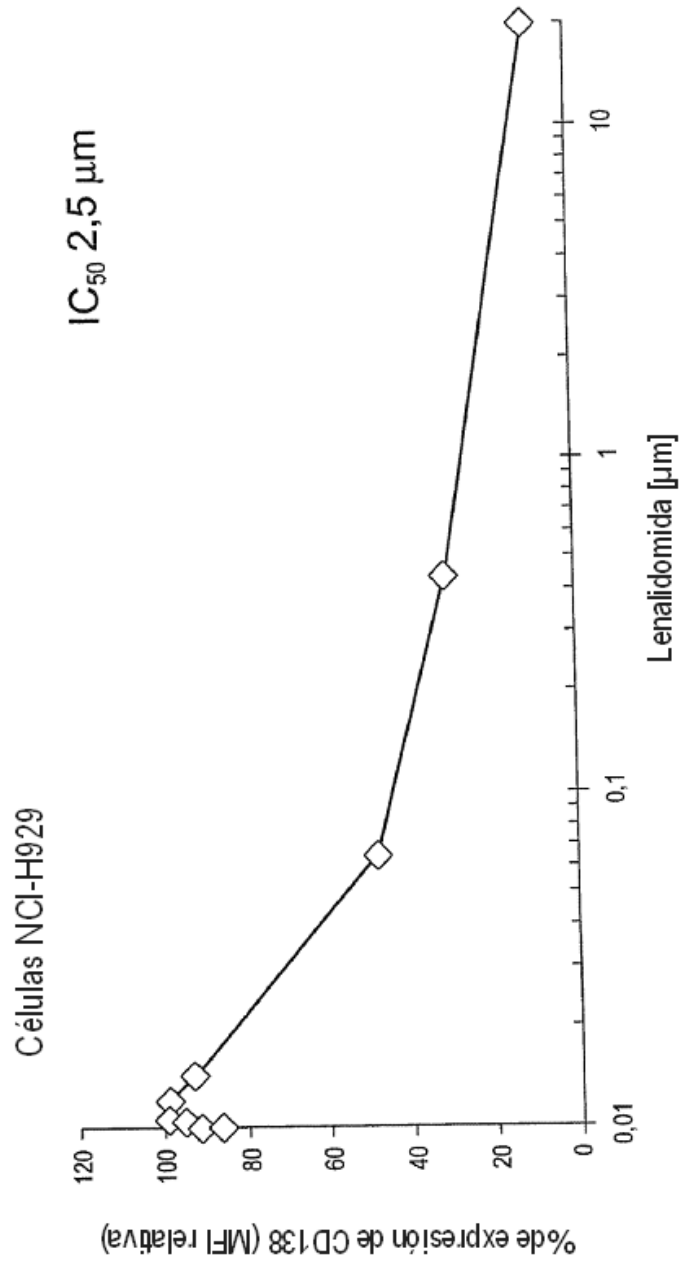


FIG. 32C

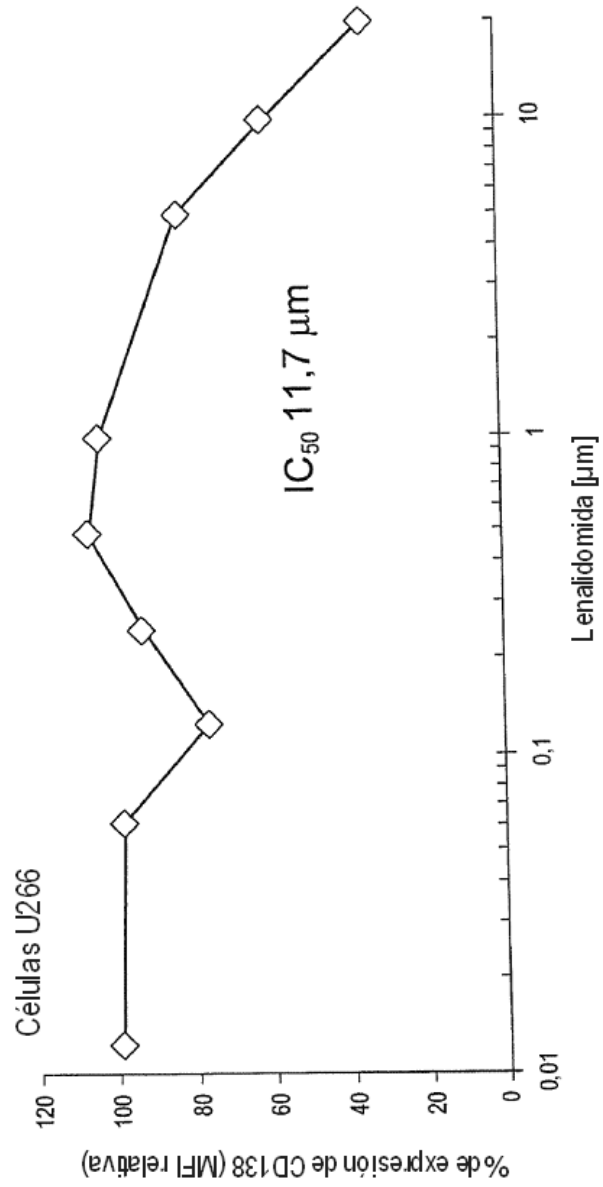
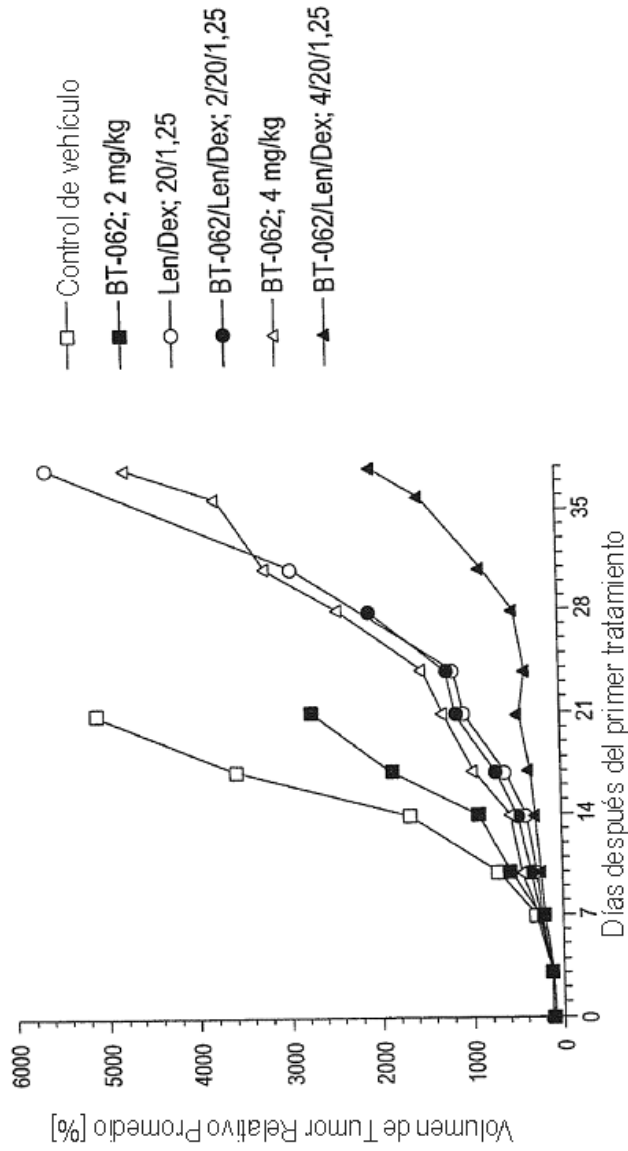


FIG. 32D



Programa de tratamiento:
BT-062 (i.v.) días 1, 8, 15, 22, 29
Len (p.o.) días:
0-4, 7-11, 14-18, 21-25, 28-32
Dex: (s.c.) días 0, 7, 14, 21, 28

