

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 022**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2010 PCT/EP2010/056124**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2010 E 10718581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2427216**

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

30 Prioridad:

06.05.2009 US 176069 P

09.11.2009 US 259430 P

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

01.10.2019

73 Titular/es:

BIOTEST AG (50.0%)

Landsteinerstr. 5

63303 Dreieich , DE y

IMMUNOGEN, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

OSTERROTH, FRANK;

UHEREK, CHRISTOPH;

BRUECHER, CHRISTOPH;

DAELKEN, BENJAMIN;

ENGLING, ANDRÉ;

HAEDER, THOMAS;

WARTENBERG-DEMAND, ANDREA;

NIEMANN, GABRIELE;

ZUBER, CHANTAL;

CZELOTH, NIKLAS;

AIGNER, SILKE;

ZENG, STEFFEN y

SCHULZ, GREGOR

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 726 022 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 un inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138 como se define en las reivindicaciones.

10 **Antecedentes**

CD138, que actúa como un receptor para la matriz extracelular, se sobre-expresa en células de mieloma múltiple (MM) y se ha mostrado que influye en 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 de endometrio (Choi et al., 2007), carcinoma renal, 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 microcíticas (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, por sus siglas en inglés), carcinoma pancreático (Conejo et al., 2000) y de cabeza y cuello (Anttonen et al., 1999) por nombrar solo unos cuantos.

Las publicaciones y otros materiales, incluyendo patentes, se usan en el presente documento para ilustrar la invención y, en particular, para proporcionar detalles adicionales respecto a la práctica. 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 anexa.

Tassone et al. (2004) informó una 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. N.º 20070183971 A1, que desvela inmunoconjugados dirigidos a células que expresan sindecan-1 y el uso de los mismos).

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.

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

Permanece en particular una necesidad de proporcionar regímenes de tratamiento adecuadas para enfermedades asociadas a la expresión de CD138, incluyendo trastornos plasma-proliferativos asociados a la expresión de CD138, tales como MM. Más en particular permanece una necesidad de regímenes de tratamiento que aseguren que las toxicidades hacia células no tumorales, que también expresan CD138, se mantengan a un nivel clínicamente aceptable, ya sea al emplear solo ciertas cantidades tolerables de inmunoconjugado y/o por combinar el inmunoconjugado con agentes citotóxicos conocidos por ser eficaces contra el trastorno en cuestión. También hay una necesidad de regímenes de tratamiento que reduzcan la necesidad de medicamentos que se usan para aliviar otros síntomas de la enfermedad.

Esta invención cumple, en ciertas realizaciones, una o más de estas necesidades así como otras necesidades en la técnica que serán más evidentes para la persona con destreza en la materia una vez dada la siguiente divulgación.

Sumario de la invención

La invención proporciona un inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, comprendiendo el inmunoconjugado:

al menos un anticuerpo dirigido que marca como diana células que expresan CD138, y
al menos una molécula efectora,

en donde dicho anticuerpo dirigido se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoconjugado,

en donde el anticuerpo dirigido comprende una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31-35, 51-68 y 99-111 de SEQ ID NO: 1, en donde al menos una parte del anticuerpo dirigido confiere propiedades del isotipo IgG4, en donde dicha al menos una molécula efectora es al menos un

maitansinoide,
 en donde dicha enfermedad es mieloma múltiple de relapso o refractario.

5 Adicionalmente, la presente descripción proporciona el uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

(i) al menos un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y

10 (ii) al menos una molécula efectora,

en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el inmunoconjugado va a administrarse en una cantidad eficaz y en donde la cantidad eficaz es una cantidad tolerable y en donde el inmunoconjugado y la enfermedad a tratar es como se define en las reivindicaciones.

15 El inmunoconjugado se administra preferentemente al sujeto en una cantidad de 5 mg/m² a 200 mg/m² o un equivalente farmacocinético del mismo.

20 También se describe en el presente documento una preparación combinada de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

(i) al menos un agente dirigido que marca como diana 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 el inmunoconjugado va a administrarse en una cantidad que es un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 200 mg/m² del inmunoconjugado cuando se administra solo.

30 Adicionalmente, la presente descripción proporciona el uso de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos para la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

(i) al menos un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y

(ii) al menos una molécula efectora,

35 en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado y en donde el inmunoconjugado va a administrarse en una cantidad que es un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 200 mg/m² del inmunoconjugado cuando se administra solo.

En particular, el inmunoconjugado puede administrarse al sujeto en una cantidad de 5 mg/m² o 10 mg/m² a menos que 160 mg/m², preferentemente a 150 mg/m², 140 mg/m², 130 mg/m² o 120 mg/m².

45 La concentración máxima del inmunoconjugado en el plasma del sujeto entre 0 a 2 horas después del fin de una primera administración, puede ser menor que el 50 %, preferentemente menor que el 40 %, más preferentemente menor que el 30 %, aún más preferentemente menor que el 20 %, o incluso menos que el 10 % de una concentración máxima teórica para dicho inmunoconjugado.

50 El inmunoconjugado puede administrarse al menos cuatro veces y una concentración máxima del inmunoconjugado en el plasma del sujeto entre 0 a 2 horas después del fin de cada una de las administraciones puede ser menos que el 55 %, preferentemente menos que el 50 %, más preferentemente menos que el 40 %, aún más preferentemente menos que el 30 %, menos que el 20 % o incluso menos que el 10 % de la concentración máxima teórica para dicho inmunoconjugado.

55 Dicha concentración máxima puede ser menos que 3 µg/ml para 10 mg/m²; menos que 8 µg/ml para 20 mg/m², menos que 15 µg/ml para 40 mg/m², menos que 25 µg/ml para 80 mg/m², menos que 30 µg/ml para 120 mg/m².

60 La concentración máxima del inmunoconjugado después de una cuarta aplicación en el plasma del sujeto entre 0 a 2 horas después de un fin de una primera administración puede ser menor que el 55 %, preferentemente menor que el 50 %, más preferentemente menor que el 40 %, aún más preferentemente menos que el 30 %, menos que el 20 % o incluso menos que el 10 % de la concentración máxima teórica para dicho inmunoconjugado.

65 Dicha concentración máxima puede ser menos que 14 µg/ml para 20 mg/m², menos que 15 µg/ml para 40 mg/m² o menos que 25 µg/ml para 80 mg/m². El inmunoconjugado puede administrarse en forma intravenosa. El inmunoconjugado puede administrarse en forma intravenosa en una única dosis repetida y la concentración máxima

del inmunoconjugado en el plasma del sujeto entre 0 a 2 horas después del fin de cualquiera administración puede ser menos que el 55 %, menos que el 50 % o menos que el 40 % de la concentración máxima teórica para dicho inmunoconjugado. Una enfermedad estable puede mantenerse durante al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ciclos de tratamiento (durante al menos 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 semanas). Un estado de al menos enfermedad estable puede mantenerse durante 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ciclos de tratamiento a 20 mg/m² y opcionalmente, la concentración máxima del inmunoconjugado en el plasma del sujeto 0 a 2 horas después de un fin de cualquier administración puede ser menos que el 55 %, menos que el 50 % o menos que el 40 % de la concentración máxima teórica para el inmunoconjugado. En ciertos casos, una respuesta menor puede observarse después de hasta 8 ciclos de tratamiento.

El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser para la administración:

en una dosis, preferentemente una dosis única repetida, de no más que aproximadamente 10, 20, 30, 40, 80, 90, 100 o 120 mg/m²,

una dosis diaria promedio de aproximadamente 400 µg/m² a aproximadamente 6 mg/m², incluyendo aproximadamente 500 µg/m², aproximadamente 1 mg/m², aproximadamente 2 mg/m², aproximadamente 3 mg/m², aproximadamente 4 mg/m² y/o

una dosis semanal promedio de aproximadamente 3 mg/m² a aproximadamente 40 mg/m², incluyendo aproximadamente 5 mg/m², aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 15 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 25 mg/m², aproximadamente 30 mg/m² o aproximadamente 35 mg/m².

El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la presente invención puede permitir el mantenimiento de la enfermedad estable durante aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200, 210 o más días y/o durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de tratamiento cada uno de aproximadamente tres semanas.

Además, el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser para la administración a un sujeto en una cantidad eficaz en donde dicho CD138 se expresa, en dicho sujeto, en dichas células diana y en células no diana, en donde dicha administración da como resultado la depuración del plasma moderada o lenta y en donde dichas células no diana, en particularmente las células epiteliales, no se afectan sustancialmente.

La cantidad eficaz que se administra puede ser menos que 200 mg/m² o menos que un equivalente farmacocinético de 200 mg/m² cuando se administra en combinación con un agente para tratar efectos secundarios adversos y en donde dicha administración puede resultar en una respuesta en dicho sujeto, preferentemente después de menos de 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5 horas.

Dicha cantidad eficaz puede ser más que 120 mg/m².

Dichos niveles de expresión de CD138 en células diana y no diana (por ejemplo, células del epitelio) pueden ser comparables.

Dicha cantidad eficaz puede administrarse como, por ejemplo una dosis única o una dosis única repetida o en múltiples dosis.

Dicha cantidad eficaz puede administrarse en múltiples dosis, en donde el valor C_{max} después de cada administración es más que el 55 % del valor C_{max} teórico.

La enfermedad puede asociarse a dolores de huesos y/o complicaciones de huesos y dicha administración de dicho inmunoconjugado o una combinación anticáncer puede reducir los dolores de huesos y/o complicaciones de huesos, preferentemente a un nivel aceptable. La administración de medicación para aliviar los dolores de huesos y/o complicaciones de huesos puede cesarse o reducirse desde un nivel base comúnmente administrado en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. El nivel base es el nivel que generalmente se recomienda para los síntomas a tratar y puede evaluarse de instrucciones de uso que acompañan el medicamento o que se conoce por la persona con destreza en la materia de administración de medicamentos para el dolor.

Por ejemplo, bisfosfonato, por ejemplo pamidronato, que típicamente se administra a 90 mg cada cuatro semanas o ácido zoledrónico, que típicamente se administra a una dosis de 4 mg una vez al mes (Terpos et al., 2009) puede reducirse en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % (o a intervalos de tiempo más grandes que corresponden a esta reducción) o pueden eliminarse.

Dicha administración también puede resultar en niveles de proteína M o FLC de al menos, enfermedad estable, una respuesta menor o una respuesta parcial en dicho sujeto, preferentemente después de una primera administración.

Dicho inmunoconjugado puede comprender una región de unión a antígeno (ABR, por sus siglas en inglés) contra CD138 y una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de la región de anticuerpo adicional puede ser de un anticuerpo humano y puede conferir dichas propiedades del isotipo IgG4.

Dicho inmunocombinado puede comprender nBT062 o un anticuerpo dirigido que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con nBT062 o puede corresponder a BT062.

El sujeto puede ser un sujeto humano.

5 El inmunocombinado para su uso de acuerdo con la presente invención puede estar comprendido en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde un principio activo de la composición puede consistir esencialmente en dicho inmunocombinado.

10 El inmunocombinado para su uso de acuerdo con la presente invención puede resultar en una enfermedad estable, una respuesta, en particular una respuesta menor, una respuesta parcial, una respuesta parcial muy buena, una respuesta completa rigurosa o una respuesta completa durable durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ciclos de tratamiento o más en donde los ciclos de tratamiento cada uno comprende aproximadamente 3 semanas con una administración del inmunocombinado el día 1 de dicho ciclo de tratamiento.

15 El inmunocombinado para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser para su uso en donde

20 (i) el mieloma múltiple en un sujeto se identifica como que no responde o responde deficientemente a tratamiento con uno o más agentes citotóxicos, inmunomoduladores tales como lenalidomida y/o inhibidores del proteasoma tales como bortezomib, y
(ii) el inmunocombinado es para la administración, preferentemente en forma intravenosa, a dicho sujeto en una cantidad eficaz del inmunocombinado como se especifica

25 en el presente documento a una dosis de menos de 200 mg/m² cuando dicho inmunocombinado va a administrarse solo o en donde dicha cantidad eficaz es el equivalente farmacocinético de 200 mg/m² cuando se administra con un agente para tratar efectos secundarios, incluyendo efectos secundarios potenciales, en donde el sujeto no responde, o responde deficientemente, al tratamiento con uno o más agentes citotóxicos, inmunomoduladores tales como lenalidomida y/o inhibidores del proteasoma tales como bortezomib y en donde dicha enfermedad se trata.

30 Aún además el inmunocombinado para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser para la administración a un sujeto que requiere este tratamiento y que exhibe altos niveles de sCD138, tales como más que 50 ng/ml, más que 60 ng/ml, más que 70 ng/ml, más que 80 ng/ml, más que 100 ng/ml, más que 150 ng/ml, más que 200 ng/ml, más que 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 ng/ml, en una cantidad eficaz de un inmunocombinado como se especifica en el presente documento, en donde una cantidad tan baja como 20 mg/m² o tan baja como 40 mg/m² es eficaz para resultar en una respuesta tal como una respuesta menor. Dicha respuesta puede resultar de la unión selectiva del inmunocombinado. El sujeto puede no responder o responder deficientemente, al tratamiento con agentes citotóxicos, inmunomoduladores tales como lenalidomida y/o inhibidores del proteasoma tales como bortezomib.

40 El anticuerpo dirigido de ingeniería 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 dichas propiedades de isotipo IgG4. De acuerdo con la invención el anticuerpo dirigido comprende una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31-35, 51-68 y 99-111 de SEQ ID NO: 1, en donde al menos una parte del anticuerpo dirigido confiere propiedades del isotipo IgG4.

La enfermedad a tratar es mieloma múltiple de relapso o refractario.

50 Preferentemente el inmunocombinado marca como diana homogéneamente las células diana que expresan CD138.

El anticuerpo dirigido de ingeniería puede

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

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

60 La ABR puede comprender:

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

La ABR puede comprender además:

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

La región de aminoácidos adicional puede comprender:

- 10 (a) los restos de aminoácidos 123 a 448 de SEQ ID NO: 1 y/o
(b) los restos de aminoácidos 108 a 214 de SEQ ID NO: 2, respectivamente y las mutaciones de los mismos que
15 (i) mantienen o disminuyen 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.

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

25 La molécula efectora puede fijarse a dicho anticuerpo dirigido de ingeniería a través de 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. De acuerdo con la invención la al menos una molécula efectora es al menos un maitansinoide (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4).

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

30 El inmunoconjugado puede comprender:

- un agente dirigido que marca como diana 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 dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene al menos
35 un 70 % identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. Una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o dicha parte de la misma puede ser una región constante del isotipo IgG4.

40 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 un 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

45 La presente descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados especificados en el presente documento para la inhibición, el retardo y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la diseminación de células de tumor y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

50 La presente descripción también proporciona un kit que comprende, en recipientes separados, dicha composición farmacéutica en una o más formas de dosificación y, en un recipiente separado, instrucciones de cómo administrar la una o más formas de dosificación 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.

55 En particular, en un aspecto de la invención la administración de cualquiera de los inmunoconjugados desvelados en el presente documento es para un sujeto o células de un sujeto tal, en particular un sujeto humano, que se beneficia de dicha administración. El inmunoconjugado también puede usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno tal.

60 Se describe en el presente documento un inmunoconjugado para tratar una enfermedad en un sujeto asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- 65 (i) al menos un agente dirigido que marca como diana 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 inmunoconjugado, en donde

el sujeto no responde, o responde deficientemente, al tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores del proteasoma, y en donde el inmunoconjugado va a administrarse al sujeto, preferentemente en forma intravenosa, en una cantidad de 5 mg/m² a 200 mg/m².

5 Adicionalmente, la descripción proporciona el uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- 10 (i) al menos un agente dirigido que marca como diana 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 inmunoconjugado, en donde el sujeto no responde, o responde deficientemente, al tratamiento con uno o más agentes citotóxicos que incluyen inmunomoduladores y/o inhibidores del proteasoma, y en donde el inmunoconjugado va a administrarse al sujeto, preferentemente en forma intravenosa, en una cantidad de 5 mg/m² a 200 mg/m².

15
20 También se describe en el presente documento una preparación combinada de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos, para su uso simultáneo, separado o secuencial para tratar una enfermedad en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- (i) al menos un agente dirigido que marca como diana 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, en donde el sujeto no responde o responde deficientemente, a tratamiento con uno o más agentes citotóxicos que incluyen inmunomoduladores y/o inhibidores del proteasoma, y en donde el inmunoconjugado va a administrarse al sujeto, preferentemente en forma intravenosa, en un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 200 mg/m² del inmunoconjugado cuando se administra solo.

30 Además, la presente invención proporciona el uso de un inmunoconjugado y un agente para tratar efectos secundarios adversos para la fabricación de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial para tratar una enfermedad en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

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

40 en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el sujeto no responde, o responde deficientemente, a tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores del proteasoma, y en donde el inmunoconjugado va a administrarse al sujeto, preferentemente en forma intravenosa, en un equivalente farmacocinético de 5 mg/m² a 200 mg/m² del inmunoconjugado cuando se administra solo.

45 Se describe aun además un inmunoconjugado para tratar una enfermedad en un paciente asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

- 50 (i) al menos un agente dirigido que marca como diana 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 inmunoconjugado, en donde el paciente exhibe niveles de sCD138 en su plasma de más que 50 ng/ml, y en donde el inmunoconjugado preferentemente va a administrarse en una cantidad eficaz para proporcionar al menos una respuesta menor.

55 La presente descripción también proporciona el uso de un inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoconjugado comprende:

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

65 en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a la molécula efectora para formar el inmunoconjugado, en donde el paciente exhibe niveles de sCD138 en su plasma, mayores a 50 ng/ml y en donde el inmunoconjugado preferentemente va a administrarse en una cantidad eficaz para proporcionar al menos una respuesta menor.

Preferentemente el inmunoc conjugado va a administrarse en una cantidad de al menos 20 mg/m² y más preferentemente al menos 40 mg/m².

5 Preferentemente los niveles de sCD138 que exhibe el paciente en el plasma es mayor a 60 ng/ml, más que 70 ng/ml, más que 80 ng/ml, más que 100 ng/ml, más que 150 ng/ml, más que 200 ng/ml, o más que 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 ng/ml.

También se describe una combinación anticáncer que comprende

10 al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoc conjugado que comprende un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138, y al menos una molécula efectora, en donde dicho agente dirigido se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado, en donde

15 (a) la combinación tiene una relación de sinergia mayor a 1, mayor a 1,1, mayor a 1,2, mayor a 1,3, mayor a 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 de interferencia,

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

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

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

30 La molécula efectora y el agente citotóxico de la combinación anticáncer pueden tener modos de acción de interferencia y en donde estos modos de acción implican preferentemente la inhibición de microtúbulos o la inducción de detención del ciclo celular (melfalan, bortezomib y lenalidomida o talidomida son agentes citotóxicos que inducen la detención de ciclo celular). Alternativamente, puede haber modos de acción sin interferencia.

35 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 en el que al menos un agente citotóxico y el inmunoc conjugado al menos se almacenan en recipientes separados.

40 Se describe aun además un método para tratar una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, que comprende:

45 administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de la combinación anticáncer mencionada en el presente documento o una combinación anticáncer que comprende al menos un agente citotóxico y al menos un inmunoc conjugado que comprende un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, en donde el agente dirigido se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado, y en donde el inmunoc conjugado supera un fenotipo refractario de un paciente contra el agente citotóxico.

50 Se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, que comprende:

administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de una combinación anticáncer analizada en el presente documento y en donde el inmunoc conjugado supera un fenotipo refractario.

55 Se describe además un método para tratar una enfermedad no plasma proliferativa asociada a células diana que expresan CD138, que comprende:

60 administrar a un sujeto que lo requiere o a células de la enfermedad no plasma proliferativa una cantidad eficaz de un inmunoc conjugado que comprende al menos un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora, en donde dicho agente dirigido se fija funcionalmente a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado, en donde dicho CD138 se expresa, en dicho sujeto, en dichas células diana y en células no diana a niveles comparables o en donde dicho CD138 se expresa, en dicho sujeto, en dichas células diana a niveles inferiores a las células no diana que expresan CD138.

65

Dichas células no diana que expresan CD138 pueden ser células epiteliales.

Se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad no plasma proliferativa asociada a células diana que expresan CD138, que comprende:

5 administrar a un sujeto que lo requiere o a células de dicha enfermedad no plasma proliferativa una cantidad eficaz de un inmunoc conjugado que comprende

10 al menos un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y
al menos un molécula efectora, en donde dicho agente dirigido se fija funcionalmente

a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado,

15 en donde las células diana de dicha enfermedad desprendieron CD138 durante un periodo de 24 horas, 2, 3, 4, 5, 6 días.

Dicha enfermedad puede ser carcinoma mamario.

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

(i) un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y
25 (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.

30 Aun adicionalmente se proporciona 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 una enfermedad en un sujeto asociado a células diana que expresan CD138, en donde el inmunoc conjugado comprende:

(i) un agente dirigido que marca como diana células que expresan CD138 y
35 (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.

40 La combinación del al menos un agente citotóxico y el al menos un inmunoc conjugado tiene una relación 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 de sinergia de aproximadamente 1 y la molécula efectora y el agente citotóxico tiene modos de acción superpuestos.

45 Breve descripción de las figuras

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

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

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

50 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 de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 y anticuerpo nBT062 a células OPM-2. Se dieron diferentes concentraciones de nBT062 y conjugados a las células y se midió la fluorescencia media por análisis FACS.

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

60 La **Figura 8** muestra volúmenes de tumor para ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) anticuerpo nBT062, (C) DM4 libre o (D) conjugado no dirigido huC242-DM4 durante el tiempo (días) post-inoculación con células de tumor MOLP-8.

65 La **Figura 9** muestra volúmenes de tumor para ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) nBT062-SPDB-DM4, (C) B-B4-SPP-DM1 o (D) nBT062-SPP-DM1 durante el tiempo (días) posterior a inoculación con células de tumor MOLP-8.

La **Figura 10** ilustra volumen de tumor promedio (+/- SD) de xenoinjertos de mieloma múltiple humano MOLP-8

en ratones CB.17 SCID durante el tiempo (días) posterior a inoculación.

Las **Figuras 11A y B** muestran actividad anti-tumoral de nBT062-DMx contra células de tumor CD138⁺ MOLP-8 en un modelo de tumor MOLP-8 voluminoso en ratones SCID. El volumen de tumor se da como promedio (+/- SD) por cada grupo.

La **Figura 12** es una gráfica que refleja la efectividad anti-tumoral de nBT062 que contiene DMx conjugados en el modelo SCIDhu/INA-6 hacia células de mieloma múltiple en el ambiente de médula ósea humana. Receptor IL-6 humano soluble producido por múltiples células de mieloma (shuIL-6R) se empleó como un indicador para carga de tumor. Triángulo: nBT062-SPP-DM1, Cuadrado: nBT062-SPDB-DM4; Diamante: vehículo control.

La **Figura 13** muestra exterminio por activación inespecífica mediada por nBT062-SPDB-DM4 *in vitro*. Las células OPM2 positivas a CD138 y células Namawla negativas a CD138 se cultivaron con nBT062-SPDB-DM4 a diferentes concentraciones y la viabilidad celular se midió. Los valores OD₄₅₀ representan una medida para viabilidad celular.

La **Figura 14** muestra curvas de crecimiento de tumor en un modelo de ratón de xenoinjerto una sola inyección de BT062. Las dosis marcadas con un asterisco (*) se basan en el peso molecular de DM4 enlazado.

La **Figura 15** muestra la remisión completa de un carcinoma de páncreas de xenoinjerto en ratones tratados con BT062 contra un control.

La **Figura 16** muestra la remisión completa de un carcinoma mamario de xenoinjerto en ratones tratados con BT062 contra un control.

La **Figura 17** 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 en el presente documento por una dosis de 160 mg/m², mostraron una eliminación de plasma más cercana al valor esperado.

La **Figura 18** compara el perfil en plasma de BT062 al de monos tratados a la misma dosis. La comparación aclara que la rápida eliminación de plasma a bajas dosis no puede ser extrapolada de los modelos en animales disponibles y parece ser específica para los humanos.

La **Figura 19** muestra los valores c_{max} medidos de BT062 en comparación con los valores C_{max} teóricos.

Las **Figuras 20 y 21** muestran que los valores C_{max} en general son similares sobre varios ciclos de tratamiento.

La **Figura 22** aclara que la rápida eliminación de plasma no puede atribuirse a un efecto amortiguador provocado por CD138 soluble.

La **Figura 23** ilustra un diagrama de tratamiento en sujetos humanos con diferentes dosis de BT062 administradas en el transcurso de los ciclos de tratamiento indicados, en donde cada ciclo de tratamiento duró 21 días y la dosificación respectiva se administró el día 1 de cada ciclo.

La **Figura 24** muestra el nivel de proteína M de orina medido para un paciente que recibe 20 mg/m² a intervalos de tres semanas. Se muestran los días 5 a 205.

La **Figura 25** muestra el nivel de proteína M en suero medido para un paciente que recibe 40 mg/m² a intervalos de tres semanas. Se muestran los días 21 a 119.

La **Figura 26** muestra el nivel de FLC kappa medido para un paciente que recibe 160 mg/m² a intervalos de tres semanas. Se muestran los días 21 a 101.

La **Figura 27** muestra la concentración en plasma para BT062 en la cohorte de 20 mg/m² de pacientes.

La **Figura 28** muestra los efectos de la terapia de combinación en volumen de tumor medio (TV, por sus siglas en inglés) en un modelo de ratón de xenoinjerto. El resultado muestra los efectos de la combinación de BT062 y lenalidomida.

La **Figura 29** 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 30** 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 melfalan.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se dirige a un inmunoc conjugado para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a células que expresan CD138, comprendiendo el inmunoc conjugado:

al menos un anticuerpo dirigido a diana que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora,

en donde dicho anticuerpo dirigido está funcionalmente fijado a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoc conjugado,

en donde el anticuerpo dirigido comprende una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31-35, 51-68 y 99-111 de SEQ ID NO: 1, en donde al menos una parte del anticuerpo dirigido confiere propiedades del isotipo IgG4, en donde dicha al menos una molécula efectora es al menos un maitansinoide,

en donde dicha enfermedad es mieloma múltiple de relapso o refractario.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un inmunoc conjugado para su uso en la administración a sujetos,

- en particular sujetos humanos (pacientes), que lo requieren. En particular, la invención se refiere al uso de inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos a CD138 descritos en el presente documento y a la administración de la molécula o moléculas efectoras de los inmunoconjugados en sitios diana y a la liberación de molécula o 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 tales agentes dirigidos a CD138 y moléculas efectoras potenciales que se fijan a los agentes dirigidos. Las moléculas efectoras pueden activarse por escisión y/o disociación de la porción de agente dirigido del inmunoconjugado sobre o en sitio diana. Los inmunoconjugados pueden ser para administración solos o como parte de una combinación anticáncer que incluye un agente citotóxico tal como, pero no limitado a, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib), agente anti-angiogénico/agente inmunomodulador (por ejemplo, talidomida o lenalidomida), agente alquilante de ADN (por ejemplo, melfalan) o corticosteroide (por ejemplo, dexametasona), en donde la combinación anticáncer tiene efectos de sinergia o efectos aditivos inesperados en el tratamiento de cáncer sobre el inmunoconjugado empleado solo en monoterapia, el agente citotóxico empleado solo en monoterapia o ambos.
- Los inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un sujeto que requiere tratamiento o a células aisladas de un sujeto tal que requiere tratamiento. La molécula o moléculas efectoras pueden liberarse o desprenderse del inmunoconjugado por escisión/disociación en o dentro de una célula, tejido y/u órgano diana.
- En un ejemplo, el inmunoconjugado BT062, que marca como diana células que expresan CD138 mediante el anticuerpo nBT062 y comprende DM4 como una molécula efectora, se administró a un paciente con mieloma múltiple refractario/de relapso cuatro veces en una cantidad de 80 mg/m² como dosis únicas repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 21 días con la única dosis/por ciclo que se administra el día uno del ciclo. En este ejemplo, el inmunoconjugado se administró en forma intravenosa al paciente de manera tal que pueda mejor concentrarse en y/o dentro de las células de los tumores. Las mediciones de la concentración de plasma de BT062 mostraron que en una fase de medición inicial (hasta 2 horas después del fin de administración) los valores C_{max} para BT062 fueron significativamente inferiores al valor teórico calculado mientras que no se observaron efectos secundarios adversos, sugiriendo que BT062 se concentra en la diana de tumor en vez de fijarse aleatoriamente al CD138 diana y no diana. Podría excluirse un "efecto amortiguador" que resulta de sCD138 (véase la Figura 20).
- En otro ejemplo, el inmunoconjugado BT062 se administró a un paciente con mieloma múltiple refractario/de relapso diez veces en una cantidad de 20 mg/m² cada una como dosis única repetida, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 21 días con la única dosis/por ciclo que se administra el día uno del ciclo. En este ejemplo, el inmunoconjugado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que pueda mejor concentrarse en y/o dentro de las células de tumor. No se proporcionaron medios adicionales para liberar la molécula efectora del inmunoconjugado. Diez ciclos de tratamiento fueron bien tolerados y al menos pudo lograrse enfermedad estable para estos ciclos de tratamiento.
- En otro ejemplo, el inmunoconjugado BT062 se administró a un paciente con mieloma múltiple de relapso cuatro veces en una cantidad de 160 mg/m² como dosis únicas repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento fue 21 días con la única dosis/por ciclo que se administra el día uno del ciclo. En este ejemplo, el inmunoconjugado se administró intravenosamente al paciente de manera tal que pudo mejor concentrarse en y/o dentro de las células de tumor. A esta concentración, eliminación de plasma todavía fue inferior a la C_{max} teórica, pero no al grado observado con dosis menores. Sin embargo, puede observarse una fuerte disminución del nivel FLC del suero después de un único tratamiento. Pudo observarse una respuesta parcial después de un 2^o, 3^o y 4^o tratamientos.
- En ciertos regímenes de tratamiento, la administración de medicación que alivia dolor y/o complicaciones de huesos pudo interrumpirse ya que el dolor del paciente disminuyó ante la administración del inmunoconjugado. Como resultado, se evitaron efectos secundarios asociados a estas medicaciones (incluyendo bisfosfonatos y otra medicación de osteoporosis), tales como osteonecrosis de la mandíbula.
- Todavía en otro ejemplo, el inmunoconjugado BT062 se co-administra a un paciente con mieloma múltiple de relapso, cuatro veces en una cantidad de 120 mg/m² con una dosis oral diaria de 10 mg del Agente inmunomodulador lenalidomida como dosis únicas repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento es 21 días con la única dosis/por ciclo que se administra el día uno del ciclo. En este ejemplo, el inmunoconjugado se administra en forma intravenosa al paciente, de manera tal que pueda mejor concentrarse en y/o dentro de las células de tumor.
- En otro ejemplo, el inmunoconjugado BT062 se administra a un paciente que padece un tumor pancreático como dosis únicas repetidas, en donde la duración de cada ciclo de tratamiento es 21 días con la única dosis/por ciclo que se administra el día del ciclo. En este ejemplo, el inmunoconjugado se administra en forma intravenosa al paciente de manera tal que pueda concentrarse mejor en y/o dentro de las células de tumor.
- CD138 o syndecan-1 (también descrito como SYND1; SYNDECAN; SDC; SCD1; ANTÍGENO CD138, número de acceso SwissProt: P18827 humano) es una glucoproteína de membrana que originalmente se describió que está

- presente en células de origen epitelial y posteriormente se encontró en células hematopoyéticas (Sanderson, 1989). CD138 tiene un largo dominio extracelular que se une a moléculas solubles (por ejemplo, los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF) y a moléculas insolubles (por ejemplo, a los componentes de matrices extracelulares de colágeno y fibronectina) a través de cadenas de heparán sulfato (Langford, 1998; Yang, 2007) y actúa como receptor para la matriz extracelular. CD138 también media la adhesión célula a célula a través de moléculas de unión a heparina expresadas por las células adherentes. Se ha mostrado que CD138 tiene un papel como un co-receptor para factores de crecimiento de células de mieloma (Bisping, 2006). Los estudios de diferenciación de células de plasma mostraron que CD138 también debe considerarse un antígeno de diferenciación (Bataille, 2006).
- En hematopoyesis maligna, CD138 se expresa altamente en la mayoría de las células de 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) (Horvathova, 1995), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML) (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 y Kopper, 2001). La expresión de CD138 también se asocia a diferentes tipos de cánceres gastrointestinales (Conejo et al., 2000). Como se ilustra en la Tabla 1, una cantidad de líneas celulares tumorigénicas existen asociadas a la expresión/sobre-expresión de CD138.
- Tabla 1:** Expresión de CD138 en diferentes líneas celulares. En el contexto de MM se mostró que la sensibilidad hacia BT062 se correlaciona con una expresión más alta de CD138 (RFI = índice de fluorescencia relativa, por sus siglas en inglés).

Línea celular	Origen	Sensibilidad	Expresión de CD138	
		IC ₅₀ (nM)	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

- La sensibilidad observada de, por ejemplo, las líneas celulares de carcinoma de mama y líneas celulares de carcinoma de páncreas fueron sustancialmente menores que las de líneas celulares MM. Sin embargo, como se describe en la sección experimental en modelos de xenoinjerto de ratón usando células de pacientes con cáncer de mama y cáncer pancreático, no solo se obtuvieron resultados comparables, sino significativamente mejores que en los modelos de xenoinjerto comparables para MM. En ambos casos pudo obtenerse la remisión completa finalmente mientras que modelos MM comparables mostraron un retraso marcado en crecimiento de tumor, pero no remisión completa.
- 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. Se había informado la pérdida de expresión de CD138 y a menudo se correlacionó con un desplazamiento de expresión, es decir expresión de novo en estroma circundante (Loussouarn, 2008). Como resultado, pueden esperarse menos dianas para agentes dirigidos a CD138 con el tiempo.
- Otros cánceres que se han mostrado ser positivos para la expresión de CD138 son muchos adenocarcinomas de ovarios, carcinomas de células de vejiga de transición, 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 plasmoproliferativos relacionados habrán de servir como un ejemplo de enfermedades que pueden tratarse por inmunoconjugados descritos en el presente documento.

Los trastornos plasmoproliferativos como se emplea en el presente documento significan trastornos de células de

plasma y/o hematológicos tales como MGUS, SMM, MM Activo (sintomático), Macroglobulinemia de Waldenström, plasmacitoma solitario, amiloidosis AL sistémica y síndrome de POEMS.

5 **Mieloma múltiple (MM)** se refiere a una proliferación maligna de células de plasma que típicamente se origina en la médula ósea, implica primordialmente el esqueleto de un paciente y presenta características clínicas que se atribuyen a los sitios particulares de implicación y anomalías en formación de proteínas de plasma. La afección se caracteriza habitualmente por numerosos focos difusos o acumulaciones nodulares de células de plasma anormales o malignas en la médula de diversos huesos (en especial el cráneo), provocando hinchamiento palpable de los huesos, y ocasionalmente en sitios extraesqueléticos. Tras un examen radiológico, las lesiones óseas 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 a partir de gamopatía monoclonal de significancia no determinada (MGUS, por sus siglas en inglés) a mieloma múltiple indolente (SMM, por sus siglas en inglés) a mieloma múltiple activo (MM, por sus siglas en inglés). Los síntomas de estas afecciones varían, pero pueden incluir hipercalcemia, insuficiencia renal, fatiga, anemia, dolor de huesos, fracturas espontáneas, frecuencia o duración de la infección aumentadas o color u olor anormales de la orina. Cuando la presente descripción 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 de plasma que pueden desarrollarse finalmente en MM activo.

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

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

30 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 de plasma o linfoides (normalmente visibles en electroforesis de proteínas séricas (SPEP, por sus siglas en inglés) como un solo pico) y caracterizado por la presencia de inmunoglobulina monoclonal en el suero u orina de un paciente.

35 MM indolente (**SMM**) se ha informado que precede al inicio de mieloma múltiple sintomático en ancianos. El mieloma múltiple indolente a menudo se considera una fase avanzada de MGUS; incluso en el momento del avance, el mieloma múltiple evolucionado a mieloma múltiple indolente carece habitualmente de lesiones osteolíticas u otras características cardinales de mieloma múltiple sintomático.

40 Los síntomas clínicos de MM incluyen anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal y lesiones de huesos líticas. Las distinciones en el transcurso y la gravedad de la enfermedad conforme se desarrolla desde gamopatía monoclonal de significancia no determinada (MGUS) hacia mieloma múltiple indolente (SMM) hacia mieloma múltiple (MM) se proporcionan en la Tabla 2 a continuación. La tabla también resume métodos de detección, diagnóstico y monitorización de estas condiciones. Tales síntomas y técnicas son familiares para aquellos con destreza en la materia.

45

TABLA 2			
Comparación de Características Clínicas de MM, SMM o MGUS			
Características	MM	SMM	MGUS
Células de plasma de médula	>=10 %	>=10 %	<10 %
Proteína M sérica	>=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

(continuación)

Comparación de Características Clínicas de MM, SMM o MGUS			
MM = mieloma múltiple			
SMM = mieloma múltiple indolente			
MGUS = gamopatía monoclonal de significancia indeterminada			
Etapas de clasificación por gravedad y características clínicas de mieloma múltiple			
Fases de avance de 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 siguiente: Una disminución en el número de glóbulos rojos, provocando anemia. La cantidad de calcio en sangre es muy alta, debido a que los huesos se están dañando. 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 sérica)			
SPIEP (inmunolectroforesis de proteína sérica)			
Inmunolectroforesis de proteína en orina (proteína Bence - Jones)			
Diagnóstico de MM			
>10 % de células de plasma en médula o agregados en biopsia o un plasmacitoma			

(continuación)

Comparación de Características Clínicas de MM, SMM o MGUS			
Proteína monoclonal:			
Proteína M de suero >3 g/dl o			
Proteína M en orina			

5 El mieloma múltiple activo (MM) se reconoce típicamente en forma clínica por la proliferación de células de plasma malignas en la médula ósea de un paciente. Estas células de plasma neoplásicas producen inmunoglobulinas y evolucionan a partir de linfocitos B. Las inmunoglobulinas que se producen por las células de plasma pueden ser detectadas en el suero de sangre y/u orina de un paciente por prueba de electroforesis.

Como se indica en la **Tabla 2**, la medición de proteína M de suero es una herramienta importante para estimar MM en diferentes etapas.

10 **"Proteína M"** se refiere a una proteína monoclonal que típicamente se visualiza como una banda estrecha en gel electroforético, o un arco anormal en inmunolectroforesis. 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 denominado pico M y más ampliamente paraproteína).

15 La **"electroforesis de proteína sérica"** (SPE o SPEP) y **"electroforesis de inmunofijación"** (IFE) pueden detectar inmunoglobulina monoclonal, que se produce en varios trastornos proliferativos de células de plasma 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.

25 Aquellas **"moléculas de cadena ligera libres"** (FLC, por sus siglas en inglés) incluyen cadenas ligeras λ y κ . Las células de plasma 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. Las células de plasma 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 presencia de una inmunoglobulina monoclonal, las relaciones $\kappa : \lambda$ pueden ser superiores o bien menores que el intervalo normal, dependiendo de la clase de FLC implicada. La vida media en suero de FLC es de 2-6 horas, en comparación con 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, las mediciones de FLC en suero permiten detección temprana de relapso.

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

Esas enfermedades no se abarcan en la presente patente.

40 De acuerdo con la invención, el inmunoconjugado es para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, en donde la enfermedad es mieloma múltiple de relapso o refractario.

45 El **tratamiento** 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 la gravedad o la remisión del trastorno. En el caso de MM generalmente solo pacientes con MM activo de fase II o III reciben terapia primaria (los pacientes de fase I con SMM solo se observan inicialmente a intervalos de 3 a 6 meses), un tratamiento no solo incluye tratamiento de, por ejemplo, cualquier fase activa de MM, sino también incluye el tratamiento de formas de estados de enfermedad que preceden el estado de enfermedad tradicionalmente tratado. El tratamiento en particular también incluye evitar la progresión de un estado de enfermedad al siguiente: en el caso de MM, esto sería por ejemplo la progresión de MGUS a SMM o de SMM a MM activo de fase I u otra fase de MM. En el caso de cánceres de páncreas exocrino, por ejemplo una progresión de la Fase I a Fase 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 analiza 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 blando y hueso; inhibición (es decir, frenar en cierta medida y preferentemente detener) de la 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 al 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 monitorizarse, 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 a células que expresan CD-138, se miden otros parámetros para estimar el efecto de un tratamiento. CRP es un parámetro de inflamación no específico para la monitorización clínica de cáncer. Por nombrar solo unos cuantos, para cáncer pancreático, los 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 proteína C-reactiva. Además se usa la formación de imagen tales como sonografía, CT, MRT. En cáncer de cabeza y cuello, se usan biomarcadores que dependen del tipo de tumor (por ejemplo, SCC para carcinoma de células escamosas, NSE para células de Merkel, CEA); en carcinoma de mama, la expresión de CA 15-3Her₂ y la expresión de Cadherina pueden emplearse como marcadores, mientras que el tratamiento se monitoriza por marcadores de suero tales como enolasa específica de neuronas (NSE, por sus siglas en inglés).

El antígeno de tumor de vejiga (BTA, por sus siglas en inglés) y las pruebas NMP22 pueden emplearse junto con cistoscopia (usando un tubo iluminado delgado para observar la vejiga) para diagnosticar la afección en sujetos sintomáticos. Estas pruebas también se utilizan para dar seguimiento a algunos pacientes después de tratamiento, aunque la cistoscopia y la citología de orina (utilizando un microscopio para buscar células de cáncer en la orina) todavía se recomiendan como las pruebas normativas para diagnóstico y seguimiento. Las pruebas BTA y NMP22 a menudo se emplean entre cistoscopias. Los 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 TPA pueden estar elevados y pueden emplearse para dar seguimiento a los pacientes durante y después de tratamiento. Para el 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 sabe que desprenden CD138. La pérdida de CD138 de superficie está correlacionada con un mal pronóstico en mieloma. También se han detectado altos niveles de CD138 soluble 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 EMT (transición mesenquimal epitelial, por sus siglas en inglés) este proceso describe la transformación de una célula maligna en una célula mal o menos diferenciada asociada a invasividad y fase metastásica. Esto por ejemplo se informa para cáncer de mama metastásico (Lousouarn et al., 2008).

Una **cantidad eficaz** de un agente, en particular un inmunoc conjugado o una composición farmacéutica que comprende un inmunoc conjugado 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 eficaz 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 inmunoc conjugado que da como resultado una farmacocinética igual a la observada a dosis de 200 mg/m² cuando el inmunoc conjugado 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 eficaces 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 experta en la materia esperará que la administración concomitante con corticosteroides o con antibióticos permitirá dosis ligeramente superiores del inmunoc conjugado incluso en casos de efectos secundarios en la piel, que sin embargo pueden evaluarse fácilmente por la persona experta en la materia.

Para evaluar el éxito de la administración de un fármaco, en el presente documento un inmunoc conjugado (su capacidad para producir una respuesta funcional, es decir su efectividad), se distinguen diferentes “respuestas” a una administración.