FIG. 33

Respuesta menor a 3×80 mg/m²
 en combinación con Len/Dex

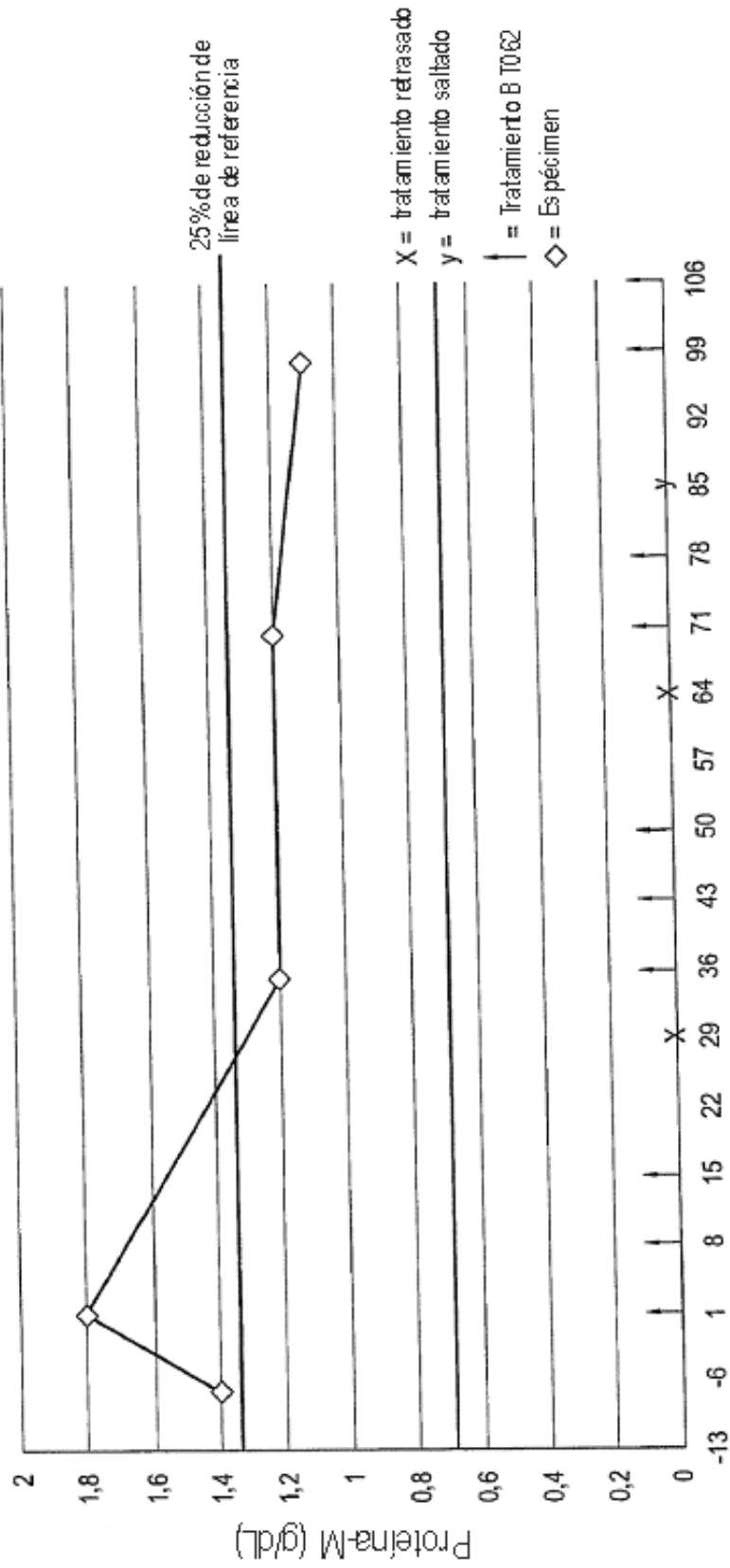


FIG. 34