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

la expresión **respuesta completa** (CR) se refiere a la inmunofijación negativa de suero y orina y desaparición de cualquier plasmacitoma de tejido blando y <5 % de células de plasma en médula ósea;

- la expresión **respuesta completa severa** (sCR) 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; la expresión **respuesta parcial muy buena** (VGPR) 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 24h;
- 5 la expresión **respuesta parcial** (PR) 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 durante 24 horas, si la proteína M de suero y orina no se miden, una disminución de ≥ 50 % en la diferencia entre niveles FLC implicados y no implicados 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
- 10 medir el ensayo o análisis de cadenas ligeras libres en suero, reducción de ≥ 50 % en células de plasma 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 blando también se requiere (Durie et al., 2006).
- 15 La expresión **respuesta menor** (MR) en relación a pacientes con mieloma de relapso/refractario se refiere en el contexto de la presente invención 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 blando también se requiere, sin aumento en tamaño o número de lesiones de huesos líticas (desarrolladas por fractura de
- 20 compresión no excluye respuesta).
- Sin embargo, una respuesta aunque no formalmente clasificada, también incluye una reducción de al menos 30 %, preferentemente al menos 40 % o 50 % en niveles de FLC en suero. Esto es en particular significativo en casos en donde la proteína M no puede medirse.
- 25 La expresión **enfermedad estable** (SD) se refiere a no cumplir los criterios para CR, VGPR, PR o enfermedad progresiva, mientras que la expresión **enfermedad progresiva** (PD) se refiere al aumento del 25 % desde el valor de respuesta más bajo en uno cualquiera o más de los siguientes:
- 30 – Componente M en suero (el aumento absoluto debe ser $\geq 0,5$ g/100 ml) y/o
 – Componente M en orina (el aumento absoluto debe ser ≥ 200 mg por 24 horas) y/o
 – Solo en pacientes sin niveles de proteína M medibles en suero y orina; la diferencia entre niveles FLC implicados y no implicados (el aumento absoluto debe ser > 100 mg/l)
 – Porcentaje de células de plasma en médula ósea (el % absoluto debe ser ≥ 10 %)
- 35 – Desarrollo definido de nuevas lesiones de hueso o plasmacitomas de tejido blando o aumento definido en el tamaño de lesiones en hueso existentes o plasmacitomas de tejido blando.
 – Desarrollo de hipercalcemia (calcio en suero corregido $>11,5$ mg/100 ml) que puede atribuirse solamente al trastorno proliferativo de células de plasma.
- 40 La expresión mieloma con relapso se refiere en el presente documento a una forma de MM activo en un sujeto, en donde dicho sujeto se sometió al menos a un régimen de tratamiento previo y que no cumple con los criterios para mieloma de relapso/refractario.
- La expresión mieloma refractario en general se refiere a un estado de la enfermedad cuando el número de células de plasma continúa incrementándose aun cuando se proporciona tratamiento, esto es la enfermedad al tiempo de evaluación ha demostrado que no es capaz de recibir el régimen de tratamiento administrado.
- 45 La expresión mieloma de relapso/refractario se refiere en el presente documento al relapso de enfermedad mientras que en terapia de rescate, o progresión dentro de 60 días de la terapia más reciente.
- 50 La expresión fenotipo refractario incluye cualquier tipo de mieloma refractario, esto es mieloma refractario y de relapso/refractario.
- 55 La expresión mieloma de relapso o refractario cubre mieloma de relapso refractario y de relapso/refractario.
- En el estudio clínico analizado 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.
- 60 La expresión "progresión a", por ejemplo "MM activo" 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 IMWG (grupo de trabajo de mieloma internacional, por sus siglas en inglés) para la enfermedad progresiva en MM en cualquiera uno o más de los siguientes que se siente relacionados al trastorno proliferativo de células de plasma clonales subyacentes, desarrollo de nuevos plasmacitomas de tejido blando o lesiones de hueso, hipercalcemia (>11 mg/100 ml), disminución en
- 65 hemoglobina de ≥ 2 g/100 ml, y nivel de creatinina en suero ≥ 2 mg/100 ml. (Kyle & Rajkumar, 2009).

La patogénesis del mieloma múltiple implica la unión de células de mieloma, mediante moléculas de adhesión de superficie celular, a células de estroma de médula ósea (BMSC) así como la matriz extracelular (ECM). Esta unión activa y de esta manera puede hacerse finalmente responsable del crecimiento de células de mieloma múltiple, resistencia a fármaco, inmigración de células de MM en 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 metaloproteínasa de matriz 1, de esta manera promoviendo la resorción de huesos e invasión de tumor (Hideshima et al. 2007). Las interacciones entre células de mieloma múltiple y el microambiente de médula ósea resulta en activación de una cascada pleyotrópica proliferativa y antiapoptósica.

Para pacientes de mieloma múltiple, pero también para pacientes que padecen otras enfermedades asociadas a dolores óseos, existe una cantidad de tratamientos de soporte para tratar este y otros síntomas. Los 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 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 los bisfosfonatos reducen el dolor de huesos asociado a MM. Los pacientes también pueden someterse a cirugía si sus huesos son débiles o se rompen.

En una realización, los inmunocnjugados 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 implica 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 esta manera para aliviar dolores de huesos asociados con dichas complicaciones. Los bisfosfonatos comunes incluyen para administración oral FOSOMAX, BONIVA, ACTONEL, DIDRONEL y SKELID, para administración intravenosa, BONEFOS, AREDIA y ZOMETA.

Una reducción en dolor de huesos y/o complicaciones de huesos de acuerdo con la presente invención puede resultar en una reducción en la cantidad de medicamento antidolor que se administra a un paciente y/o en la cantidad de cualesquiera medicamentos que se administran para contraatacar estas complicaciones. Esta reducción puede ser (i) respecto a una cantidad administrada previamente, cuando el paciente se somete a (a) un tratamiento de la enfermedad que provoca dolor de huesos y/o complicaciones de huesos que difieren de los tratamientos descritos en el presente documento o (b) sin tratamiento o (ii) respecto a una cantidad administrada a otro paciente que padece la misma enfermedad y está en aproximadamente la misma fase de la enfermedad. Una reducción tal preferentemente es aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % de reducción y preferentemente una cesación completa de la administración de la medicación. Cuando lo último se cumple, esto es, cuando el paciente no requiere subjetivamente ninguna medicación contra dolores de huesos y/o complicaciones de huesos como resultado de que se le administre el inmunocnjugado ya sea solo o como parte de una combinación anticáncer de acuerdo con la invención, la administración del inmunocnjugado se dice que ha reducido el dolor de huesos y/o complicaciones de huesos a un nivel aceptable. Como resultado los efectos secundarios adversos que resultan de la medicación administrada para aliviar dolores de huesos y/o complicaciones de huesos deberá reducirse o eliminarse.

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 positivamente muchas citocinas como interleucina-6 (IL-6) y factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) que tienen actividades angiogénicas y promotoras de crecimiento de tumor (Hideshima et al. 2007). Las cascadas de señalización iniciadas por estas citocinas eventualmente resultan en resistencia de células MM a terapéutica convencional (Anderson et al. 2000; Hideshima et al. 2006).

En el compartimento hematopoyético humano normal, la expresión de CD138 se restringe a células de plasma (Wijdenes, 1996; Chilosi, 1999) y CD138 no se expresa en linfocitos de sangre periférica, monocitos, granulocitos y glóbulos rojos. En particular, células madre y progenitoras CD34⁺ no expresan CD138 y los mAb anti-CD138 no afectan al 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. Solo se vio una débil tinción en células endoteliales (Bernfield, 1992; Vooijs, 1996). Se ha reportado que CD138 existe en formas polimórficas en células de linfoma humano (Gattei, 1999).

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 esos, B-B4, 1D4 y MI15 reconocieron tanto la molécula intacta como la proteína núcleo de CD138 y se mostró que reconocen cualquiera de los mismos o epítopos estrechamente relacionados (Gattei, 1999). Los estudios previos informaron que B-B4 no reconoce CD138 soluble, sino solo CD138 en la forma unida a membrana (Wijdenes, 2002).

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 convencional (Clement, 1995; Wijdenes, 1996). B-B4 se une 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 solo 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 reportaron la falta de especificidad de antígenos asociados con MM contra tumores (Couturier, 1999).

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).

La presente invención usa la expresión **célula de tumor** para incluir células de cáncer así como células precancerosas que pueden o no formar parte de un tumor sólido.

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

Un **anticuerpo dirigido** es o se basa en un anticuerpo natural o se produce sintéticamente o por ingeniería genética y se une a un antígeno en una célula o células (célula o células diana) de interés. Un anticuerpo dirigido incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multispecífico (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 fijarse a una formulación liposómica incluyendo moléculas efectoras (Carter, 2001). Un fragmento de anticuerpo que comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv pero también diacuerpos; anticuerpos de dominio (dAb) (Ward, 1989; patente de Estados Unidos 6.005.079); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multispecíficos formados a partir 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 de aminoácido corto que tiene por ejemplo la secuencia (glicina₄serina)_n, que tiene suficiente flexibilidad para permitir que los dos dominios ensamblen una cavidad de unión a 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, obtenerse por RT-PCR que clona las regiones variables de ARNm que se extrae del hibridoma precursor. Alternativamente, scFv puede generarse de novo por tecnología de visualización de fagos (Smith, 2001). Como se emplea en el presente documento, 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 unirse específicamente a un antígeno que se une específicamente por el anticuerpo al que se hace referencia. Un anticuerpo biespecífico 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 Estados Unidos 20020006379). Un anticuerpo biespecífico también puede unirse a más de un antígeno en una célula diana (Carter, 2001). Un anticuerpo puede modificarse por ejemplo al introducir residuos cisteína para introducir grupos tiol (Olafsen, 2004).

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.

Los 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. Los métodos adecuados para humanizar anticuerpos incluyen injerto de CDR (injerto de región de determinación de complementariedad) (documentos EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de EE.UU. 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o repavimentación (documentos 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 repavimentación usa una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies distintas de CDR de regiones variables de anticuerpo para asemejar las superficies de anticuerpos conocidos del hospedador diana. Las estrategias y métodos para recubrimiento de anticuerpos, y otros métodos para reducir inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un hospedador diferente, se desvelan por ejemplo en la Patente de EE.UU. 5.639.641. Los anticuerpos humanos pueden elaborarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de visualización de fagos. Véanse 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 quiméricos de ratón/humano o anticuerpos quiméricos de mono/humano, 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; y anticuerpos multiespecíficos en el presente documento se denominan anticuerpos dirigidos de ingeniería.

Los anticuerpos quimerizados, mantienen la región de unión a anticuerpo (ABR o región Fab) del anticuerpo no humano, por ejemplo el anticuerpo murino en el que se basan, mientras que cualquier región constante puede proporcionarse por ejemplo por un anticuerpo humano. En general, la quimerización y/o el intercambio de regiones constantes de un anticuerpo no afectarán a 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 afinidad de unión más alta (como se expresa por valores K_D) que el anticuerpo no humano respectivo en el que se basa. En particular, el anticuerpo nBT062 y los anticuerpos basados en el mismo pueden tener afinidad de anticuerpo más alta que el B-B4 murino.

En otra realización preferida de la presente invención, los inmunoconjugados que comprenden esos 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 reducción más alta 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 unión 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 más que 1,6. Los inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos pueden caracterizarse por constantes de disociación de 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 los inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos de contraparte murinos pueden caracterizarse por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o mayores a 2,6 (compárese la Tabla 9, Materiales y Métodos).

La molécula de anticuerpo básica es una estructura bifuncional en donde las regiones variables unen 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, se sabe que solo IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanos activan eficazmente el sistema de complemento. Mientras que las regiones constantes no forman los sitios de enlace de antígeno, la disposición 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 de IgG pueden unirse a receptores Fc en células tales como monocitos, células B y células NK, de esta manera activando las células para liberar citocinas. Diferentes isotipos también pueden activar el complemento, dando como resultando inflamación local o sistémica. En particular, los diferentes isotipos de IgG pueden ligar Fc γ R a diferentes grados. Fc γ R 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 se unen fuertemente a una diversidad de estas clases de glucoproteínas Fc γ R, IgG4 muestra una unión mucho más débil. En particular, IgG4 es un enlazador intermedio Fc γ RI, que resulta en ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) relativamente baja o incluso nula, y no se une a Fc γ RIIIA o Fc γ RIIA. IgG4 también es un enlazador débil de Fc γ RIIB, que es un receptor inhibitorio. Adicionalmente, IgG4 media solo en forma débil o nula la fijación de complemento y débil o nula citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). IgG4 puede emplearse específicamente para evitar el marcaje como diana mediado por Fc de FcR hepático ya que no exhibe interacción con Fc γ RII en LSEC (células endoteliales sinusoidales de hígado), ninguna o débil interacción con Fc γ RI-III en células Kupffer (macrófagos) y ninguna interacción con Fc γ RIII en células NK hepáticas. Ciertas mutaciones que reducen adicionalmente cualquier CDC también son parte de la presente invención. Por ejemplo, se mostró que los restos IgG4 en las posiciones 327,

330 y 331 reducen la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Una de más mutaciones que estabilizan el anticuerpo también es parte de la presente invención (también denominadas en el presente documento "mutaciones estabilizantes"). Esas mutaciones incluyen en particular mutaciones de leucina a ácido glutámico en la región CH2 de IgG4 e intercambios serina a prolina en el núcleo bisagra IgG4. Estas mutaciones disminuyen, en ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de medias moléculas a menos del 10 %, a menos del 5 % y preferentemente menos del 2 % o el 1 %. Aún más, la vida media *in vivo* de los anticuerpos estabilizados de esta manera puede aumentarse varios días incluyendo 1, 2, 3, 4 o más de 5 días (Schuurman, 1999).

10 Cuando la presente invención se refiere a un inmunocombinado 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 se confieren preferentemente por una región de anticuerpo adicional, 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 del 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 medirse 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 inmunocombinados que comprenden al menos parte de un anticuerpo dirigido de ingeniería que confiere propiedades de isotipo IgG4 es una mejora de la especificidad de unión y una toxicidad reducida. También, la afinidad reducida resultante a receptores Fc mejora el marcaje como diana específico de antígeno de las células de tumor dando lugar a reducida toxicidad contra células CD138 negativas.

25 Los agentes dirigidos, incluyendo anticuerpos dirigidos desvelados en el presente documento también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a antígeno, en particular a CD138. Las afinidades de unión preferidas de agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) menores que 1,6, menores que 1,5 o aproximadamente o menores que 1,4. Para inmunocombinados 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 en base al 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 un 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 de polipéptido los dominios variables de cadena ligera y pesada de una molécula de anticuerpo, la ABR se proporciona por solo una molécula de polipéptido. Los fragmentos FAB se obtienen habitualmente por digestión con papaína y tienen una cadena ligera y parte de una cadena pesada y de esta manera comprenden una ABR con un solo sitio de combinación de antígeno. Por otra parte, diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos regiones de unión a antígeno. En el contexto de la presente descripción, 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 una 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 descripción que la ABR ya es idéntica a una ABR de origen natural correspondiente o se basa en la misma. Una ABR se basa en una ABR de origen natural si tiene la especificidad de unión de la ABR de origen natural. Sin embargo, dicha ABR puede comprender, por ejemplo mutaciones puntuales, adiciones, deleciones o modificación post traduccional tales como glucosilación. Una ABR tal puede tener en particular más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, preferentemente más del 95 %, más del 98 % o más del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la ABR de origen natural.

55 nBT062 (véase también la Figura 1) es un mAb IgG4 quimérico humano murino, es decir una versión quimerizada de B-B4. Esta versión quimerizada de B-B4 se creó para reducir la HAMA (respuesta humoral de anticuerpos humanos anti ratón), manteniendo la funcionalidad de la región de unión a anticuerpo de B-B4 para CD138. De manera sorprendente, los resultados obtenidos usando un inmunocombinado que comprende este anticuerpo dirigido de ingeniería fueron mucho más homogéneos (se redujo la varianza en los resultados). El protocolo para producir nBT062 se especifica a continuación. Las 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 el 11 de diciembre de 2007. El número de identificación es DSM ACC2875. Un anticuerpo quimérico específico de CD138 basado en B-B4 se denomina genéricamente en el presente documento c-B-B4.

65 La secuencia de aminoácidos para ambas, las cadenas pesadas y ligeras, se ha predicho a partir de la traducción de la secuencia de nucleótidos para nBT062. La secuencia de aminoácidos predichas para cadena pesada y cadena

ligera se presentan en **Tabla 3**. Las regiones variables predichas están en **negrita**, las CDR predichas están subrayadas.

Tabla 3. Secuencia de Aminoácidos predicha para nBT062

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

1	<u>QVQLQQSGSE</u> LMPGASVKI SCKATGYTFS <u>NYWIEWVKQR</u> PGHGLEWIGE
51	<u>ILPGTGRTIY</u> <u>NEKFKGKATF</u> TADISSNTVQ <u>MQLSSLTSED</u> <u>SAVYYCARRD</u>
101	<u>YYGNFYAMD</u> <u>YWGQGTSVTV</u> SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151	VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201	KTYTCNVDPHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251	DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS
301	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351	YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
401	DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSQSVM HEALHNHYTQKLSLSLGL (K)

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

10 - Secuencia predicha de cadena ligera nBT062 (SEQ ID NO: 2):

1	<u>DIQMTQSTSS</u> <u>LSASLGDRVT</u> <u>ISCSASQGIN</u> <u>NYLNWYQQKP</u> <u>DGTVELLIYY</u>
51	<u>TSTLQSGVPS</u> <u>RFSGSGSGTD</u> <u>YSLTISNLEP</u> <u>EDIGTYCQQ</u> <u>YSKLPRTFGG</u>
101	<u>GTKLEIKRTV</u> AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC

Tabla 4. Muestra una comparación de las definiciones de CDR generales de Kabat y Chothia y las CDR predichas para nBT062.

15

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> CDR2: restos 51-68 CDR3: restos 99-111
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

También pueden usarse anticuerpos totalmente humanos. Esos anticuerpos pueden seleccionarse por el enfoque de visualización de fagos, en donde CD138 o un determinante antigénico del mismo se usa para unir selectivamente fagos que expresan, por ejemplo, las regiones variables B-B4 (véase, Krebs, 2001). Este enfoque se acopla ventajosamente a una técnica de maduración de afinidad para mejorar la afinidad del anticuerpo. Todos los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento son anticuerpos aislados (véase la Publicación de patente de EE.UU. 20090175863).

20

El anticuerpo dirigido, en su forma no conjugada, se internaliza de manera moderada o deficiente. La internalización moderada constituye de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 75 % de la internalización de anticuerpo total, la internalización deficiente constituye de aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 30 % de internalización después de 3 horas de incubación a 37 °C. En otro ejemplo preferido, el anticuerpo dirigido se une a CD138, por ejemplo, a 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. Las 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 el 11 de diciembre de 2007. El número de identificación de estas células de hibridoma que expresan B-B4 es DSM ACC2874. En otro ejemplo, el anticuerpo dirigido no se une sustancialmente a 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 especificidad de unión del anticuerpo nBT062. Si se dice que un anticuerpo dirigido está "basado en" un anticuerpo especificado, esto significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de 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 unión para CD138. Si, en el contexto de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo dirigido se dice que hace algo "selectivamente" tal como "dirigido selectivamente a CD138 expresado en la superficie celular" o que es "selectivo" para algo, esto significa que hay una selectividad significativa (es decir, una afinidad más alta hacia células CD138 positivas en comparación con células CD138negativas), 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. Los efectos secundarios adversos en un ambiente determinado pueden reducirse sustancialmente o incluso evitarse debido a esta selectividad.

Una "molécula efectora" de acuerdo con la presente descripción es una molécula o un derivado o un análogo de la misma que se fija a 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 una detención del ciclo celular continuo en la célula o células diana. Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención son maitansinoides.

También se desvelan moléculas efectoras que pueden ejercer los efectos deseados en una célula diana e incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos, incluyendo fármacos citotóxicos de bajo peso molecular (masa molecular de menos de 1500 Da, preferentemente menos de 1400, menos de 1200, menos de 1000, menos de 800, menos de 700, menos de 600, menos de 500, menos de 300 pero en general más de 120 Da). Éstos fármacos citotóxicos, de acuerdo con la presente divulgación, en general son fármacos citotóxicos biológicos no proteínáceos y contienen o inducen, tras la 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 más de 20 átomos de C y en ocasiones más de 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 las estructuras de anillo de interconexión son parte de estas moléculas. Estos fármacos citotóxicos biológicos no proteínáceos pueden intercalarse en el ADN (intercaladores de ADN) o alquilar el ADN, inhibir la formación de microtúbulos, son inhibidores de mitosis, inhibidores de enzimas implicadas en la integridad estructural de ADN, tales como histona desacetilato o inhibidores de enzimas que de otra forma son vitales para una célula y provocan la 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 citocinas, así como sus derivados funcionales o análogos/fragmentos.

Las toxinas pueden incluir toxinas bacterianas, tales como, pero no limitadas a, toxina diftérica o Exotoxina A, toxinas de plantas, tales como pero no limitadas a Ricina, otros alcaloides y polifenoles, micotoxinas, tales como alfa amanitina o más especialmente Amatoxinas y falotoxinas. Las toxinas pueden no solamente ser de origen bacteriano sino también de origen fúngico, vegetal, vertebrado e invertebrado, todas las cuales pueden estar genética o químicamente modificadas. Además las toxinas también pueden ser toxinas ambientales tales como, pero no limitadas a, metilmercurio. Las moléculas efectoras pueden ser proteínas, tales como aquellas de las cascadas de señalización apoptótica con actividades que inducen apoptosis, incluyendo, pero no limitadas a, Granzima B, Granzima A, Caspasa-3, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Bid truncado (tBid), Bax y Bak. Las toxinas también pueden ser dolastatinas 10 y 15 son pequeños péptidos aislados de la liebre marina *Dolabella auricularia* que se ha mostrado que interactúa con tubulina.

Tabla 5 proporciona ejemplos de fármacos citotóxicos de bajo peso molecular que se desvelan como moléculas efectoras.

Efector	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
Galato de epigalocatequina (EGCG)	459
Psoraleno	186
Melfalan	304

En un ejemplo, la molécula efectora aumenta la administración de efector interno del inmunoconjugado, en particular cuando la forma natural del anticuerpo en el que se basa el anticuerpo dirigido del inmunoconjugado es deficientemente internalizable. En otro ejemplo el efector, en su forma nativa, no es selectivo. En ciertos ejemplos el efector tiene alta toxicidad no selectiva, incluyendo toxicidad sistémica, cuando está en su forma nativa. La "forma nativa" de una molécula efectora es una molécula efectora antes de fijarse al agente dirigido para formar un inmunoconjugado. En otro ejemplo, la toxicidad no selectiva de la molécula efectora se elimina sustancialmente tras la conjugación con el agente dirigido. En otro ejemplo, la molécula efectora provoca, tras alcanzar la célula diana, muerte o detención del ciclo celular, incluyendo detención del ciclo celular continuo, en la célula diana.

También se desvelan en el presente documento moléculas efectoras que son agentes antineoplásicos, en particular agentes quimioterapéuticos intracelulares, que se definen a continuación.

Los fármacos citotóxicos de bajo peso molecular (véase anteriormente para pesos moleculares) pueden ser preferentemente antimitóticos, más en particular agentes que afectan a 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). Incluidos además en la definición de fármaco pequeño altamente citotóxico están otros agentes que interfieren con tubulina tales como epotilonas (por ejemplo ixabepilona) y derivados de colchicina (los agentes que interfieren con tubulina se analizan adicionalmente a continuación).

De acuerdo con la presente invención el inmunoconjugado para su uso de acuerdo con las reivindicaciones comprende al menos una molécula efectora, en donde la al menos una molécula efectora es al menos un maitansinoide.

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.

La maitansina es un producto natural originalmente derivado del arbusto etíope *Maytenus serrata* (Remillard, 1975; Patente de EE.UU. 3.896.111). Este fármaco inhibe la polimerización de tubulina, dando como resultando el bloqueo mitótico y la muerte celular (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). La citotoxicidad de la maitansina es 200-1000 veces superior a la de los fármacos anticáncer en uso clínico que afectan la polimerización de tubulina, tales como alcaloides Vinca o taxol. Sin embargo, las pruebas clínicas de maitansina indicaron 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 sus graves efectos secundarios sistémicos primordialmente atribuidos a su deficiente selectividad para tumores. Las pruebas clínicas con maitansina mostraron graves efectos adversos en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal.

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

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

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

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

DM-1 (N²-desacetil-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 la maitansina y se ha convertido en un pro-fármaco al enlazarlo mediante enlace o enlaces disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un antígeno asociado a tumor. Ciertos de estos conjugados (en ocasiones denominados "profármacos activados por tumor" (TAP, por sus siglas en inglés)) no son citotóxicos en el compartimento sanguíneo, ya que se activan tras asociarse a las células diana y se internalizan, liberando de esta manera el fármaco (Blättler, 2001). Se han desarrollado varios conjugados anticuerpo-DM1 (Payne, 2003) y se han evaluado en pruebas clínicas. Por ejemplo el tratamiento con huC242-DM1 en pacientes de cáncer colorectal fue bien tolerado, no indujo ninguna respuesta inmune detectable y tuvo un prolongado tiempo de circulación (Tolcher, 2003).

Otros maitansinoides particularmente preferidos comprenden una cadena lateral que contiene un tiol estéricamente impedido unido tales como, pero no limitados a, los maitansinoides N²-desacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también denominado "DM3" y N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también denominado "DM4". La síntesis de DM4 se ilustra en las Figuras 3 y 4 y se describe en otra parte en el presente documento. DM4 difiere de DM1 y DM3 ya que tiene grupos metilo en su C α . Esto resulta en un impedimento estérico cuando DM4 se fija 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 diversidad de maitansinoides que contienen un grupo tiol estéricamente impedido (que posee uno o dos sustituyentes, en particular sustituyentes alquilo, tales como los sustituyentes metilo de DM4) se desvelan en la Publicación de Patente de EE.UU. 2004/0235840, publicada el 25 de noviembre de 2004. El impedimento estérico conferido por los grupos alquilo tales como los grupos metilo en el carbono adyacente al átomo de azufre de DM3 y DM4 puede afectar a la velocidad de escisión intracelular del inmunoc conjugado. La unidad alquilo variable puede afectar por lo tanto a la potencia, la efectividad y la 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 la alquilación (por ejemplo, metilación) del fármaco libre, una vez que el fármaco se libera en su diana. La alquilación puede aumentar la estabilidad del fármaco permitiendo el efecto así denominado de activación inespecífica (bystander). Sin embargo, como apreciará la persona experta en la materia, 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 solo 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 de Fase I y Fase II patrocinadas por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) bajo IND n.º 11.857 (presentada a la FDA el 19 de septiembre de 1975). Se vieron tanto respuestas completas como parciales en pacientes con malignidades hematológicas y respuestas parciales en pacientes con un amplio espectro de tumores sólidos (Blum y Kahlert., 1978, Issell y Crooke, 1978, Chabner et al., 1978, Eagan et al., 1978, Cabanillas et al., 1978). Sin embargo, se observaron toxicidades significativas incluyendo náuseas, vómito, diarrea, elevaciones de pruebas de función de hígado, letargia y neuropatía periférica (véase Maitansine IND #11,857, Annual Report, Febrero de 1984; Blum y Kahlert., 1978, Issell y Crooke, 1978, Chabner et al., 1978). Los efectos tóxicos impidieron mayor desarrollo.

También se desvela en el presente documento una clase de agentes que interfieren con tubulina que comprende taxanos (Payne 2003), en especial unos altamente potentes y aquellos que contienen grupos tiol o disulfuro. Los taxanos son venenos del huso 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 lo que se desvela en el presente documento son, por ejemplo, los que se desvelan en las Patentes de Estados Unidos 6.436.931; 6.340.701; 6.706.708 y las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos 20040087649; 20040024049 y 20030004210. Se desvelan otros taxanos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.002.023, Patente de Estados Unidos 5.998.656, Patente de Estados Unidos 5.892.063, Patente de Estados Unidos 5.763.477, Patente de

Estados Unidos 5.705.508, Patente de Estados Unidos 5.703.247 y Patente de Estados Unidos 5.367.086. Como la persona experta en la materia apreciará, los taxanos PEGilados tales como los unos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.596.757, también están dentro del alcance de lo que se desvela en el presente documento.

5 La presente invención incluye también moléculas efectoras adicionales que afectan al ADN, más en particular, 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.

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

15 CC-1065 representa un antibiótico antitumoral potente aislado de cultivos de *Streptomyces zelensis* y se ha mostrado que es excepcionalmente citotóxico *in vitro* (Patente de Estados Unidos 4.169.888). Dentro del alcance de la presente divulgación por ejemplo están los análogos CC-1065 o derivados descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.475.092, 5.585.499 y 5.739.350. Como la persona experta en la materia apreciará fácilmente, los análogos de CC-1065 o derivados modificados como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.846.545 y los profármacos de análogos o derivados de CC-1065 como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.756.397 también están dentro del alcance de la presente divulgación. En ciertos ejemplos, los análogos o derivados de CC-1065 pueden, por ejemplo, sintetizarse como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.534.660.

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

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

35 Una subclase adicional de moléculas efectoras que afectan al 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 desaminasa (pentostatina) o inhibidor de ribonucleótido reductasa/halogenado (cladribina, clofarabina), tiopurina y tiazofurina. Algunos antimetabolitos adicionales incluyen un inhibidor de ADN polimerasa (citarabina), inhibidor de ribonucleótido reductasa (gemcitabina) y agentes hipometilantes (azacitidina, decitabina) e inhibidores de ribonucleótido reductasa. Más generalmente se incluyen también sustancias de reticulado de ADN tales como cisplatina.

45 Una molécula efectora de acuerdo con la presente divulgación pueden ser antibióticos antitumorales, definidos como moléculas efectoras que modifican o dañan el ADN incluyendo antibióticos de enediina tales como calicheamicina que incluyen, por ejemplo, gamma 11,N-acetil calicheamicina y otros derivados de calicheamicina. La calicheamicina se une de una manera específica de secuencia al surco menor del ADN, se somete a redistribución y expone radicales libres, llevando a ruptura del ADN bicatenario, resultando en apoptosis y muerte celular. Un ejemplo de una molécula efectora de calicheamicina que puede usarse en el contexto de la presente invención se describe en la Patente de Estados Unidos 5.053.394. Este compuesto se usa en inmunoconjugados con los anticuerpos monoclonales publicados como gemtuzuma, ozogamicina e inotuzumab ozogamicina.

50 Un subgrupo de enediina comprende las cromoproteínas esperamicina y neocarzinostatina. En particular, Trabectedina, que también se categoriza como agente que daña el ADN, denominados antibióticos antitumorales. La trabectedina provoca la escisión de la estructura principal del ADN, 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.

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

65 También adecuadas como moléculas efectoras son sustancias que afectan al metabolismo celular, tales como

5 sustancias usadas para terapia fotodinámica o de radiación, incluyendo, pero no limitadas a, derivados de porfirina, por ejemplo ácido δ -Aminolevulínico. Efaproxiral representa un radiosensibilizante, que aumenta los niveles de oxígeno disminuyendo la afinidad de oxígeno-hemoglobina. Se incluyen además retinoides (de primera, segunda y tercera generación), en particular Tretinoína (ATRA), todos los ácidos trans retinoicos, que se usan para tratar la leucemia promielocítica aguda (APML) 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 la activación de genes de supresión de tumores. En la actualidad, se usan para tratar cáncer de piel y trastornos inflamatorios de la piel.

10 En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden afectar a las rutas de señalización, tales como pero no limitadas a, señalización de calcio. Los ejemplos son trióxido de arsénico o cloruro de trimetilestaño, el último de los cuales es un compuesto de organoestaño altamente tóxico.

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

20 Otra clase de molécula efectora puede incluir sustancias, o más particularmente proteínas que interfieren con rutas de señalización apoptóticas, incluyendo, pero no limitadas a, oligonucleótidos antisentido, más particularmente oligodesoxinucleótidos tales como Oblimersen (INN, marca Genasense; también conocido como Augmerosen y oligodesoxinucleótido antisentido bcl-2 G3139) que es un oligodesoxiribonucleótido antisentido actualmente estudiados como un tratamiento posible para diversos 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. Una clase adicional de sustancias inductoras de apoptosis 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.

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

Una molécula efectora de fármaco de acuerdo con la presente descripción también puede ser un fármaco antiprotosozo tal como Miltefosina.

35 En otro ejemplo las moléculas efectoras pueden representar polifenoles de plantas, tales como pero no limitadas a, psoralenos y sus hidroxil metabolitos.

40 Los polifenoles de plantas tales como flavonoides, taninos (proantocianidinas), estilbenoides, curcuminoides y lignanos tienen una de las actividades antitumorales anteriormente mencionadas (por ejemplo que inducen apoptosis, detención del ciclo celular) o actividad adicional tales como secuestradores de radicales libres, actividad quelante de metales, actividad de interferencia de receptor de estrógeno, antioxidante, que interfiere con enzimas que metabolizan los fármacos) son también moléculas efectoras posibles. Más específicamente, los psoralenos y sus metabolitos hidroxil que son capaces de intercalarse en ADN que actúan como quelantes de metal que tienen propiedades antioxidantes y citoprotectoras son moléculas efectoras preferidas. Particularmente se prefieren reservatol y derivados polihidroxilados y flavonoides, tales como catequinas y epicatequinas, más específicamente 3-O galato de epigallocatequina, que pueden actuar como antioxidantes.

Una amplia clasificación de moléculas efectoras de acuerdo con su mecanismo también es posible:

50 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)

55 1) Antimitóticos, o moléculas que afectan a los microtúbulos (agentes de unión 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)

60 2) que afectan a la replicación de ADN

a) Agentes de intercalado tales como Antraciclina (Daunorubicina, valrubicina, Doxorubicina, Aclarubicina, Epirubicina, Idarubicina, Amrubicina, pirarubicina, Zorubicina) y Antracendionas, tales como sustancias derivadas de Estreptomycinas (Actinomycin, Mitomicina, Bleomicina, Dactinomycin) o Amsacrina

65 b) Agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, Nitrosoureas, Alquilsulfonatos, Aziridinas, Hidrazinas (Procarbazina), Triazenos, Epóxidos, Etilen 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 camptoteca (Belotecano, Topotecano)
- e) Inhibidores específicos de topoisomerasa II tales como Podofilotoxina y derivados (Etopósido, Tenipósido)
- 5 f) Antimetabolitos que afectan a la síntesis de ADN/ARN por interferencia con
- ácido fólico tales como inhibidores de Dihidrofolato reductasa (por ejemplo Aminopterina, Metotrexato), inhibidor de timidilato sintasa
 - purina tales como inhibidor de adenosina desaminasa (Pentostatin), inhibidor de ribonucleótido reductasa/halogenado (Cladribina, Clofarabina), Tiopurina, Tiazofurina
 - 10 - Pirimidina tal como inhibidor de ADN Polimerasa (Citarabina), inhibidor de ribonucleótido reductasa (Gemcitabina), agente hipometalante (Azacitidina, Decitabina)
 - deoxiribonucleótido tal como inhibidor de ribonucleótido reductasa Hidroxicarbamid
- 15 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, antibióticos adicionales tales como CC-1065 y subclases de antibióticos tales como calicheamicina enediina derivada de bacterias o cromoproteína enediina Esperamicina (agentes de corte y empalme 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)
- 20 4) toxinas que afectan al metabolismo celular por ejemplo inhibidores HSP90, Lonidamida (inhibidores tanto de respiración como glucólisis que lleva a una disminución en el ATP celular)
- 25 a) Inhibidores de enzimas por ejemplo Olaprib (inhibidor PARP), inhibidores CDK (Alvocidib), Proteasoma (Bortezomib), inhibidores de Proteína quinasa, Masoprocol (inhibidor de Lipoxienasa)
- b) Antagonistas de receptores tales como tutina (antagonista del receptor de Glicina (toxina de planta), Atrasentan, receptor del retinoide X (Bexaroteno), esteroides sexuales tales como testolactona, sustancias que interfieren con el receptor de estrógeno
- 30 c) Fotosensibilizantes u otros compuestos empleados para terapia fotodinámica (Porfirmer Sodio), derivados de Porphirina por ejemplo ácido δ-Aminolevulínico)
- d) Radiosensibilizante tal como Efaproxiral que aumenta los niveles de oxígeno al disminuir la afinidad de hemoglobina-oxígeno
- 35 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 a 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 cutáneas, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin o linfoma folicular)
- 40 6) Que afectan a los mecanismos de resistencia a fármacos tales como compuestos heteroaromáticos bicíclicos, que inhiben P-glucoproteína
- 7) Sustancias que inducen señalización/mecanismos apoptóticos que incluyen proteínas pero también oligodesoxinucleótidos antisentido tales como Oblimersen (marca Genasense)
- 45 8) Enzimas tales como Asparaginasa
- 9) Fármacos antiprotozoos tales como Miltefosina
- 10) Polifenoles de plantas tales como Flavonoides, Taninos (Proantocianidinas), Estilbenoides, curcuminoides y lignanos que tienen una de las actividades antitumorales anteriormente mencionadas (por ejemplo que inducen apoptosis, detención de ciclo celular) o actividad adicional tal como secuestro de radicales libres, actividad quelante de metales, actividad de interferencia de receptor de estrógeno, antioxidante, que interfiere con enzimas que metabolizan fármacos). Más específicamente soralenos y sus metabolitos hidroxilados, reseravatol y derivados polihidroxilados, Flavonoides, tales como Catequizas y Epicatequinas, más específicamente 3-O galato epigallocatequinas
- 50 11) Sustancias naturales adicionales y derivados tales como Eotoxina A, toxina diftérica y derivados de los mismos, en donde los derivados pueden estar química o genéticamente modificados.

Las moléculas efectoras también pueden categorizarse de acuerdo con la clase de sustancia a la que pertenecen tales como compuestos inorgánicos, compuestos aromáticos, compuestos basados en metal, proteínas relacionadas con el 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-tumorales (por ejemplo antibióticos de enediina), micotoxinas, toxinas de invertebrados así como vertebrados, toxinas ambientales.

65 Un inmunocombinado de acuerdo con la presente invención comprende al menos un anticuerpo dirigido y una molécula efectora, como se define en las reivindicaciones. El inmunocombinado puede comprender moléculas

adicionales, por ejemplo, para estabilización. Para inmunoconjugados, el término "conjugado" en general se usa para definir la asociación funcional del agente dirigido a una o más moléculas efectoras y no se pretende que se refiera solamente a cualquier tipo de asociación funcional y particularmente no se limita a "conjugación" química. Siempre que el agente dirigido sea capaz de ligar al sitio diana y el efector fijado funcione suficientemente como se pretende, particularmente cuando se administra al sitio diana, será adecuado cualquier modo de fijación. Los métodos de conjugación incluyen, pero no están limitados a, fijación directa de la molécula efectora al anticuerpo dirigido, con o sin modificación previa de la molécula efectora y/o el anticuerpo dirigido o fijación a través de enlazadores. Los enlazadores pueden categorizarse funcionalmente, por ejemplo, en ácidos lábiles, enlazadores fotolábiles, enlazadores de ruptura por enzimas, tales como enlazadores que pueden descomponerse por peptidasas. Se prefieren enlazadores susceptibles a escisión en muchas realizaciones de la invención. Tales enlazadores escindibles pueden escindirse en condiciones presentes en el ambiente celular, en particular un ambiente intracelular y que no tienen efecto nocivo en el fármaco liberado tras la descomposición. Los pH bajos tales como pH de 4 a 5, como existen en ciertos departamentos intracelulares, escindirán los enlazadores lábiles a ácido, mientras que los enlazadores fotolábiles pueden escindirse, por ejemplo, por luz infrarroja. Sin embargo, se prefieren los enlazadores que se escinden por/en condiciones fisiológicas presentes en la mayoría de las células y se denominan en el presente documento enlazadores fisiológicamente escindibles. En consecuencia, los enlazadores disulfuro se prefieren en muchas realizaciones de la invención. Estos enlazadores son escindibles a través de intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Los enlazadores disulfuro heterobifuncionales incluyen, pero se limitan 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 su uso en la composición de la invención son SPP, SMCC y SPDB.

Otros enlazadores adecuados pueden incluir enlaces "no escindibles", 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. Las 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, que de acuerdo con la invención es al menos un maitaisinoide, puede conjugarse al anticuerpo dirigido mediante un proceso en dos etapas de reacción, incluyendo 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 maitaisinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, puede añadirse al anticuerpo modificado, resultando en el desplazamiento de los grupos tiopiridilo en el anticuerpo modificado, y la producción de conjugado maitaisinoide citotóxico enlazado a disulfuro/anticuerpo (Patente de Estados Unidos 5.208.020). Sin embargo, los procesos de conjugación en una sola etapa tales como el uno desvelado en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20030055226 de 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 fijan a un anticuerpo dirigido. Como se analiza en el presente documento en otra parte, la naturaleza de los enlazadores empleados puede influenciar el exterminio por actividad inespecífica (Kovtun et al., 2006). Véase también el análisis de la Figura 13. Véanse también las Patentes Números 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. N.º 2005/0169933 para el método para preparar inmunoconjugados.

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

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

Una asociación funcional en forma de fijación con o sin un enlazador se denomina en el presente documento "fijación funcional".

Un inmunoconjugado que **consiste esencialmente en** ciertos componentes significa en el contexto de la presente invención que el anticuerpo/inmunoconjugado consiste en los componentes especificados y cualquier material o componente adicionales que no afecten materialmente a las características básicas del anticuerpo.

La Figura 9 muestra en (C) y (D) las diferencias en homogeneidad de marcaje como diana/unión entre inmunoconjugados que comprenden anticuerpo murino BB4 (BB4-SPP-DM1; Figura 9C) y el anticuerpo dirigido de ingeniería nBT062 (nBT062-SPP-DM1; Figura 9D) basado en el mismo. Como puede verse a partir de estas

gráficas, los resultados obtenidos con el inmunoconjugado que comprende el anticuerpo dirigido de ingeniería son sustancialmente más homogéneos que aquellos obtenidos con los inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo murino. Esto es particularmente notable ya que la región de unión a anticuerpo de BB4 no se modificó en nBT062. De esta manera, el inmunoconjugado que comprende la región de unión a anticuerpo del anticuerpo murino, pero no otras partes del anticuerpo murino, mostró propiedades que exceden por mucho los resultados que hubiera esperado la persona experta en la materia.

Algunos de los inmunoconjugados para su uso de acuerdo con la presente invención tienen una molécula efectora que está estéricamente impedida y contiene un enlazador escindible (**HICL** - del inglés par inmunoconjugado impedido, enlazador escindible). Una contraparte no impedida (**UI**: inmunoconjugado no impedido) de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido de ingeniería contra CD138 enlazado a una molécula efectora mediante un enlazador escindible (**CL**) y se describe en el presente documento 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. Algunos ejemplos de un par de HICL/UICL son BT062 y nBT062-SPP-DM1. Una contraparte no impedida de un inmunoconjugado tal que comprende un enlazador no escindible (**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 escindible. Para BT062 (nBT062-SPDB-DM4), nBT062-SMCC-DM1 constituirá un ejemplo de esta contraparte no impedida que comprende un enlazador no escindible (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 rendimiento cuya actividad se establece como el 100 %. Por ejemplo, si la actividad del inmunoconjugado de más alto rendimiento, digamos BT062, provocará un retraso en el crecimiento de tumor (TGD, por sus siglas en inglés) 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:

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

más genéricamente:

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

La **Tabla 6** proporciona ejemplos adecuados a partir de los resultados ilustrados en la Figura 11B:

Tabla 6: 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)	% de 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 proporcionado en la Tabla 6, BT062 proporciona un crecimiento de una actividad inhibidora de tumor que excede la de su contraparte no impedida (nBT062-SPP-DM1) en 60 %, y un crecimiento de actividad inhibidora de tumor que excede la de su inmunoconjugado de contraparte no impedida que comprende un enlazador no escindible (nBT062-SMCC-DM1) en 44 %.

Como se discutió anteriormente, ciertos fármacos tales como maitansinoides, aunque eficaces, son altamente tóxicos, destruyendo en su forma nativa, es decir no conjugada, las células no selectivamente. El enlace del maitansinoide citotóxico a un anticuerpo puede mantener al fármaco inactivo hasta que alcanza la célula diana (Lambert 2005). Varios conjugados anticuerpos-maitansinoide se han sometido a 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 microcíticas y cánceres neuroendocrinos). En estos estudios se administró IMG901 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 y 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 CD56 positivo. En un estudio en Fase I, la administración de IMG901 en 2 semanas consecutivas cada 3 semanas a un paciente con mieloma múltiple CD56 positivo quien ha fallado tratamientos de mieloma múltiple establecidos, ha mostrado evidencia preliminar de seguridad así como actividad clínica. Se informó que dieciocho pacientes que han recibido IMG901 (3 pacientes cada uno a 40, 60, 75, 90, 112, y 140 mg/m²/semana). Resultados PK preliminares se informó que indican una relación aproximadamente lineal entre dosis y concentración en suero máxima observada. Se ha observado actividad clínica interesante con un perfil de seguridad tolerable. Una respuesta menor (MR) 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 también se investiga en un estudio Fase I en tumores sólidos. El inmunoconjugado se administra diariamente durante 3 días cada 3 semanas. Se ha observado actividad clínica preliminar en pacientes con cáncer pulmonar de células microcíticas, carcinoma de células Merkel y otros tumores sólidos. Continúa la escala de dosis.