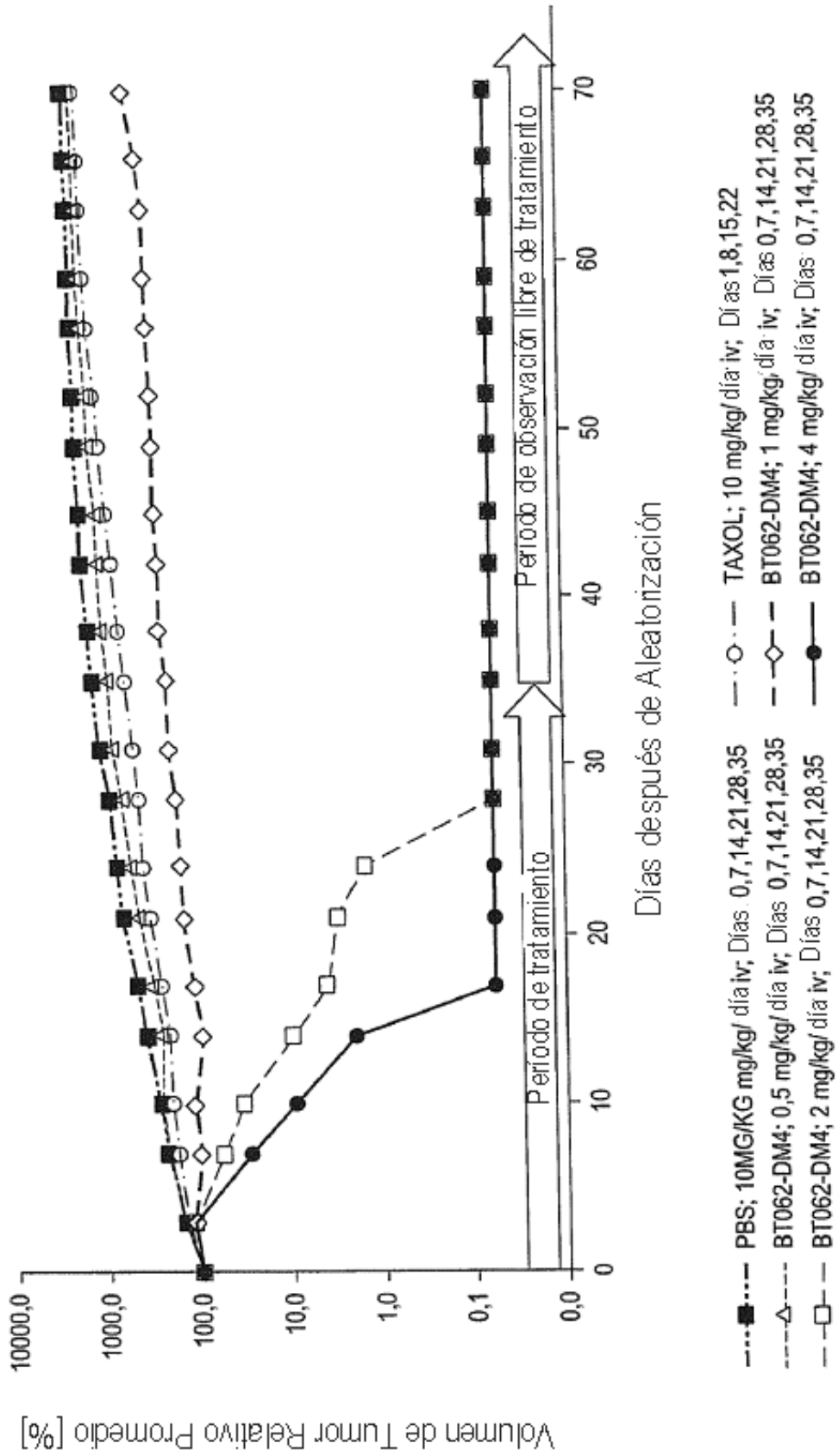


FIG. 35

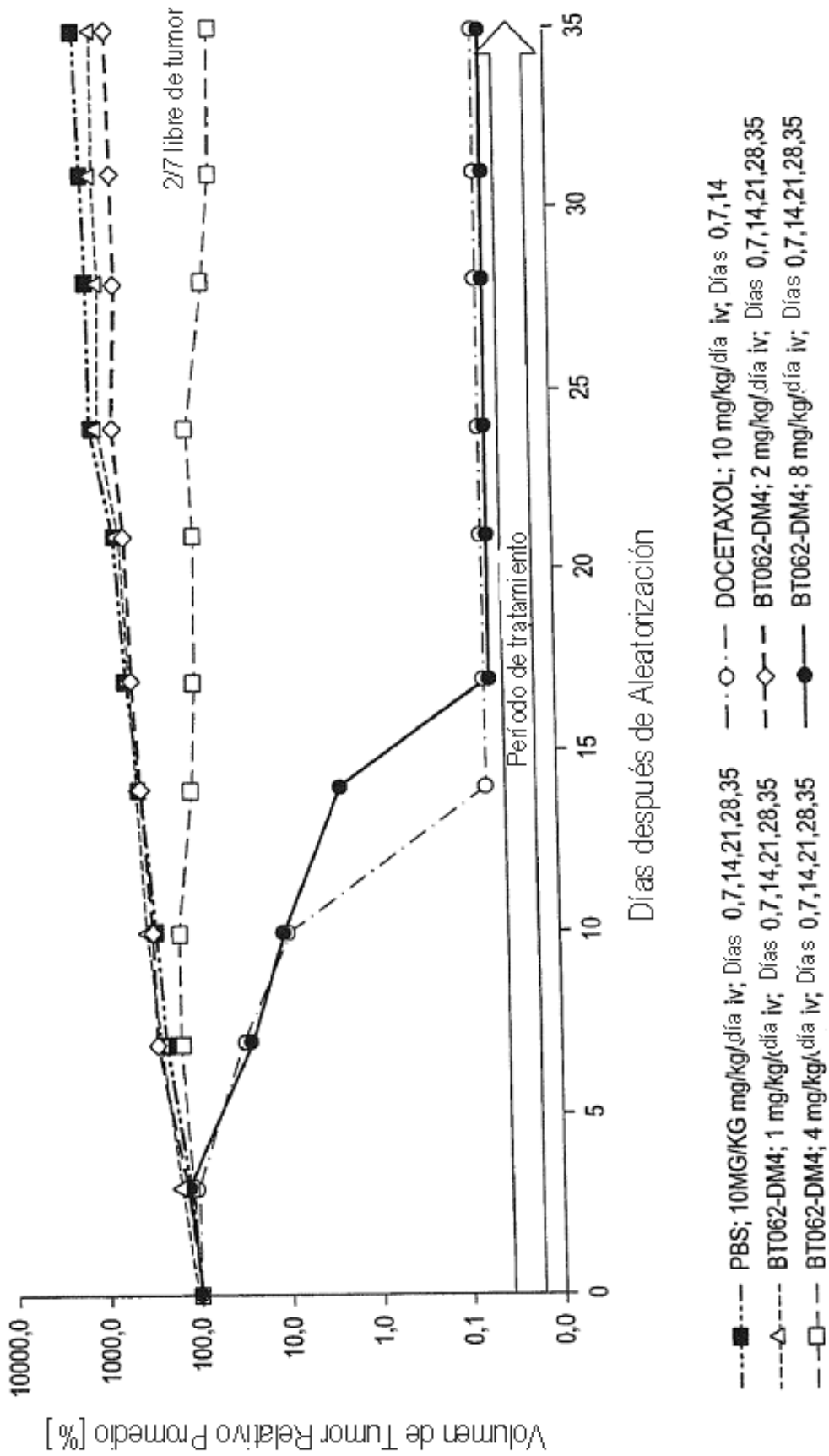