MLN2704 (huJ591-DM1) se investiga para tratar cáncer de próstata resistente a castración (Milowsky et al., 2006, Brand y Tolcher 2006). Una prueba Fase I de MLN2704 en pacientes con cáncer de próstata resistente a castración metastásico progresivo investigan el perfil de seguridad, farmacocinética, inmunogenicidad y actividad antitumoral de MLN2704 cuando se administra una vez cada cuatro semanas. Los resultados demuestran que las dosis terapéuticas de MLN2704 pueden administrarse de forma segura en una base repetitiva (Galsky et al., 2008). Se realizaron pruebas en paralelo con otro inmunoconjugado-DM1, es decir bivatuzumab mertansina que marca como diana a 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 seria 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 solo se expresa en diversas células de cáncer, sino también en tejido de piel normal y asemeja en este aspecto a CD138 que también se expresa no solo en células de cáncer sino en tejido de piel normal. De manera sorprendente, se encontró que BT062 muestra efectividad clínica sin efectos secundarios intolerables como toxicidad en la piel como se encuentra en bivatuzumab mertansina. Véase la **Figura 23**, que muestra que repetidas dosis sencillas de BT062 de hasta 160 mg/m² llevan a al menos enfermedad estable con efectos secundarios manejables. Los resultados ilustrados en la **Figura 23** también muestran que 10 dosis sencillas repetidas de 20 mg/m² (tratamiento durante 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 sola dosis sencilla de 200 mg/m², seguido por 6 dosis sencillas repetidas de 160 mg/m² (ergo, una dosis total de 1160 mg/m²) fueron bien toleradas (pacientes asociados con 003-005 y 002-012, y 002-011 todavía están en proceso de tratamiento).

CD138 también se expresa en células de sangre normal y otras células, tales como células del epitelio, cuya destrucción llevaría a efectos secundarios intolerables. Independientemente de esto, no se encontró toxicidad limitante de dosis hacia células no cancerosas/no tumorales que expresan CD138 de cualquier tipo en los regímenes de tratamiento ilustrados en la Figura 23 hasta 120 mg/m², mientras que la dosis tolerable máxima (MTD) era en este estudio determinada como 160 mg/m² y la dosis administrada máxima (MAD) se determinó que es 200 mg/m². Dosis entre 160 mg/m² y 200 mg/m² no se probaron. Dosis superiores en general no se suministraron en vista de las toxicidades limitantes de dosis (DLT) a 200 mg/m². Sin embargo, se observó que la dosis de DLT todavía era aceptable cuando se administra con dosis menores subsecuentes tales como dosis de 160 mg/m². Una toxicidad clínicamente no significativa contra células no cancerosas/no tumorales que expresan CD138 (células no diana que expresan CD138) se denomina en el presente documento "toxicidad clínicamente aceptable" o "toxicidad tolerable" contra dichas células y el o los órganos respectivos. La cantidad respectiva de inmunoconjugado que se administra se denomina en el presente documento "cantidad tolerable". De esta manera, en una realización de la presente invención, el inmunoconjugado exhibe toxicidad clínicamente aceptable hacia estas células no diana que expresan CD138, en particular células del epitelio que expresan CD138, que no se detectan por BT062 en el modelo de xenoinjerto de ratón debido a especificidad de humano.

La toxicidad clínicamente aceptable incluye que se lleve a cabo una reacción adversa, hasta un nivel manejable o tolerable. Una **reacción adversa** se define como un efecto indeseable, razonablemente asociado al uso de un fármaco, aquí el inmunoconjugado, que puede ocurrir como parte de la acción farmacológica del fármaco o puede no ser pronosticable en su ocurrencia. Esta definición no incluye todos los eventos adversos observados durante uso de un fármaco, solo aquellos para los cuales hay cierta base para creer que hay una relación causal entre el fármaco y la ocurrencia del evento adverso. Las reacciones adversas pueden incluir signos y síntomas, cambios en parámetros de laboratorio y cambios en otras medidas de función crítica del cuerpo, tales como signos vitales y ECG.

Si una célula, tal como una célula no diana especialmente una célula no diana (célula no tumoral) que expresa CD138 se dice que es "**sustancialmente no afectada**" por la administración, en particular la administración de una cierta dosificación de un compuesto tal como un inmunoconjugado, significa que cualquier interacción que este compuesto ha tenido con la célula no diana resultó en ninguna o una reacción adversa tolerable/manejable.

Se realizan estudios de Fase I con la forma de inmunoconjugada de trastuzumab (T-DM1) para tratamiento de cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2 para investigar seguridad y farmacocinética de T-DM1 administrado semanalmente una vez cada 3 semanas. En ambos estudios AEs de grado ≥ 2 relacionado a T-DM1 ha sido infrecuente y manejable. Se han observado respuestas de tumor objetivas a dosis en o por debajo de MTD (Burris et al., 2006, Krop et al., 2007, Beeram et al., 2008, Holden et al., 2008). Se ha iniciado un estudio en Fase II que investiga T-DM1 en cáncer de mama metastásico HER2 positivo cuando se administra una vez cada 3 semanas (Beeram et al., 2008, Carter y Senter, 2008, Holden et al., 2008). Una prueba clínica en Fase III que evalúa T-DM1 para cáncer de mama metastásico HER2-positivo de segunda línea y pruebas clínicas en Fase II que evalúan T-DM1 para cáncer de mama metastásico HER2-positivo de primera, segunda y tercer líneas están en proceso. Se planea una prueba clínica en Fase Ib en combinación con pertuzumab para pacientes de cáncer de mama metastásico HER2-positivo quienes han progresado en tratamiento basado en Herceptina. Se han completado tres pruebas clínicas en fase I con cantuzumab mertansina, un conjugado DM1 del anticuerpo huC242 dirigido a 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).

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

Un análogo de cantuzumab mertansina, IMG242 (huC242-DM4), se investigó en un estudio en fase I en sujetos con cáncer que expresan CanAg (Tolcher et al., 2006). Los sujetos recibieron una única infusión IV de IMG242 una vez cada 3 semanas con una dosis que varía de 18 a 297 mg/m². Se experimentó la toxicidad limitante de dosis 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). Basándose en los primeros resultados de seguridad del estudio en Fase I, se inició un estudio en 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. Basándose en la seguridad y completos análisis clínicos farmacocinéticos (PK)/farmacodinámicos (PD), el estudio en Fase II se dirigió a 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 en fase I con anticuerpo huMy9-6 conjugado a DM4 (AVE9633) también se realizó para el 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. No se observaron mielosupresión asociada ni respuestas en un estudio de una sola dosis (Giles et al., 2006). Un segundo estudio en 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 y muestra 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 a pruebas clínicas de Fase I.

También, se conoce de otros inmunoconjugados tales como Mylotarg que marca CD33 como diana, que la actividad del inmunoconjugado puede no ser suficiente para tratar pacientes a bajas dosis. Este problema se ha aliviado, por ejemplo, mediante la administración de factor de estímulo de colonia de granulocitos humanos recombinantes (rhG-CSF) 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 mostraron toxicidad tolerable contra células no cancerosas que expresan CD138 a diferentes dosis de enfermedad estable, en especial a dosis de hasta 160 mg/m².

El inmunoconjugado descrito en el presente documento puede administrarse en combinación con agentes citotóxicos. Estas combinaciones se denominan en el presente documento combinaciones anticáncer.

Actualmente, muchas combinaciones de fármacos en particular anti-mieloma se investigan en pruebas clínicas. El propósito del uso de una combinación es en general para mejorar la eficacia, 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 bien una combinación de los mismos. Se mostró que usar una dosis baja, por ejemplo, de lenalidomida más una dosis baja de dexametasona redujo la toxicidad (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 del proteasoma 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 del 16 % y una tasa de respuesta total del 89 % (Mateos et al., 2006).

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

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

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

15 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).

20 Además, lenalidomida, un fármaco inmunomodulador, usado en combinación con dexametasona, resultó en un tiempo prolongado a progresión de tumor y aumentó la supervivencia en comparación con dexametasona sola (Weber et al., 2006). También se ha estudiado lenalidomida combinada con dexametasona en pacientes recientemente diagnosticados (Rajkumar et al., 2005) así como la combinación con melfalan/prednisona (RMP) (Palumbo et al., 2006).

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

30 En el presente contexto, una meta de emplear combinaciones es una reducción en las dosis efectivas del inmunoconjugado, disminuyendo sus efectos secundarios y abriendo nuevas ventanas terapéuticas con efectos secundarios aceptables. Otra meta es reducir la dosis eficaz de agentes citotóxicos previamente empleados tales como VELCADE o lenalidomida y preferentemente reducir los efectos secundarios de estos agentes. Similarmente, las consecuencias Positivas de dosificación incluyen, pero no están limitados a, prolongación de tratamiento, dosis más altas, otros programas de aplicación, respuesta mejor y más sostenida al tratamiento.

35 Los 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 descritos en el presente documento.

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

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

50 La expresión "agentes citotóxicos" también comprende **fármacos inmunomoduladores (ImiDs, por sus siglas en inglés)** tales como talidomida (o análogos), lenalidomida (CC-5013), pomalidomida, actimid, que se usan para terapia de mieloma en vista de sus propiedades inmunomoduladoras pleiotrópicas. Comúnmente exhiben actividad anti-inflamatoria por inhibición de la producción de 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).

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

60 Algunos agentes citotóxicos potentes adicionales incluyen etopósido, que inhibe la enzima topoisomerasa II, citarabina, que tras la conversión daña al 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, los agentes inhibidores de microtúbulos tales como alcaloides vinca, taxanos (como se describió anteriormente en el contexto de moléculas efectoras) también pueden servir como agentes citotóxicos de acuerdo con la presente invención.

65 También se incluye en la definición el inhibidor quinasa tales como sorafenib o inhibidores de HDAC (histona

desacetilasa) tales como romidepsina así como agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimulantes, agentes inmunosupresores, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de proteína tirosina quinasa (PTK).

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

- 10 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 la supervivencia de células de mieloma en diversas formas y de inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

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

Se esperaría que una regulación negativa de CD138 provoque una unión reducida de cualquier agente dirigido a CD138, tal como BT062, a células diana.

- 25 Los inhibidores del proteasoma pueden dividirse en subgrupos adicionales:

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

- 30 b) inhibidores sintéticos (que comprenden aldehídos péptido modificados, estructuras alfa, beta epoxicetona, vinil sulfonas, residuos de ácido bórico, pinacolesteres. Un inhibidor proteasómico preferido de la presente invención es bortezomib (PS 341; VELCADE, véase el análisis 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 inmunocombinado 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 se afecta tanto por DM4 como bortezomib. De acuerdo con esto, la combinación de un inmunocombinado que comprende un agente anti-mitótico, y un inhibidor proteasómico que exhibe las características de bortezomib, no está conforme con las guías generales establecidas previamente para obtener efectos sinérgicos (Takimoto et al, 2009).

- 45 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 el crecimiento celular de mieloma y la supervivencia por acción en el microambiente óseo. Sin desear quedar limitado a teoría o modo de acción específicos, VELCADE interrumpe de esta manera procesos celulares normales, resultando en la inhibición del proteasoma que promueve la apoptosis.

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

- 55 Las sustancias para el tratamiento, que pueden usarse en combinación con BT062 también incluyen agentes inmunomoduladores (por ejemplo talidomida y lenalidomida, y pomalidomida), inhibidores del 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.

- 60 La expresión "en combinación con" no se limita a la administración exactamente al mismo tiempo. Por el contrario, el término abarca la administración del inmunocombinado 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, actividad aumentada, efectos secundarios disminuidos) que se aumenta en comparación con el tratamiento con solo cualquier inmunocombinado o por ejemplo el otro agente o agentes. Se prefiere que el inmunocombinado y el otro agente o agentes actúen de forma aditiva, y en especial se prefiere que actúen de forma sinérgica. Tales moléculas se proporcionan adecuadamente en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. El practicante médico

experto en la materia puede determinar empíricamente o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como las sincronizaciones y métodos de administración apropiados. Como se emplea en el contexto de la presente invención "co-administración" se refiere a la administración al mismo tiempo que el inmunoconjugado, a menudo en forma de dosificación combinada.

5 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 cantidad de factores que se analizan adicionalmente a continuación.

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

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

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

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

La relación (r), cuando está por encima 1, también se denomina "**RELACIÓN DE SINERGIA**".

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

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

25 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.

Selección de compañeros de combinación de fármacos

35 Se ha desarrollado un conjunto de directrices para el diseño de regímenes de quimioterapia de combinación (Takimoto, 2006). Cumplir con estas directrices aumentará generalmente las posibilidades de que una combinación particular logre al menos uno de las tres ventajas teóricas más importantes de la quimioterapia de combinación sobre la terapia de un solo agente:

- 40 1.) Maximizar el exterminio celular reduciendo al mínimo las toxicidades del hospedador usando agentes con toxicidades limitantes de dosis sin interferencia;
- 45 2.) Aumentar 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.

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

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

Además, los fármacos deberán administrarse a su dosis y programa óptimos (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).

65 Los efectos sinérgicos o 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 uniéndose entre

sí. Además, un componente de una combinación anticáncer puede interferir con el modo de acción de otro componente. Por ejemplo: Lenalidomida regula negativamente los receptores de adhesión celular tales como CD138, que es la diana del inmunoconjugado de la presente invención (Quach et al., 2010). El inhibidor del proteasoma bortezomib provoca detención 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 una 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 la bibliografía tal como el Manual de Referencia para Médicos (PDR = Physician's Desk Reference). El PDR describe dosificaciones de los agentes que se han empleado en tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos agentes citotóxicos que son eficaces dependerá del cáncer en particular que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares al médico experto en la materia y pueden ser determinados por el médico. La edición 2006 del Physician's Desk Reference (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 experta en la materia puede revisar el PDR, usando 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 comprehensivo de acuerdo con a) Fabricante b) Productos (por compañía o nombre de fármaco con marca comercial) c) Índice de categoría (por ejemplo, "inhibidores del proteasoma", "agentes alquilantes de ADN", "melfalan" etc.) d) Índice genérico/químico (nombre de fármacos comunes sin marca comercial).

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 Contraindicaciones d) Investigación de prueba, efectos secundarios, advertencias.

Como apreciará la persona experta 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 de aminoácidos 99 a 111 de SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los restos de aminoácidos 89 a 97 de SEQ ID NO: 2, respectivamente de la región de unión a antígeno (ABR). Ventajosamente, las regiones variables de cadena pesada CDR1 y CDR2 que comprenden los restos de 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 los restos de 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.

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", en sí misma, 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). Aunque existe una cantidad de métodos para medir identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por las personas expertas (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

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

Si la secuencia de aminoácidos es al menos el 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 las mismas, puede determinarse de forma convencional utilizando conocidos programas de ordenador tales como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias.

Cuando se usan DNAsis, ESEE, BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia en el contexto de 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 un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

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

10 Como se analizó anteriormente, BT062 es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo nBT062 quimérico dirigido a CD138 que se fija mediante un enlazador, aquí SPDB, al derivado maitansinoide citostático DM4. Una representación química de BT062 se proporciona en las **Figuras 1 y 2**. Los inmunoconjugados 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 inmunoconjugado que comprende nBT062, SMCC (un enlazador "no escindible" que contiene un enlace tioéster) y DM1 como un efector. De forma más genérica, un
15 inmunoconjugado 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 en el presente documento (véase también la Publicación de Patente de EE.UU. 20090232810).

20 En una realización, BT062 se une a células de mieloma múltiple positivas a CD138. Una vez que la célula diana internaliza y/o libera el inmunoconjugado, se libera DM4 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, por sus siglas en inglés), 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.

25 Los datos de estudios no clínicos que investigan la citotoxicidad de BT062 en células de mieloma múltiple y modelos de animales analizados en el presente documento demuestran que BT062 tiene actividad antimieloma altamente significativa a dosis que son bien toleradas en un modelo murino.

30 Se realiza un estudio de una sola dosis repetida, con escala de dosis, de etiqueta abierta de fase I en pacientes con mieloma múltiple de relapso o de relapso/refractario.

35 Los inmunoconjugados desvelados en el presente documento pueden administrarse por cualquier ruta, incluyendo en forma intravenosa, parenteral, oral, intramuscular, intratecal o como un aerosol. El modo de administración dependerá del efecto deseado. Una persona experta fácilmente sabrá la mejor ruta de administración para un tratamiento particular en el contexto de la presente invención. La dosificación apropiada dependerá de la ruta de administración y el tratamiento indicado y puede determinarse fácilmente por una persona experta en vista de los protocolos de tratamiento actuales.

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

50 Las combinaciones anticáncer de la presente invención pueden estar preferentemente en forma de composiciones farmacéuticas o bien en forma de kits que comprenden los componentes de la combinación anticáncer en diferentes recipientes. Los componentes del kit se administran habitualmente en combinación entre sí, a menudo se co-administran ya sea en una forma de dosis combinada o en formas de dosificación 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.

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

microesferas y macroesferas).

Para administración parenteral, el inmunoconjugado y/o agente citotóxico pueden disolverse en un vehículo farmacéutico y administrarse bien como una solución o una suspensión. Son ilustrativos de vehículos adecuados
 5 agua, solución salina, solución amortiguada con fosfato (PBS), soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol, o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El vehículo también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, amortiguadores y similares. Cuando el agente dirigido en un conjugado y/o inmunoconjugado y/o agente citotóxico se administran en forma intracerebroventricularl o intratecal, también puede disolverse en fluido cerebroespinal.

10 Las dosificaciones administradas a un sujeto pueden especificarse como cantidad, por área superficial del sujeto (que incluyen humanos así como animales no-humanos). La dosis puede administrarse a dicho sujeto en cantidades preferentemente, pero no de forma exclusiva de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m²,
 15 incluyendo aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 120 mg/m², aproximadamente 140 mg/m², aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 160 mg/m² and aproximadamente 200 mg/m². Los inmunoconjugados se administran adecuadamente de una vez o sobre una serie de tratamientos. En un régimen de múltiples dosis estas cantidades pueden administrarse una vez al día, una vez a la semana o una vez cada dos semanas. Las dosis de carga con una sola dosis alta o en forma alterna, menores dosis que se administran brevemente una tras la otra, seguidas por dosis sincronizadas a más largos intervalos, se prefieren. 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 segundo y/o cualquier tratamiento posterior de manera tal que la dosis previa sea metabolizada en forma substancial, pero la cantidad de inmunoconjugado presente en el sistema del sujeto todavía inhibe, retrasa y/o evita el crecimiento de un tumor. Un régimen ejemplar de "dosis única repetida" comprende administrar dosis de inmunoconjugado de aproximadamente 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 o 200 mg/m² una vez cada tres semanas. Alternativamente, una dosis inicial alta de por ejemplo 160 mg/m² puede seguirse por una dosis de mantenimiento de una, dos o cada tres semanas, por ejemplo de aproximadamente 20 mg/m². Otras combinaciones pueden evaluarse fácilmente por la persona experta en la materia. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El avance de esta
 20 terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. Las dosificaciones pueden variar, entre otras, dependiendo de si se administran 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 concomitante del paciente, la etapa de enfermedad ante primer tratamiento y respuesta al agente dirigido/inmunoconjugado, los efectos secundarios experimentados por el paciente y la
 25 discreción del médico a cargo.

La presente invención, en una realización, se dirige a un régimen de administración de dosis baja con rápida eliminación de plasma, y en otra realización, a un régimen de administración de baja dosis sin rápida eliminación de plasma para administración de inmunoconjugados como se establece en el presente documento. El primer régimen
 40 proporciona generalmente menos que 160 mg/m², preferentemente no más que aproximadamente 120 mg/m², no más que aproximadamente 100 mg/m², no más que aproximadamente 80 mg/m², incluyendo no más que aproximadamente 40 mg/m², más preferentemente no más que aproximadamente 20 mg/m², aún más que preferentemente no más que aproximadamente 10 mg/m² en un intervalo determinado de tres semanas (ciclo). El intervalo de 10 mg/m² a 120 mg/m² se traduce en una dosis diaria promedio de aproximadamente 475 µg/m² a
 45 aproximadamente 5,71 mg/m², o una dosis semanal promedio de aproximadamente 3,33 mg/m² a aproximadamente 40 mg/m². De esta manera, las dosis diarias promedio de aproximadamente 400 µg/m² a aproximadamente 5,71 mg/m², incluyendo aproximadamente 500 µg/m², aproximadamente 1 mg/m², aproximadamente 2 mg/m² y aproximadamente 3 mg/m², 4 mg/m², 5 mg/m² son parte de la presente invención y así son dosis semanales promedio de aproximadamente 3 mg/m² a aproximadamente 40 mg/m², incluyendo aproximadamente 5 mg/m²,
 50 aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 15 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 25 mg/m², 30 mg/m² o 35 mg/m². Estos esquemas de administración de baja dosis se asocian a la rápida eliminación de plasma en la fase de eliminación temprana, esto es, cualquier tiempo durante administración hasta dos horas después de que se complete 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 este periodo que preferentemente es menor a 55 %, menor que 50 %, menor que 40 %, o menor que 30 % de la cmax teórica.

Los regímenes de administración de baja dosis, a niveles superiores, están acompañados por eliminación de plasma menos rápida, esto es eliminaciones de plasma que exceden un 55 %, a menudo 60 %, 70 % 80 % o 90 % del valor cmax teórico, que se denominan en el presente documento moderada (igual o > 55 %, pero < 80 % del valor cmax teórico) o lenta eliminación de plasma (igual o >80 % del valor cmax teórico). A estas eliminaciones, se descubrió de manera sorprendente que a pesar de la concentración alta relativa del inmunoconjugado en el plasma, estos regímenes de administración todavía se asocian a toxicidades tolerables. Esto es 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,
 60 tales como el epitelio que no son la diana de ningún tratamiento, también tienen relativamente alto CD138 (análisis de inmunohistoquímica con el anticuerpo BB4 CD138 que mostró que la reactividad a este anticuerpo al epitelio
 65 de inmunohistoquímica con el anticuerpo BB4 CD138 que mostró que la reactividad a este anticuerpo al epitelio

corresponde con las células de plasma del paciente de MM (Publicación de Patente de EE.UU. 20070183971)). Los 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 de inmunohistoquímica se denominan en el presente documento a comparables niveles de expresión y son parte de la presente invención. En una realización alternativa, los niveles de expresión en células diana fueron actualmente consistentes inferiores al epitelio (por ejemplo, más uno o más dos o más tres para el epitelio). Algunas células diana de tumor muestran niveles de expresión mixtos, tales como algunas células tienen un nivel de expresión de más dos y algún un nivel de expresión de más tres. El promedio de un número representativo de células (tales como 100 células muestreadas en forma aleatoria) determinará si estas células objetivo o diana de tumor en cuestión caen bajo la definición de tener niveles de expresión comparables o inferiores al del epitelio. Estos regímenes de tratamiento en general están sobre 120 mg/m², pero inferiores a 200 mg/m² en un intervalo de tres semanas (ciclo) dado, que se traduce en una dosis diaria de aproximadamente 5,71 mg/m² a aproximadamente 9,52 mg/m² o una dosis semanal promedio de aproximadamente 40 mg/m² a aproximadamente 66,67 mg/m².

Con respecto al Paciente 001-006, fue notable que este paciente tuviera progresión de la enfermedad solo después de terminar el tratamiento, reflejando la efectividad de la administración de BT062 (Figura 25).

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 anterior. De esta manera, en el presente contexto, el nivel de inmunoc conjugado en la sangre de un sujeto puede considerarse 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 unión de la parte Fc al receptor neonatal FcRn está afectando la vida media. Al unirse a FcRn en endosomas, el anticuerpo se rescata de la degradación lisosómica y se recicla a la circulación, lo que prolonga la vida media. Para un IgG4, se ha informado una vida media de 15,6 (+/- 4,5) días (Alyanakian et al., 2003; Salfeld et al., 2007). En el estudio al que se hace referencia en el presente documento, se ha elegido una "dosis sencilla repetida" 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.

El avance de la terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. La dosificación puede variar entre otros, dependiendo de si se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, el transcurso 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 intervalo. Sin embargo, la ventaja probablemente más significativa es reducir el riesgo de efectos secundarios adversos. Mientras que los inmunoc conjugados 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 inmunoc conjugados todavía no están completamente libres de efectos secundarios. A pesar de un superior marcaje como diana, 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 inmunoc conjugado 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.

De manera sorprendente, se mostró que el inmunoc conjugado, fue eficaz a bajas dosis, mientras que exhibe toxicidades clínicamente aceptables. Las bajas dosis en el contexto de la presente invención se refieren a dosificaciones de hasta 200 mg/m². A dosis de hasta al menos 120 mg/m² pero en cualquier caso a dosis menores a 160 mg/m², el inmunoc conjugado probado también mostró rápida eliminación de plasma en sujetos humanos.

Las Tablas 7 y 8 muestran la eliminación observada.

Tabla 7: Concentraciones en plasma después del fin de infusión y valores promedio de cmax eficaces de BT062 de plasma que se obtienen de pacientes que han recibido una sola dosis/dosis única repetida de BT062 (primer y cuarto ciclo). Administración de dosis repetida en ciclos de 21 días. Los 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.

Dosificación de 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

5

Tabla 8: Valores promedio cmax eficaz de BT062 de plasma que se obtienen en pacientes que han recibido una sola dosis/dosis única 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. Los valores cmax se obtuvieron entre 0 y 2 horas posteriores a infusión. Cmax eficaz se indica en porcentaje de cmax teórica calculada.

10

Ciclos de administración: ciclo 1: día 1, ciclo 2: día 22; ciclo 3: día 43; ciclo 4: día 64 etc.

Dosificación BT062 (mg/m ²)	Nivel de plasma de BT062			(µg/ml) humano	
	cmax teórico	cmax eficaz (ciclo 1)	Por ciento de cmax teórico (n)	cmax eficaz (ciclo 4)	Por ciento 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 de acuerdo con los siguientes parámetros asumidos:

Área Superficial del Cuerpo de los Pacientes 1,9 m²
 Peso de Pacientes 70 Kg
 Pacientes 40 ml/kg

15

$$\frac{\text{(Dosis administrada x área superficial)/peso corporal}}{\text{Volumen de Plasma}}$$

20

Aunque la vida media de BT062 en plasma de los sujetos humanos tratados demostró ser significativamente menor que la vida media en plasma observada en monos macacos (días) y en plasma humano *ex vivo* (14 días), el inmunoconjugado todavía mostró eficacia en sujetos humanos, incluso a administraciones tan bajas como 20 mg/m². Este hecho sugiere una dirección de tumor acelerada y enlace de células de tumor, lo que resulta en una efectividad. Esta propiedad de los inmunoconjugados probablemente resulta del isotipo IgG4 del anticuerpo/molécula dirigida.

25

Como se observó anteriormente, una eliminación rápida inusual de plasma de pacientes MM tratados se observó en la fase de eliminación temprana (durante infusión y aproximadamente 0 a 2 horas posterior a infusión) seguido de una fase de eliminación terminal generalmente normal a niveles de dosis de hasta 120 mg/m², mientras que un perfil de eliminación más típico se observó para todos los 4 pacientes a las dosis de 160 mg/m² y 200 mg/m² (3 pacientes), aun cuando la eliminación todavía estuvo por debajo del valor cmax teórico. Además, en los regímenes de administración que mostraron rápida eliminación de plasma en la fase de eliminación temprana, (por ejemplo 20,

40, 80 y 120 mg/m²) no solo se observó rápida eliminación de plasma en la fase de eliminación temprana sino se observó una respuesta (disminuida de proteína M orina) incluyendo respuestas que se manifiestan en un decremento de proteína M de orina en más de 50 % después de **dosis sencillas repetidas** (Figura 24).

5 La **Figura 17** ilustra la rápida eliminación de 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 eliminación de plasma más cercana al valor teórico. Véase la **Figura 27** para eliminación de plasma que se observa a una dosis de 20 mg/m². La **Figura 18** compara el perfil de plasma de BT062 al de monos tratados a dosis comparables. La comparación aclara que la eliminación rápida de plasma a bajas dosis no puede deducirse de modelos de animales disponibles y parece ser específica para humanos. La **Figura 22** aclara que la rápida eliminación de plasma no puede atribuirse a un efecto amortiguador provocado por CD138 soluble. La **Figura 19** muestra los valores c_{max} medidos de BT062 en comparación con los valores c_{max} teóricos.

15 A dosis más altas, por ejemplo 160 mg/m², que sin embargo son relativamente bajas dosis en comparación con los esquemas de administración de otros inmunoconjugados, los perfiles de eliminación terminal fueron más cercanos a lo normal, esto es más cercanos a los valores c_{max} teóricos. Sin embargo, una rápida reducción de FLC en el suero puede observarse después de solo una administración sencilla, lo que se manifiesta por sí mismo en una respuesta parcial después de la 2^a, 3^a y 4^a administraciones (Figura 26).

20 De esta manera, en una realización, la invención se dirigen a un régimen de administración de baja dosis, tal como un régimen de dosis sencilla repetida, en donde se observa una respuesta preferentemente al menos una MR preferentemente VGPR, CR, sCR o PR.

25 La invención también se dirige a un régimen de tratamiento de baja dosis, tal como un régimen de administración de dosis sencilla repetida, en donde la enfermedad estable se logra sobre múltiples ciclos de tratamiento que duran más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más semanas.

Análogos y Derivados

30 Una persona experta en la materia de agentes terapéuticos, tales como agente citotóxicos, comprenderá fácilmente que cada uno de tales agentes descritos en el presente documento puede modificarse de manera tal que el compuesto resultante todavía retiene la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. La persona experta 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.

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

40 Materiales y Métodos

Construcción de Anticuerpo Quimérico (cB-B4: nBT062)

B-B4

45 Se usó en estos experimentos el anticuerpo murino B-B4 como se caracterizó previamente (Wijdenes *et al.*, Br J Haematol., 94 (1996), 318).

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

50 Se realizaron técnicas de ADN recombinante convencionales como se describe en detalle en libros de texto, por ejemplo en J. Sambrook; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 2^a Ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, o como se recomienda por instrucción del fabricante en el caso en donde se emplean kits. Se han llevado a cabo clonación por PCR y modificación de las regiones variables de ratón usando metodología de PCR convencional. Se han usado los cebadores indicados en la sección de resultados respectivos.

Expresión de cB-B4 / nBT062

60 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 se lavaron en PBS. Las células se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1x10⁷ células/ml. 700 µl de suspensión celular COS se transfirió a una cubeta Gene Pulser y se mezcló con ADN de vector de expresión de cadena ligera kappa y pesada (10 µg cada uno o 13 µg de Supervector). 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 los sobrenadantes de cultivo celular que

contiene anticuerpo.

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

- 5 Las 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 amortiguador 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 por una hora). Los pocillos se lavaron seis veces con amortiguador de lavado, antes de detección de anticuerpo
10 ligado con conjugado de peroxidasa de cadena ligera kappa antihumano cabra.

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

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

Ensayo de unión y competencia de cB-B4

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

Preparación de ARN y síntesis de ADNc

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

Clonación de ADNc de inmunoglobulina B-B4

- 30 El ADNc de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) se amplificó por PCR usando el cebador IgH MHV7 (5'-ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG-3') **[SEQ ID NO: 3]** al 0,02 % y el cebador de región constante IgG1 MHCG1 (5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3') **[SEQ ID NO: 4]**. Similarmente, la cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) se amplificó usando los tres cebadores diferentes de Igk MKV2 (5'-ATGGAGACAGACA-CACTCCTGCTATGGGTG-3') **[SEQ ID NO: 5]**, MKV4 (5'-ATGAGGGCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTCTTG-3') **[SEQ ID NO: 6]** y MKV9 (5'-ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') **[SEQ ID NO: 7]**, cada uno en combinación con el cebador MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3') **[SEQ ID NO: 8]**. Todos los productos de amplificación se ligaron directamente con el vector pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA)
40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Se seleccionaron las bacterias TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) transformadas con las construcciones de vector pCR2.1 ligado en placas de agar LB-ampicilina-Xgal. Los cultivos a pequeña escala se inocularon con colonias blancas sencillas, desarrollaron durante la noche y se aislaron plásmidos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
45

Determinación de secuencia de ADNc

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

- 55 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 V_k

- 60 La síntesis de 1^{era} hebra se realiza en tres reacciones independientes. Los productos de PCR generados usando los cebadores MKC y MKV2 (secuencias dadas anteriormente) se ligaron en vectores pCR2.1-TOPO de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los clones de cada conjunto independiente de reacciones RT-PCR se secuenciaron en ambas direcciones. La secuencia del producto cebado MKV2 fue altamente similar a transcripciones kappa estériles que se originan del compañero de fusión de mieloma tales 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.
65

Los productos de PCR que usan MKC con cebadores MKV4 y MKV9 fueron similares entre sí y difieren solamente

en las posiciones de oscilación dentro del cebador de secuencia líder.

Secuencia de ADN B-B4 VH

- 5 La síntesis de 1^{era} hebra se realiza en tres reacciones independientes y los productos de PCR se clonaron y secuenciaron a partir de cada producto de 1^{era} hebra. Se secuenciaron cinco clones a partir de cada 1^{era} hebra.

Construcción de vectores de expresión cB-B4 quiméricos

- 10 La construcción de los vectores de expresión quiméricos implica añadir una secuencia líder adecuada a VH y Vk, precedida de 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 única es la adenina (o menos preferentemente, una guanina) en la posición -3, en dirección 3' 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'-AGAGAAGCTT**GCCGCCACC**ATGATTGCCTCTG-CTCAGTTCTTGGTCTCC-3' [SEQ ID NO: 9]; el sitio de restricción está subrayado; secuencia Kozak ésta con negritas). Además, la construcción de los vectores de expresión quiméricos implica 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 *Hind*III. La secuencia donadora de combinación es importante para la conexión en marco correcta de la región variable a su región constante apropiada, de esta manera cortando el intrón V:C. El intrón kappa + CK se codifica en la construcción de expresión en dirección 5' de la secuencia la B-B4 Vk. Similarmente, gamma-4 CH se codifica en la construcción de expresión en dirección 5' de la secuencia B-B4 VH.

- 25 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 *Hind*III 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, se usaron los cebadores de oligonucleótidos BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEQ ID NO: 10] y BT04 (5'-CCACCGAACGTCCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3') [SEQ ID NO: 11] y se realizó la mutagénesis de acuerdo con el protocolo del kit de Mutagénesis Stratagene (La Jolla, CA) Quickchange.

35 Cebadores de quimerización de cadena Kappa

- La secuencia líder B-B4 Vk no ambigua, independiente de la secuencia de cebador de PCR, se alineó con las secuencias líder murinas en la base de datos de Kabat. La más cercana correspondencia para el líder B-B4 VH fue VK-10 ARS-A (Sanz *et al.*, PNAS, 84 (1987), 1085). Se predice que esta secuencia líder se corte correctamente por el algoritmo SignalP (Nielsen *et al.*, Protein Eng, 10 (1997); 1). Los cebadores CBB4Kfor (véase anteriormente) y g2258 (5'-CGCGGGATCCACTCACGTTTGGATTCCAGCTTGGTGCCTCC-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 *Hind*III y *Bam*HI, para clonar en el vector de expresión pKN100. El cebador directo, CBB4K introduce un sitio de restricción *Hind*III, 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 *Bam*HI. El fragmento resultante se clonó en los sitio de restricción *Hind*III/*Bam*HI de pKN100.

Cebadores de quimerización de cadena pesada

- 50 La secuencia líder B-B4 VH no ambigua, independiente de la secuencia de cebador de 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 predice que se corte correctamente por el algoritmo SignalP. Los cebadores cBB4Hfor (véase anteriormente) y g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTACTGAGGTTCC-3' [SEQ ID NO: 13]; El 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 *Hind*III y *Ap*al, para clonar en el vector de expresión pG4D200. El cebador directo cBBHFor introduce un sitio de restricción *Hind*III, 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 *Ap*al natural. El fragmento resultante se clonó en los sitio de restricción *Hind*III/*Ap*al de pG4D200, dando como resultado el vector pG4D200cBB4.

60 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, las células (0,7 ml a 10⁷ células/ml) se sometieron a electroporación con pG4D200cBB4 más pKN100cBB4 (10 µg de ADN cada uno) o sin ADN. Las células se colocaron en placa en 8 ml de medio de cultivo durante 4 días. Se repitió la electroporación siete veces.

Detección de anticuerpo quimérico

5 Se usó un ELISA en sándwich para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes de COS 7. Las células COS 7 transformadas de manera transitoria secretaron aproximadamente 6956 ng/ml de anticuerpo (datos no mostrados).

Actividad de unión de cB-B4

10 Para ensayar la actividad unión de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo COS 7, se ha usado el kit Diaclone sCD138, un ELISA en 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).

15 Las concentraciones de bio-B-B4 en este ensayo se han reducido a fin de obtener competición con bajas concentraciones de anticuerpo no etiquetado (la concentración de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo celular COS 7 fueron de otra forma muy bajas para obtener una competición suficiente). Los 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 purificó a partir de sobrenadantes de células COS 7 usando el kit Protein A ImmunoPure Plus (Pierce), de acuerdo con la recomendación del fabricante (datos no mostrados).

Determinación de K_D : Comparación nBT062/ BB4*Purificación de CD138 soluble*

30 El 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 amortiguador PBS a pH 7,4 sobre la columna y posteriormente se eluyó el antígeno CD138 con trietilamina 50 mM a pH 11 en fracciones de 2 ml. El CD138 eluido se neutralizó inmediatamente con 375 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 3 para evitar daños estructurales y/o funcionales.

Biotinilación de CD138

35 Se usó Sulfo-NHS-LC (Pierce) para etiquetar CD138. Las biotinas activadas por NHS reaccionaron eficientemente con grupos amino primarios como los restos de lisina en amortiguadores a pH 7-9 para formar enlaces amida estables.

40 Para biotinilación de CD138, 50 μ l de CD138 se desalifican usando columnas de centrifugado-desalificación de proteína (Pierce). El reactivo de biotinilación (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) se disolvió en H₂O desionizada enfriada en hielo a una concentración final de 0,5 mg/ml. El reactivo de biotinilación y la solución 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) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente mientras que el vial se agita suavemente. El reactivo de biotinilación sin unir se retiró usando columnas de desalificación de proteína.

Inmovilización de bCD138

50 El sensorchip (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) usado 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 caudal de 10 μ l/min por inyección manual.

55 La superficie del chip se acondicionó con tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1 M en NaOH 50 mM. Después se inyectó CD138 biotinilado durante 1 minuto.

Determinación de K_D de diferentes anticuerpos usando BIACORE

60 El soporte lógico del programa de BIACORE C usa mascarar predefinidas, 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 diseñado para llevar a cabo medidas de afinidad. Sin embargo, con los ajustes adecuados, el asistente de instalación para "unión no específica" podría usarse para medir las constantes de velocidad de afinidad y por lo tanto se usó para la determinación de K_D . Con este asistente de instalación, se midieron dos celdas de flujo y la fase de disociación se ajustó a 90 s al realizar la "Regeneración 1" con amortiguador 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 unión de nuevo. Durante todo el procedimiento HBS-EP se usó como tampón de corrida y dilución. Para determinar la unión 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 9**.

Tabla 9: 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 1,5	1,4 +/- 0,06
B-B4	1,7 1,7 1,6	1,6 +/- 0,06
nBT062-SPDB-DM4	1,9 1,9 1,9	1,9 +/- 0,00
B-B4-SPP-DM1	2,6 2,7 2,6	2,6 +/- 0,06

Discusión

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

Preparación de Inmunoconjugados

nBT062-DM1 y huC242-DM1

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

nBT062-DM4

BT062 es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el fármaco maitansinoide citotóxico DM4, enlazado a través de enlaces disulfuro a través de un enlazador al anticuerpo monoclonal quimerizado nBT062. Los maitansinoides son anti-mitóticos que inhiben la polimerización de tubulina y la estructura o el ensamblado de los microtúbulos (Remillard *et al.*, Science 189 (1977), 1002). Las representaciones químicas y esquemáticas de BT062 (nBT062-DM4) se ilustran en las **FIGURAS 1 y 2**.

Síntesis de DM4

DM4 se prepara a partir del derivado bien conocido maitansinol (Kupchan *et al.*, J. Med. Chem., 21 (1978), 31). El maitansinol se prepara por escisión reductiva de la porción éster del producto de fermentación microbiano, ansamitocina P3, con hidruro de trimetoxialuminio litio (véase la **FIGURA 3**).

DM4 se sintetiza por acilación de maitansinol con N-metil-N-(4-metiditiopentanoil)-L-alanina (cadena lateral DM4) en presencia de dicitohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de zinc para dar el maitansinoide que contiene disulfuro DM4-SMe. El DM4-SMe se reduce con ditiotreitolo (DTT) para dar el maitansinoide que contiene tiol deseado DM4 (véase la **FIGURA 4** para el diagrama de flujo de proceso DM4).

Inmunoconjugado BT062

El procedimiento para la preparación de nBT062-DM4 se perfila en **FIGURA 5**. El anticuerpo nBT062 se modifica con N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butirato (enlazador SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. DM4 se mezcla con el anticuerpo modificado a una concentración que excede los equivalentes de grupos ditiopiridilo. El conjugado

BT062 se forma por una reacción de intercambio disulfuro entre el grupo tiol de DM4 y los grupos ditiopiridilo introducido en el anticuerpo por el enlazador. La purificación por cromatografía y diafiltración retira los reactivos de bajo peso molecular (DM4) y los productos de reacción (tiopiridina), así como agregados de anticuerpo conjugado, para producir la sustancia de fármaco a granel.

5

Análisis FACS y ensayos de citotoxicidad WST

Análisis FACS

10 Las células OPM-2 son líneas celulares de leucemia de células de plasma que muestran CD138 de alta expresión. Las 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 se detectaron anticuerpo ligado a CD138 o conjugado utilizando un anticuerpo secundario etiquetado por fluorescencia en análisis FACS. La fluorescencia promedio medida en estos experimentos se representó contra la concentración de anticuerpo.

15

Ensayo de viabilidad celular

20 Las células CD138⁺ MOLP-8 se sembraron en placas de fondo plano a 3000 células/pocillo. Las 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**) durante cinco días. Se añadió reactivo WST (sal tetrazolio soluble en agua, ROCHE) a fin de medir la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). El reactivo se incubó durante 7,5 horas en las células MOLP-8 y durante 2 horas en las células BJAB. La fracción de células supervivientes se calcula basándose en las densidades ópticas medidas en un lector de microplacas usando procedimientos convencionales.

25

Discusión

30 La unión de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 o nBT062 se analizó por FACS. CD138⁺ OPM-2 como células diana se incuban con nBT062 o inmunoconjugados y se detectaron moléculas unidas a células usando un anticuerpo secundario etiquetado por fluorescencia. En la **Figura 6**, las fluorescencias promedio como se mide para la cantidad de anticuerpo unido a células se representa contra diferentes concentraciones de conjugado o anticuerpo. Los resultados muestran que nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 presentan características de unión muy similares. Además, los resultados sugieren fuertemente que las características de unión del anticuerpo no conjugado no se afectan por las toxinas conjugadas.

35

40 En ensayos de viabilidad celular, se analizaron la actividad citotóxica del anticuerpo contra células diana CD138⁺ MOLP-8 y contra células de control de linfoblastoma B CD138⁻ BJAB. Ambas líneas celulares se sembraron en placas de fondo plano y se incubaron con concentraciones crecientes de los inmunoconjugados. El anticuerpo no conjugado se usó como un control. La actividad citotóxica se analizó cinco días después de adición de los inmunoconjugados al usar 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 representa contra concentraciones crecientes de inmunoconjugado. 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 inmunoconjugados, indicando que todos los inmunoconjugados actúan mediante enlace específico de células a CD138. En experimentos de competencia, 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 inmunoconjugados exterminan las células por enlace específico a CD138 sobre la superficie celular (**Figura 7 (D)**).

50

Experimentos de xenoinjerto de ratón

55 Para evaluar la importancia del marcaje de CD138 como diana en la actividad antitumoral de conjugados anticuerpo-maitansinoide de una versión quimérica humana del anticuerpo B-B4, nBT062, se realizaron experimentos de xenoinjerto de ratón. Se prepararon dos versiones de conjugados maitansinoide-nBT062 que pueden diferir en la estabilidad química de sus enlaces disulfuro (nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4). La actividad antitumoral de estos conjugados anticuerpo-fármaco se comparó con la actividad del conjugado B-B4-SPP-DM1 (que comprende el anticuerpo precursor murino), así como maitansinoide libre no conjugado (DM4), anticuerpo nBT062 no modificado nativo, y conjugado maitansinoide-IgG1 (irrelevante) sin diana. Los conjugados se evaluaron en un modelo de xenoinjerto CD138 positivo (MOLP-8) de mieloma múltiple humano en ratones de inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

60

65 En estos ratones, se establecieron tumores subcutáneos (ratones CB.17 SCID hembra) por inoculación con suspensiones celulares MOLP-8. El tratamiento con inyección intravenosa de un solo bolo se llevó a cabo cuando los volúmenes de tumor alcanzaron un promedio de 113 mm³. Se monitorizaron los cambios en el volumen de tumor y peso corporal dos veces por semana. Los experimentos se llevaron a cabo durante 68 días después de inoculación de las células de tumor.