FIG. 36

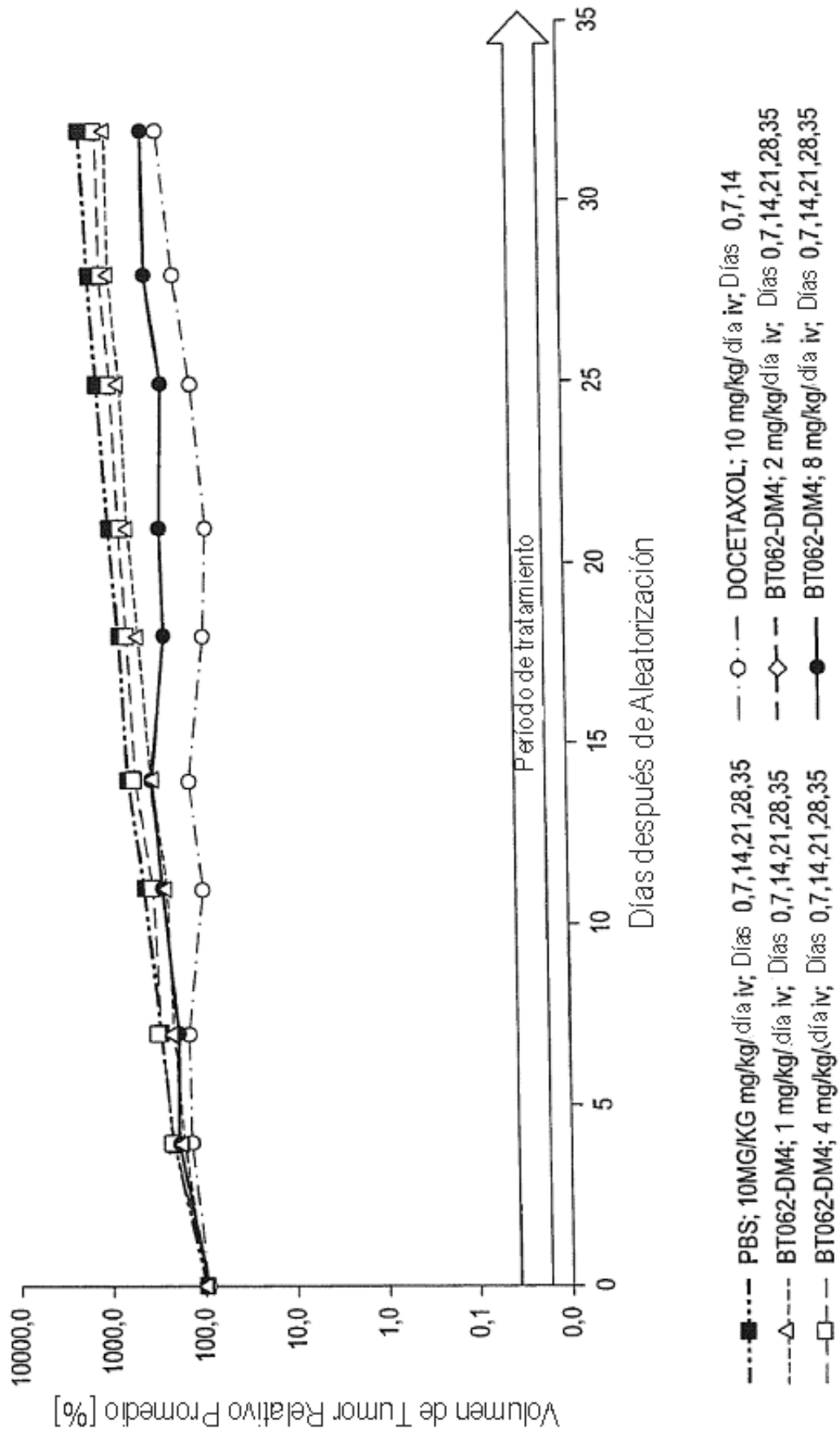