Experimentos de xenoinjerto de ratón A**Ratones**

- 5 Los ratones hembra CB.17 SCID, de cinco semanas de edad, se obtuvieron de Charles River Laboratories.

Líneas celulares de tumor humano

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

15 PARTE I**Crecimiento de tumor en ratones**

- 20 Cada ratón se inoculó con 1×10^7 células MOLP-8 subcutáneamente en el área bajo el hombro derecho. El volumen total fue 0,2 ml por ratón, en donde la proporción de medio libre de suero a matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) fue 1/1 (v/v). Antes del tratamiento, los tumores de xenoinjerto se monitorizaron diariamente y se dejó que se establecieran. El volumen de tumor alcanzó aproximadamente 113 mm³ aproximadamente 11 días después de inoculación de células de tumor. La tasa de toma de tumor de ratones CB.17 SCID fue el 100 %.

- 25 Once días después de la inoculación de células de tumor, 42 ratones se seleccionaron basándose en volúmenes de tumor y pesos corporales. El volumen de tumor estuvo en el intervalo de 68,2 a 135,9 mm³. Los cuarenta y dos ratones se dividieron en forma aleatoria en siete grupos (A-G) de seis animales cada uno basándose en el volumen de tumor.

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

- 40 Todos los agentes se administraron de forma intravenosa como una sola inyección de bolo a través de una vena lateral de la cola con una jeringa de 1 ml adaptada con una aguja de calibre 27, de 1,27 cm (½ pulgada). Antes de la administración, las soluciones madre del anticuerpo nBT062, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se diluyeron con PBS estéril a concentraciones de 2 mg/ml, 28,1 µg/ml y 28,1 µg/ml, respectivamente, de tal manera que el volumen inyectado por cada ratón estuvo entre 120-220 µl.

PARTE II

- 45 En un segundo conjunto de experimentos, las células MOLP-8 ($1,5 \times 10^7$ células por ratón), suspendidas en una mezcla 50:50 de medio libre de suero y matrigel, se inyectaron subcutáneamente en el área bajo el hombro derecho en 100 µl. Los volúmenes de tumor alcanzaron aproximadamente 80 mm³ el día 11 y el promedio de los controles fue aproximadamente 750 mm³ el día 25, posterior a inoculación celular. Los tiempos de duplicación de tumor se estimaron como de 4,58 días. Cada ratón en el grupo de control (n=6) recibió 0,2 ml de PBS estéril administrado en la vena de cola lateral (i.v.) en una inyección de bolo. Todas las dosis de tratamiento se basaron en maitansinoide conjugado. Nueve grupos (n=6) se trataron con una sola inyección intravenosa de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4, o nBT062-SPP-DM1, cada una a dosis de 450, 250 y 100 µg/kg. Un grupo adicional (n=6) recibió 250 µg/kg de nBT062-SMCC-DM1 en una dosis repetida (semanalmente por cinco semanas). Los ratones se aleatorizaron en 11 grupos (n=6) por volumen de tumor utilizando el Programa LabCat. Los volúmenes de tumor estuvieron en el intervalo de 40,0 a 152,5 mm³. Los ratones fueron dosificados con base en el peso corporal individual.

- 60 El tamaño de tumor se midió dos veces por semana en tres dimensiones utilizando el Sistema LabCat (Tumor Measurement and Tracking, Innovative Programming Associated, Inc., Princeton, NJ). El volumen de tumor en mm³ se calculó utilizando la metodología descrita en Tomayko *et al.* (Tomayko *et al.*, 1989):

$$\text{Volumen} = \text{Longitud} \times \text{Ancho} \times \text{Altura} \times \frac{1}{2}$$

- 65 El exterminio celular Log₁₀ se calculó con la fórmula descrita por Bissery *et al.* (Bissery *et al.*, 1991).

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

en donde (T-C) o retardo en el 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 de tumor, con base en el volumen de tumor promedio en los ratones de control y 3,32 es el número de duplicaciones de células por log de crecimiento celular.

5

Resultados

El crecimiento de tumor en ratones individuales se muestra en las **Figuras 8 y 9**. El promedio de crecimiento de tumor (+/- SD) por cada grupo se muestra en la **Figura 10**.

10

En comparación con crecimiento de tumor en los animales tratados con PBS, el tratamiento con anticuerpo nBT062, DM4 libre no conjugado o el conjugado no dirigido irrelevante huC242-DM4 no provocan ninguna inhibición significativa de crecimiento de tumor.

15

Todos los tres conjugados dirigidos a CD138, nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1 a una dosis de $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ provocaron un retardo marcado en crecimiento de tumor. Con base en los volúmenes de tumor promedio medidos en los grupos de tratamiento, el conjugado DM4 nBT062-SPDB-DM4 fue el más activo, mientras que el conjugado nBT062-SPP-DM1 mostró actividad ligeramente incrementada en comparación con su contraparte murina B-B4-SPP-DM1 (**Figura 10**). Los resultados obtenidos en ratones individuales muestran además que la actividad antitumoral obtenida con B-B4-SPP-DM1 es más heterogénea y menos pronosticable que la medida en ratones tratados con nBT062-SPP-DM1. En términos de homogeneidad de actividad antitumoral, el otro conjugado que utiliza nBT062 como anticuerpo dirigido nBT062-SPDB-DM4 se comportó similar a nBT062-SPP-DM1.

20

25

No se observó reducción en peso corporal en cualquier grupo de tratamiento sugiriendo que los tratamientos fueron bien tolerados.

Discusión

30

Los resultados del análisis de tres conjugados dirigidos a CD138 en animales experimentales demostraron la importancia de suministro dirigido para la actividad antitumoral. Mientras que los conjugados maitansinoides de nBT062 quimérico humano y los anticuerpos B-B4 murino muestran actividad significativa como se mide por exterminio celular log, que no hubo impacto significativo en crecimiento de tumor a partir del tratamiento con DM4 sin conjugar, anticuerpo huBT062 nativo sin modificar, o conjugado de control no dirigido (huC242-DM4).

35

El inmunoconjugado preparado a partir del anticuerpo quimérico humano, nBT062-SPP-DM1 dio una actividad antitumoral ligeramente superior que el conjugado preparado de su contraparte murina B-B4-SPP-DM1. Además, el tratamiento con nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4 resultó en respuestas más homogéneas en ratones individuales en comparación con tratamiento con B-B4-SPP-DM1. La alta variación de enlace de B-B4-SPP-DM1 explicó que la medición de volumen de tumor promedio (+/- SD) de MOLP-8 xenoinjertos de mieloma múltiple humano en ratones CB.17 SCID con el tiempo (días) posterior a inoculación actualmente proporcionó resultados relativamente mejores para B-B4-SPP-DM1 que para nBT062-SPP-DM1 (datos no mostrados). Esta característica de inmunoconjugados utilizando nBT062 como un anticuerpo dirigido parece ser benéfica especialmente para uso terapéutico de los conjugados.

40

45

Finalmente, el más potente de los conjugados maitansinoides después de administración sencilla IV en los modelos de xenoinjerto MOLP-8 en ratones SCID fue nBT062-SPDB-DM4.

Exterminio por activación inespecífica (ensayo de viabilidad celular)

50

Células CD138⁺ OPM2 y células CD138⁻ Namalwa se sembraron en placas de fondo redondo bien en pocillos separados o en co-cultivo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4 en concentraciones en el intervalo de 1×10^{-8} a 1×10^{-9} M. La fracción de células viables se detectó utilizando el reactivo WST (sal tetrazolio soluble en agua, ROCHE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). La fracción de células supervivientes se calcula con base en las densidades ópticas medidas en un lector de microplacas utilizando procedimientos estándar.

55

Discusión

60

El exterminio por activación inespecífica de células no diana en proximidad inmediata (como se presenta en pocillos de fondo redondo) a células de mieloma múltiple ante tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 se analizó en un estudio *in vitro* en donde células OPM2 CD138 positivas se cultivaron en co-cultivo con células Namawla CD138 negativas (**Figura 13**). En general, mientras que células CD138 positivas se exterminan eficientemente por nBT062-SPDB-DM4, las células CD138 negativas no fueron afectadas por el conjugado. En el co-cultivo en pocillos de fondo redondo, sin embargo nBT062-SPDB-DM4 también exterminó las células negativas de antígeno en proximidad inmediata con las células de antígeno positivas (un efecto que a menudo es referido como exterminio por activación inespecífica). Kovtun et al. (2006) discutió que el exterminio por activación inespecífica mediado por conjugados maitansinoide ocurre solo en proximidad inmediata con células antígeno positivas. Kovtun et al. (2006) que se

65

incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, también discute la importancia del enlazador del inmunoconjugado. El exterminio por activación inespecífica *in vivo* puede contribuir a 1) la erradicación de células de tumor que expresan en forma heterogénea CD138, 2) la destrucción del microambiente de tumor por el exterminio de células de estroma de tumor, y 3) la prevención de la selección de células resistentes nBT062-SPDB-DM4 CD138 negativas.

El efecto por activación inespecífica es de importancia particular si la actividad de un inmunoconjugado se deteriora por el antígeno dirigido que se expresa en tumores en una forma heterogénea. Si este es el caso, una célula particular de un tumor expresa si lo hace de hecho, el antígeno no en una cantidad que permitiera dirigido o hacer diana directa eficaz y exterminio de la célula por el inmunoconjugado respectivo. La eficacia antitumoral de nBT062-SPDB-DM4 en células CD138 negativas en co-cultivo con células CD138 positivas aclara que la presencia de células diana influye, bajo las circunstancias apropiadas, la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 hacia células no diana.

15 **Experimentos de ratón-xenoinjerto B**

En este conjunto de experimentos, ochenta y cinco ratones fueron inoculados con células MOLP-8 ($1,5 \times 10^7$ células/ratón) en forma subcutánea en el hombro derecho. La tasa de toma de tumor fue 100 %. Sesenta y seis ratones SCID que contienen tumores MOLP-8 voluminosos con un volumen promedio de tumor de aproximadamente 80 mm^3 se aleatorizaron en once grupos de tratamiento ($n=6$). Se trataron ratones con una sola dosis de uno de tres conjugados (nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1). Un grupo adicional recibió cinco dosis semanales de nBT062-SMCC-DM1 y un grupo de control recibió una sola dosis de PBS. Los volúmenes de tumor promedio se ilustran en la **Figura 11A**. Se estableció una respuesta de dosis para cada conjugado. Un volumen de tumor promedio de 750 mm^3 en los animales tratados con PBS se alcanzó el día 25. Tiempo de duplicación de tumor determinado por el ajuste de curva con radiación lineal de mejor ajuste en una representación log-lineal de crecimiento de tumor de control fue 4,58 días. Los animales tratados con nBT062-SPDB-DM4 a $450 \text{ } \mu\text{g/kg}$ tuvieron el exterminio celular log más alto ($\text{LCK}=2,89$), seguido de animales tratados con nBT062-SMCC-DM1 a $250 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de dosis semanal ($\text{LCK}=2,1$; véase la Tabla 10). La comparación de las curvas de crecimiento de tumor promedio para los grupos de tratamiento por medidas repetidas ANOVA realizando Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett mostró una diferencia significativa entre el grupo de control PBS $450 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de nBT062-SPDB-DM4 ($p<0,01$), $250 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de nBT062-SPDB-DM4 ($p<0,05$) y dosis de cinco semanas de $250 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de nBT062-SMCC-DM1 ($p<0,05$). No hubo regresión de tumor parcial o completa en cualquiera de los grupos de tratamiento que ocurriera con excepción de un animal que recibe $450 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de nBT062-SPDB-DM4, que tuvo regresión parcial del tumor hasta el día 85 posterior a inoculación.

Tabla 10. Valores de exterminio celular Log (LCK) como se mide para actividad anti-tumor de diferentes conjugados nBT062-DMx en diferentes esquemas de dosificación. Refiérase a la sección de materiales y métodos para información respecto al cálculo de valores LCK.

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

40 **Efectividad *In vivo* de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 en el ambiente de médula ósea**

Preparación de ratones SCID que tienen implantes de huesos fetales humanos

Se implantaron huesos largos fetales humanos (chips de huesos fetales humanos) en el cuerpo superior de ratones CB17 SCID (SCID-hu) como se describió previamente (Urashima et al., 1997) y de esta manera se proporcionan para un modelo de ratón para la migración de células MM humanas a células BM humanas.

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

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

Los ratones desarrollaron shuIL-6R de suero susceptible a medirse aproximadamente 4 semanas después de inyección celular INA-6 y después recibieron 0,176 mg de conjugado o control de vehículo mediante inyección en la vena de la cola, semanalmente durante 7 semanas. Después de cada tratamiento, se recolectaron muestras de sangre y midieron para niveles de shuIL-6R por un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se ilustran en la **Figura 12**.

Discusión

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

De ésta manera, los ratones sCID-hu/INA-6 proporcionan un modelo para las células de mieloma múltiple que crecen en su ambiente de médula ósea normal. Las células de tumor de este modelo, que interactúan directamente con la médula ósea humana, se asemejan estrechamente a la situación en pacientes, en donde también se promueve crecimiento de células de tumor por la presencia de células estromales. A medida que las células INA-6 liberan receptor de interleucina-6 humano soluble (shuIL-6R), las concentraciones en suero de ésta proteína pueden emplearse como una medida para carga de células de tumor en estos ratones. La potencia *in vivo* de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se probó en este ambiente.

El tratamiento de ratones SCIDhu/INA-6 con administraciones i.v. semanales de nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1 durante siete semanas indujo la regresión eficiente del tumor, como se detecta por una disminución en los niveles de shuIL-6R en suero respecto al control, indicando buena efectividad de los conjugados incluso en el ambiente de médula ósea humana, que refleja la situación relevante en los pacientes (Figura 12).

Dosificaciones en Ratones

Para determinar dosis relevantes, una sola administración de BT062 a dosis de 100, 250 y 450 μ g/kg (basándose en la concentración DM4) se suministró a los ratones cuando los tumores alcanzaron un volumen de tumor promedio de 80 mm³ (Figura 14). Las dosis se informan como la concentración de DM4 conjugado (1 μ g de DM4 igual a aproximadamente 55 μ g de proteína anticuerpo). La efectividad anti-tumoral fue dependiente de dosis con la dosis más alta probada (450 μ g/kg) resultando en un exterminio de células Log (LCK) de 2,9 (Compárese también la Tabla 10). Los animales recuperaron peso a lo largo del transcurso del estudio indicando que el tratamiento no era tóxico para los ratones.

La **Figura 14** indica 250 μ g/kg como una primera dosis eficaz en ratones, lo que se traduce en una dosis comparable en humanos de 166 mg/m².

Ejemplos Comparativos - Indicador: Modelos de Xenoinjerto - Páncreas/ Mamario y otros Carcinomas**Disposición Experimental General**

De acuerdo con el análisis de expresión de CD138 (análisis de inmunohistoquímica en micromatrices de tejido de tumor) se seleccionaron candidatos de tumor de una colección de tumores primarios, esto es, de tumores derivados de pacientes. Después de trasplante subcutáneo y establecimiento de tumores (tiempo de inducción 30 días), el inmunoconjugado BT062 se inyectó intravenosamente a 2 diferentes concentraciones del maitansinoide DM4, 450 μ g/kg y 250 μ g/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 μ g/kg DM4 = 23,850 μ g). El inmunoconjugado se administró una vez a la semana durante 10 semanas (en caso de tratamiento en ratones implantados con tumor pancreático) y 5 semanas (en caso de ratones implantados con tumor mamario).

Ejemplo Comparativo 1: Carcinoma de Páncreas

Se implantó (bilateral) tejido de tumor pancreático (PAXF 736 (Kuesters et al., 2006) en ratones NMRI. El tumor implantado se originó de un carcinoma pancreático primario de un 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 de plasma 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 tamaño de aproximadamente 6-8 mm de 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 $a*b*b/2$ en donde "a" es el eje más largo y "b" el eje perpendicular al mismo. 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 del tumor para un día particular (T/C en %) se calculó a partir 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 28, 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 ambos regímenes de administración todavía estaban vivos (8/8), que el octavo ratón del grupo de control hd se ha reducido a 1. Un valor T/C inferior a 10 % indica remisión completa (CR) (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.

Tabla 11: 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
BT062-DM4; 23,85 mg/kg	0 (±0,01)	0 - 0,1	0,0

Ejemplo Comparativo 2: Carcinoma mamario

Ratones NMRI (desnudos) fueron implantados (bilateral) con tumor mamario primario de un paciente (determinado a través de análisis IHC 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. Los tumores a implantarse se seleccionaron de acuerdo con los resultados de tinción IHC (fuerte, expresión homogénea de CD138 detectada por BT062, triple negatividad (expresión negativa de receptores de hormona estrógeno y progesterona); expresión Her2 puntuó 2 o menos (respecto a Herceptina no responde).

El tratamiento con BT062 se inició después de que los tumores alcanzaron tamaño aproximado de 6-8 mm de diámetro (mínimo 5 mm). Los datos de tumor se midieron dos veces a la semana. Los volúmenes de tumor se calcularon de acuerdo con la fórmula $a*b*b/2$, 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).

El volumen de tumor pudo reducirse significativamente por administración semanal de BT062. Se observó una remisión parcial y completa dependiente de dosis. El inmunoconjugado 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 YYY, el efecto anti-tumor (es decir, remisión completa) se logró después de 21 días, que puede considerarse una rápida respuesta BT062. 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 de CD138 fue similar. De ésta manera, no pudieron sacarse conclusiones del nivel de expresión de CD138 a una recomendación general para la duración de tratamiento. Después de 21 días 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 inmunoconjugado) no se detectó recrecimiento de tumor, confirmando la curación completa.

Tabla 12a: El 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 (\pm 149,5)	339 - 878	
BT062-DM4; 13,25 mg/kg/4 mg/kg	0 (\pm 0,02)	0 - 0,1	0,0
BT062-DM4; 23,85 mg/kg	0 (\pm 1,75)	0 - 6,6	0,0

Tabla 12b: Expresión de CD138 en células de carcinoma mamario frente a células de epitelio

Muestras de tejido FFPE	Calificación de tinción (membrana)	
	0,25 μ g/ml	0,05 μ g/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

5 Ejemplo Comparativo 3: Carcinoma de Vejiga

Ratones 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.

10 El tratamiento con BT062 se inicia después de que los tumores alcanzaron un tamaño mayor a 5 mm. Los diámetros de tumor se miden dos veces a la semana. Los volúmenes de tumor se calculan de acuerdo con la fórmula $a*b^2/2$, siendo "a" el eje más largo y "b" el eje perpendicular al mismo. 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).

15 Se busca reducir el volumen de tumor significativamente por administración semanal de BT062.

Se le da seguimiento a cualquier remisión parcial y completa dependiente de dosis.

20 Ejemplo Comparativo 4: Carcinoma Pulmonar

Ratones NMRI (desnudos) se implantan con un carcinoma pulmonar (determinado por análisis IHC como CD138 fuerte positivo).

25 El tratamiento con BT062 se inicia después de que los tumores alcanzaron un tamaño mayor a 5 mm. Los diámetros de tumor se miden dos veces a la semana. Volúmenes de tumor se calculan de acuerdo con la fórmula $a*b^2/2$, siendo "a" el eje más largo y "b" el eje perpendicular al mismo. 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).

30 Se busca reducir el volumen de tumor significativamente por administración semanal de BT062.

Se le da seguimiento a cualquier remisión parcial y completa dependiente de dosis.

35 Estudios de Toxicidad Preclínicos

Los modelos de ratón-xenoinjerto son excelentes para determinar si los inmunoconjugados de la presente descripción son eficaces en el contexto del cáncer modelado por el ratón. Sin embargo, ya que estos modelos carecen de la expresión apropiada inherente de CD138, no pueden servir como un modelo confiable para estudios de toxicidad y de esta manera no pueden utilizarse para determinar por completo las cantidades tolerables de los inmunoconjugados de la presente invención.

45 En monos macacos y rhesus tampoco han mostrado que BT062 se une a cualquier antígeno relacionado con CD138 pero actualmente son la especie animal más adecuada para estudios de toxicología de BT062 conocidos. Se espera, por lo tanto, que el perfil de toxicidad de BT062 en ratones y monos se deba a los efectos no dirigidos del componente citotóxico del conjugado (DM4).

Los estudios de toxicidad en una sola dosis se llevaron a cabo cumpliendo los requerimientos GLP en monos macacos y en ratones CD-1. Estos estudios se diseñaron para identificar dosis que provocan toxicidad grave y aquellos que no tienen (o son mínimos) efectos adversos en animales, para identificar toxicidades potenciales en humanos y para identificar una dosis inicial segura para una prueba clínica Fase I utilizando una infusión de un solo bolo de BT062.

Estudio de Toxicidad Aguda en Ratones

Se realizó un estudio de toxicidad de una sola dosis en ratones con BT062 administrado por una inyección sencilla IV de bolo en intervalo de 60-255 mg/m² (20-85 mg/kg).

La dosis tóxica no severamente tóxica más alta (HNSTD) de BT062 en ratones fue 45 mg/kg (135 mg/m²), con un estimado STD₁₀ de 57 mg/kg (171 mg/m²).

Estudio de Toxicidad Aguda en Monos

Se realizó un estudio de toxicidad en una sola dosis en monos macacos con BT062, administrada IV a dosis en intervalo de 48-336 mg/m² (4-28 mg/kg).

El HNSTD de BT062 en mono macaco fue 12 mg/kg (144 mg/m²).

Pruebas en Humanos con BT062

En el contexto de la presente invención, sujetos humanos respondieron bien a un régimen de baja dosis. Este incluso fue el caso en ausencia de cualquier tratamiento adicional que pudiera 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 (véase la Figura 14), 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 realiza para probar los efectos (buenos y malos) y determinar la MTD (dosis tolerada máxima) de BT062 para tratar pacientes con mieloma múltiple con relapso o con relapso refractario.