FIG. 37

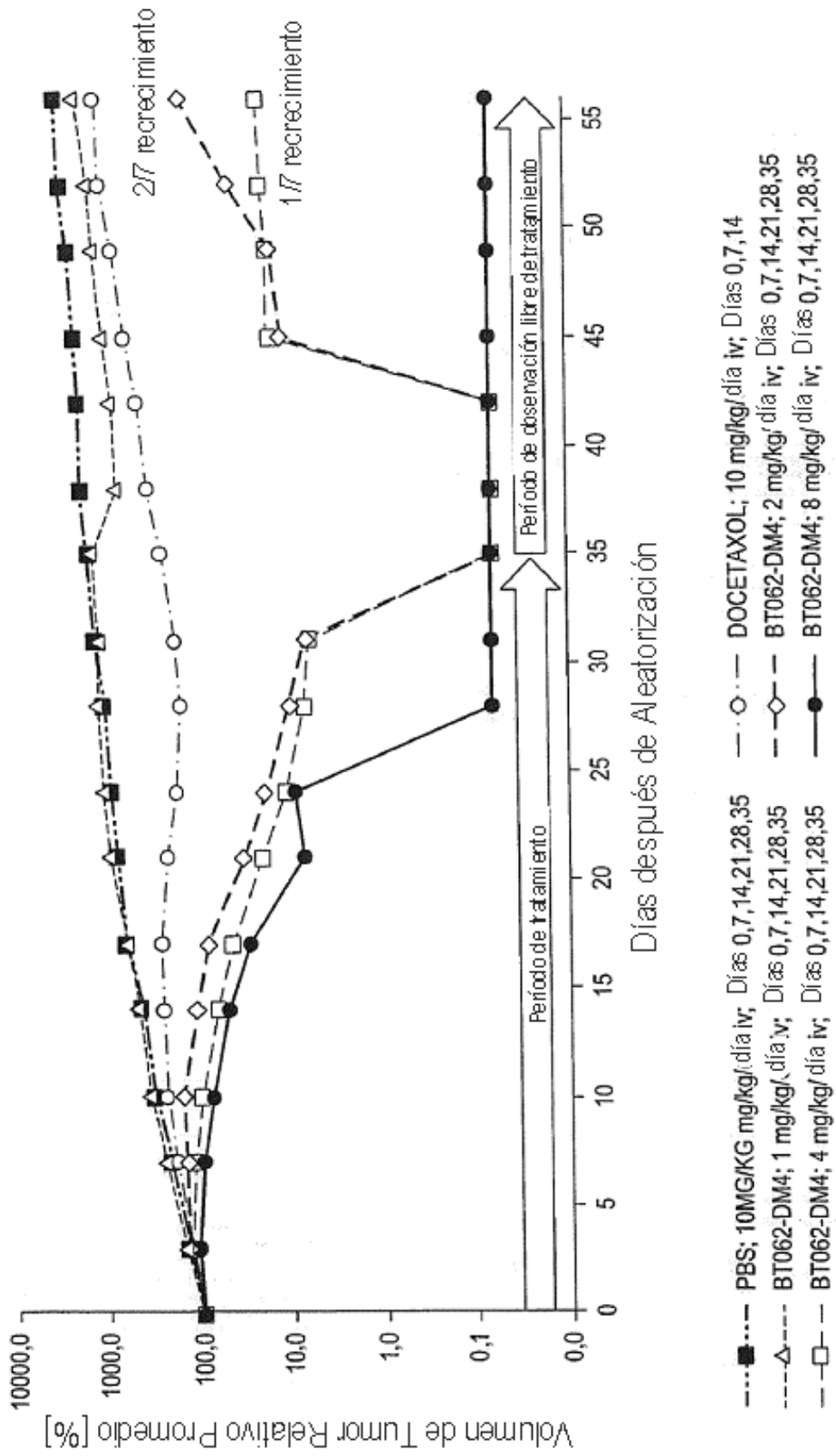


FIG. 38