Hasta ahora, se reclutaron 26 pacientes. Al menos 11 de 26 pacientes experimentaron una progresión disminuida de la enfermedad como se representa al recibir al menos un siguiente ciclo de tratamiento, mientras que 4 pacientes todavía están sometidos a 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 10 ciclos de tratamiento (véase la Figura 23). Como la persona experta en la materia apreciará, es posible una cantidad superior de ciclos de tratamiento y dentro del alcance de las presentes invenciones, tales como 10 a 50, 10 a 100, 10 a 200 y más.

Disminuida progresión de la enfermedad 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 2º nivel de dosis en 20 mg/m² que no exhibe progresión de la enfermedad durante 10 ciclos de tratamiento de 21 días. Véase la Figura 23, en donde en las muestras de pacientes **001-001**, **003-001**, **002-002**, **002-003**, **002-004**, **003-003**, **001-005**, **001-006**, **001-008**, **001-009**, **004-001**, **001-011**, **004-002** y **001-012** se observó que la enfermedad avanzó finalmente, aun cuando es enfermedad estable y pudieron observarse respuestas, incluyendo respuestas menores y parciales. En la muestra de paciente **001-006**, se mantuvo la dosis.

A estos niveles de dosis, como se describió anteriormente (véanse las Tablas 7 y 8), 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 17. Una comparación de perfiles en plasma de BT062 en humanos con los de monos, se muestra en la Figura 18. La gráfica a la izquierda muestra la diferencia a 120 mg/m², mientras que aquellos a la derecha (160 mg/m²) muestran diferencias considerablemente menores.

También se administraron dosis de 160 mg/m² y 200 mg/m². Una dosis de 160 mg/m² se identifica como MTD y se expanden estudios en este grupo. Una dosis de 200 mg/m² se identifica como MAD. Se determinaron toxicidades limitantes de dosis (DLT) usando una graduación de acuerdo con NCI CTCAE v3.0 (09 de agosto de 2006, <http://ctep.cancer.gov>). Los criterios DLT específicos de estudio se citan a continuación:

No Hematológico

- Alopecia, de cualquier grado no se considera DLT

- Náuseas de grados 3-4 y vómito que dura más de 3 días a pesar de medicamento antiemético óptimo.^a
- Diarrea de grados 3-4 que dura más que 3 días a pesar de medicamento antidiarreico óptimo.^a

a. El tratamiento antidiarreico y antiemético óptimo se determinó por cada investigador.

5

Hematológico

- Neutropenia grado 4 que dura más de 5 días.
- Neutropenia grado 3 o superior con temperatura mayor que o igual a 38,3°C (101 °F) para 2 determinaciones consecutivas separadas 4 horas.
- Trombocitopenia grado 4
- Trombocitopenia grado 3 o superior con sangrado y que requiere el uso de transfusión de plaquetas.
- Neutropenia grado 3, trombocitopenia grado 3 NO se consideraron DLT.

10

15

Todos los eventos adversos (AE) se evaluaron de acuerdo con NCI-CTCAE v3.0. Para AE no citados en NCI-CTCAE v3.0, se estimó severidad por el investigador de acuerdo con estos criterios. Solo fueron aceptables grado 1 y grado 2, con lo que **grado 1** (Ligero) requiere mínimo o ningún tratamiento y no interfiere con las actividades diarias de los pacientes y **grado 2** (Moderado) resulta en un bajo nivel de inconveniencia o consideración con las medidas terapéuticas. Los eventos moderados pueden provocar algo de interferencia con el funcionamiento del sujeto.

20

Los AE de **Grado 3** (Severo) y **Grado 4** (Que Amenaza la Vida) considerados relacionados con BT062, se consideraron no aceptables y se definen como DLT, si de otra forma no se definen por criterios DLT específicos del estudio.

25

Las muestras de pacientes **003-005, 002-012, y 002-011** en este momento todavía están participando en el estudio.

Los pacientes de las muestras **002-003, 001-002 y 002-008** se retiraron.

Como se indica en la Figura 23., las dosis sencillas repetidas de régimen 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, lo que significa el día 1, día 22, día 43, día 64, día 85, día 106, y así sucesivamente. La enfermedad ha sido y se monitorizará por evaluación del doctor de la hematología, los síntomas clínicos y la 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) en el suero de los pacientes con el tiempo.

30

Evaluación de Inmunoglobulina

35

Se analizó la cantidad de anticuerpos Ig incluyendo la determinación de subgrupos IgG en la evaluación.

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

40

Inicialmente, la respuesta a tratamiento se evaluó el día 1 de los ciclos de tratamiento 1-3 por cuantificación de proteína M utilizando inmunolectroforesis (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.

45

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 la detección de respuesta temprana al tratamiento. Por lo tanto, los 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. La proteína M y FLC se analizaron en la evaluación y en la visita final. Las evaluaciones el día 1 del ciclo 1 sirvieron como valores de referencia.

50

Tabla 13 Proporciona observaciones realizadas respecto a proteína M en Orina/Suero y mediciones FLC en suero en pacientes seleccionados.

55

Dosis mg/m ²	Figura	Mediciones de proteína M en orina/suero y mediciones FLC
20	Figura 24	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Proteína M en orina disminuyó después del 3^{er} tratamiento por aproximadamente 17 semanas y aumentó después del 9^o tratamiento ➢ Criterio de proteína M para Respuesta Menor se alcanzó después del 8^o tratamiento ➢ Disminución en nivel de Proteína M en Orina de línea de referencia en más de 50 % y del Día 42 (3^{er} tratamiento) en más de 75 % ➢ Progresión de enfermedades después del Ciclo 10 ➢ Proteína M en suero entre 0,06 y 0,1 g/dl (definido como no medible)

(continuación)

Dosis mg/m ²	Figura	Mediciones de proteína M en orina/suero y mediciones FLC
40	Figura 25	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad estable durante 14 semanas ➤ Proteína M en suero disminuyó después del 1er tratamiento y se estabilizó durante 14 semanas ➤ Se observa progresión de enfermedades después del tratamiento se mantiene al inicio del ciclo 6 (día 105)
		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proteína M en orina aumentó de 0 en la evaluación a un máximo de aproximadamente 16 mg/24h (definido como no medible)
160	Figura 26	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nivel FLC en suero aumentó durante el periodo de evaluación partiendo 21 días antes del día 1 del tratamiento. ➤ Nivel FLC en suero disminuyó muy pronto después del 1er tratamiento y ya estaba cerca de disminución de 25 % el día 8. ➤ En comparación con línea de referencia, niveles FLC se reducen en aproximadamente 40 % durante el 1er ciclo y en más de 50 % después del 2o, 3er y 4o tratamiento. ➤ Criterios FLC para Respuesta Parcial se alcanzaron muy temprano. ➤ Progresión de enfermedad después del fin del 4o ciclo de tratamiento. ➤ Proteína M en suero no medible = 0; Proteína M en orina disminuyó de 140 mg/24h en línea de referencia a 120 mg/24h antes del 2o tratamiento (definido como no medible) => Mieloma no secretorio

Determinación de BT062 y DM4 de plasma

- 5 Para evaluar las 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.

10 Determinación de CD138 desprendido 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 tumoral. 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 la Figura 22). Las muestras de plasma pre-dosis del día 1 de cada ciclo de tratamiento 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).

Mediciones de CD138 desprendido observado

- 20 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).

- 25 Los pacientes con MGUS y MM pueden exhibir altos niveles de CD138 soluble concomitantes con niveles más altos de β2-microglobulina y elevado contenido de células en plasma en la médula ósea (Aref et al., 2003).

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

Se determinaron los valores de CD138 soluble (s) en diferentes sujetos.

Tabla 14: 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

35

ESTUDIOS DE COMBINACIÓN

Se han evaluado posibles candidatos de fármacos antimieloma como compañeros de combinación para BT062 en líneas celulares.

5

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), usando el análisis de efecto medio. Aquí, se calculan valores IC₅₀ para los efectos citotóxicos para cada fármaco y cada línea celular, y después las proporciones IC₅₀ para cada par de fármacos. Las células se expusieron después a series de dilución de cualquiera de estas mezclas de fármacos o los fármacos solos. Los datos experimentales se analizaron usando el software CompuSyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ). Los índices de Combinación (CI) para cada experimento independiente, se calcularon y se 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 de T.C. Chou (CompuSyn, User's guide, 2004), el autor del método, la escala de sinergia y el antagonismo es como sigue:

10

15

Índice de Combinación	Descripción
< 0,1	Sinergia muy fuerte
0,1-0,3	Sinergia fuerte
0,3-0,7	Sinergia
0,7-0,85	Sinergia moderada
0,85-0,9	Sinergia ligera
0,9-1,1	Casi aditivo
1,1-1,2	Antagonismo ligero
1,2-1,45	Antagonismo moderado
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Antagonismo fuerte
> 10	Antagonismo muy fuerte

Células Fármaco	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

20 **Tabla 15:** 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 la combinación de BT062 con bortezomib, talidomida, lenalidomida, melfalan y dexametasona.

25

La combinación con talidomida o bortezomib, ni resultó 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.

30 Se han evaluado posibles candidatos de fármaco anti-mieloma como compañeros de combinación para BT062 en estudios de Xenoinjerto usando células de mieloma múltiple de humano MOLP8.

Ejemplo 1

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

5 Ratones SCID hembra se inocularon subcutáneamente con células de mieloma humano MOLP 8. El tratamiento con BT062 solo o en combinación con Lenalidomida se inició el día 11 posterior a inoculación de tumor. BT062 se usó en concentraciones de 100 µg, 200 µg y 400 µg solo y en combinación con Lenalidomida que se dosificó 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 solución salina amortiguada con fosfato (PBS) usando el mismo programa y ruta de administración. El crecimiento del tumor se monitorizó midiendo el tamaño de tumor y se 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 **RELACIÓN (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) es, cuando es superior a 1, referida en el presente documento como "RELACIÓN DE SINERGIA".

Como puede verse a partir de la Tabla 15, la sinergia se observó después de 28 días en concentraciones

25 **Tabla 16:** Volumen de tumor fraccional en xenoinjertos MOLP 8.

Días	BT062 100	Lenalidomida	BT062 100 + Len (observado)	BT062 100 + Len esperado	Relación (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	Relación (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	Relación (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

de BT062 de 200 µg y 400 µg.

Se han administrado concentraciones diferentes de BT062 ya sea solas o en combinación con Lenalidomida en xenoinjerto que contiene tumor. FTV representa el volumen de tumor relativo.

Se determinan efectos sinérgicos usando valores de relación de FTV esperado contra FTV observado. Una relación >1 indica sinergia.

Tabla 17: Combinación de Lenalidomida BT062: efectos a diferentes dosificaciones.

Agente	Dosificación 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	Activo
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					
BT062	200 ug/kg	200 ug/kg	12	2/6	0/6	0/6	Activo
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					
BT062	400 ug/kg	400 ug/kg	6	5/6	4/6	0/6	Altamente activo
Lenalidomida	100 mg/kg	1g/kg					

La Figura 28 muestra el efecto de la terapia de combinación en volumen de tumor medio (TV) en un modelo de ratón-xenoinjerto. El resultado muestra efectos aditivos de la combinación. Notablemente la combinación resultó en una dosis de 100 mg/kg del inmunoconjugado, cuando se combinó con una dosis de 100 mg/kg de lenalidomida, para tener un efecto equivalente de 200 mg/kg del inmunoconjugado. Por favor refiérase a la Tabla anterior para la relación de sinergia.

Ejemplo 2

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.). El 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 solución salina amortiguada 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.

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

Como puede verse a partir de la Tabla 18, sinergia se observa 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).

Tabla 18: Tratamiento de combinación con VELCADE.

Día	BT062 100	Velcade	BT062 100 + Velcade (observado)	esperado	relación (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

(continuación)

Días	BT062 200	Velcade	BT062 200 + Vel (observado)	esperado	relación (exp/obs)
10	1,02	1,05	1,07	1,12	1,07
14	0,52	0,84	0,45	0,44	0,98
18	0,13	0,96	0,10	0,12	1,19
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

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.

Combinación VELCADE

5 **Tabla 19:** Combinación VELCADE BT062: efectos a diferentes dosificaciones.

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	Day 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 29 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. Notablemente la sinergia resultó en una dosis de 100 mg/kg del inmunocombinado, cuando se combinó con una dosis de 100 mg/kg de VELCADE, para tener un efecto que fue incluso mejor que 200 mg/kg del inmunocombinado. Por favor refiérase a la Tabla anterior para la relación de sinergia.

Ejemplo 3: BT062/Melfalan

Las células RPMI se han implantado en forma subcutánea en ratones desnudos. Los ratones se aleatorizaron cuando el tumor alcanzó un volumen total de aproximadamente 100 mm³. BT062 se inyectó en forma intravenosa a 2 concentraciones diferentes: 400 µg/kg y 100 µg/kg; cada uno basado en el peso molecular de DM4 enlazado. PBS sirvió como control negativo. Por grupo, se usaron 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.

Los resultados se muestran en la Figura 30.

Una vez dada la descripción anterior, muchas otras características, modificaciones y mejoras serán evidentes para

el experto en la materia.

Bibliografía

5 Abdelkefi et al.; "Single autologous stem-cell transplatación followed by maintenance therapy with thalidomide is superior to double autologous transplatación in multiple myeloma: results of a multicenter randomized clinical trial"; *Blood*; 111; 2008; pp.: 1805-1810.

10 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.

15 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.

20 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); June 2001; pp.: 297-305.

25 Aref et al.; "Syndecan-1 in multiple myeloma: relaciónship 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); August 1, 2003; pp.: 474-83.

30 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); September 2006; pp.: 1234-40.

35 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); October 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*; May 20, 2008; pp.: 1028.

40 Berenson et al.; "New drugs in multiple myeloma;" *Curr Opin Support Palliat Care*; 2(3); September 2008; pp.: 204-10.

45 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.

50 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); March 1, 2006; pp.: 2079-89.

55 Bissery et al.; "Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue", *Cancer Research* 51, 1991, PP.: 4845-4852.

60 Blade et al.; "Advances in therapy of multiple myeloma;" *Curr Opin Oncol*; 20(6); November 2008; pp.: 697-704.

65 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.

- 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.
- 5 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 #2070; 2006.
- 10 Cabanillas et al., "Phase I study of maytansine using a 3 day schedule;" *Cancer Treat Rep*; 62; 1978; pp.: 425-428.
- 15 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.
- 20 Carter P; "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies;" *Nat Rev Cancer*; 1; 2001; pp.:118-129.
- Carter and Senter, "Antibody-Drug Conjugates", *The Cancer Journal*, Vol. 14(3), 2008, pp.: 154-169
- 25 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 #1174 (ASH Meeting); November 16, 2007.
- 30 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; November 2008; pp.: 3689.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 Choi et al.; "Syndecan-1, a key regulator of cell viability in endometrial cancer;" *Int J Cancer* 121(4); 2007; pp.: 741-50.
- Chou and Talalay; "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors;" *Adv. Enzyme Regul.* 22; 1984, pp.:27-55.
- 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 Dmoszynska A.; "Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy;" *Pol Arch Med Wewn*; 118(10); October 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.
- 10 Dimopoulos et al.; "The role of novel drugs in multiple myeloma;" *Annals of Oncology*19 (Supplement 7); 2008; pp.: vii121-127.
- 15 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.
- 20 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); December 2006; pp.: 2220.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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; June 1, 2005; 7159; Supplement.
- 40 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*; May 1, 2008; pp.: 2147-2154.
- 45 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); March 2007; pp.: 155-63.
- 50 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); November 16, 2006.
- Greipp et al.; "International staging system for multiple myeloma;" *J Clin Oncol*; 23(15); Mary 20, 2005; pp.:3412-20.
- 55 Greipp and Lust; "Pathogenetic relation between monoclonal gammopathies of undetermined significance and multiple myeloma;" *Stem Cells. Aug. 13 Suppl 2*; 1995; pp.:10-21.
- 60 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.
- 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 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); 2004 Jul 1; pp.: 4363-8.
- 10 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.
- 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.
- 15 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; November 2008; p.: 1716.
- 20 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; May 20, 2008; p.: 1029.
- Horvathova et al.; In: al. SFSe, ed. Leucocyte Typing V.; Oxford: Oxford University Press; 1995; pp.: 713-714.
- 25 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.
- Hwang et al.; "New Frontiers in the Treatment of Multiple Myeloma;" Scientific World Journal; 6; December 6, 2006; pp.: 1475-503.
- 30 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; available at <http://precedings.nature.com/documents/2374/version/1>.
- 35 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); April 2008; pp.:129-31.
- 40 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.
- 45 Johnson et al.; "Novel and Targeted Agents for Small Cell Lung Cancer;" ASCO Educational Book; January 1, 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.
- 50 Kuesters et al.; "Correlación 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.
- 55 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 #2118; 2007.
- 60 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.
- 65 Kyle et al.; "Multiple myeloma;" N Engl J Med; 351(18); October 28, 2004; pp.:1860-73.

- Kyle et al.; "Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma;" *Leukemia*; 23; 2009; pp.: 3-9.
- 5 Kyoizumi et al.; "Implantación 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.
- 10 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); November 6, 1998; pp.: 29965-71.
- 15 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 or refractory CD33-positive Acute Myeloid Leukemia (AML);" *Blood*; 118(11); November 16, 2007.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Ludwig et al.; "Supportive care in multiple myeloma Best Practice & Research Clinical Haematology;" 20; Issue 4; 2007; pp.:817-835.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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); 2007 June 20; Supplement; p.: 3062.
- Mitsogiannis et al.; "Plasmacytoid transitional cell carcinoma of the urinary bladder;" *Urology* 66(1); 2005; p. 194.
- 55 Morgan et al.; "Advances in oral therapy for multiple myeloma;" *Lancet Oncol*; 7(4); April 2006; pp.:316-25.
- Mosmann T.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays;" *J Immunol Methods*; 65; 1983 pp.:55-63.
- 60 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*; 16th ed; New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. pp.: 700-707.
- 65 Namikawa et al.; "Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice;" *Blood*; 82; 1993; pp.:2526-2536.

- NCCN Guidelines; "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology;" Multiple Myeloma V.2.2009; National Comprehensive Cancer Network; November 9, 2008; *available at* www.nccn.org.
- 5 Ning et al.; "Liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for relapsed or refractory multiple myeloma;" *Oncology (Williston Park)*; 21(12); November 277; pp.:1503-8.
- 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.
- 10 Ocio et al., "New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings;" *Lancet Oncol.* 9(12); December 2008; pp.:1157-65.
- 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.
- 15 Ojima et al.; "Tumor-specific novel taxoid-mono-clonal 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.
- 20 Olafsen et al.; "Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications;" *Prot. Eng. Design & Selección* 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.
- 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.
- 30 Palacios et al.; "B-B4 monoclonal antibody and identification of human bone marrow plasma cells;" *Br J Haematol*; 96(3); March 1997; pp.:655-657.
- 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.
- 35 Palumbo et al.; "Treatment of newly diagnosed myeloma;" *Leukemia*; 23; November 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.
- 40 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.
- 45 Podar et al.; "Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy;" *Leukemia*; 23(1); January 2009; pp.: 10-24.
- 50 Qin et al.; "The pharmacokinetics and pharmacodynamics of IMGN242 (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.
- Quach et al.; "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (ImiDS) in multiple myeloma;" *Leukemia*; 24; 2010; pp.: 22-32.
- 55 Raje et al.; "Therapeutic use of immunomodulatory drugs in the treatment of multiple myeloma;" *Expert Rev Anticancer Ther*; 6(9); September 2006; pp.: 1239-47.
- 60 Rajkumar et al.; "Combination therapy with lenalidomida plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma;" *Blood*; December 15, 2005; 106(13); pp.: 4050-4053.
- 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.
- 65

- Rajkumar et al.; "A Randomized Trial of Lenalidomida Plus High-Dose Dexamethasone (RD) Versus Lenalidomida 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.
- 5 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.
- 10 Richardson et al.; "New treatments for multiple myeloma;" *Oncology (Williston Park)*; 19(14); December 2005; pp.:1781-92.
- Richardson et al.; "Lenalidomide in multiple myeloma;" *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(8); August 2006; pp.:1165-73.
- 15 Richardson et al.; "New Drugs for Myeloma;" *Oncologist Jun*; 12(6); 2007; pp.:664-89.
- 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.
- 20 Riechelmann et al.; "Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma;" *Oral Oncol*; 44(9); September 2008; pp.:823-9.
- Roh et al.; "Syndecan-1 expression in gallbladder cancer and its prognostic significance;" *Eur Surg Res*. 41(2); 2008; pp.:245-50.
- 25 Roguska et al.; "Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing;" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91; 1994; pp.:969-973.
- 30 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.
- Ross et al.; "Anticancer Antibodies;" *Am J Clin Path*; 119; April 17, 2003; pp.: 472-485.
- 35 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 #118; 2002.
- 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); April 2007; pp.:477-485.
- 40 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.
- 45 Sandhu et al.; "Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone;" *Blood*; 88; 1996; pp.:1973-1982.
- 50 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" Internaci3nacional Conference*; Abstract #B70; 2007.
- Sasaki et al.; "Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice;" *Cancer Res.*; 55; 1995; pp.: 3551-3557.
- 55 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); April 2007; pp.: 927-35.
- 60 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.
- Schuurman, et al.; "Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites;" *Immunology*; 97; 1999; pp.: 693-698.
- 65

- Sebestyen et al.; "Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. Br J Haematol;" 104(2); 1999; pp.: 412-9.
- 5 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.
- 10 Senter et al.; "Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates;" Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.); 2007; p.: 414.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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/scfv.html (last updated on May, 2001).
- 30 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.
- 35 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 Dec 15; 65(24):11712-20.
- 40 Takimoto et al.; "Principles of oncologic pharmacotherapy;" Cancer Management: A multidisciplinary Approach; 11th Edition; Chapter 3; 2008; April 15, 2009; *available at* <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.
- 45 Terpos et al.; "European Myeloma Network The 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.
- 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 or esophagus;" Clin Cancer Res; 12(20 Pt 1); October 15, 2006; pp.:6064-72.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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*; December 4, 2009 *available at* <http://www.springerlink.com/content/u631r56728411801/>.
- 10 Ward et al.; "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*;" *Nature*; 341; 1989; pp. :544-546.
- 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Wijdenes et al.; "A plasmocyte selective mAb (B-B4) recognizes syndecan-1;" *Br J Haematol*; 94(2) August 1996; pp.:318-23.
- Wijdenes et al.; "CD138;" *J Biol Regul Homeost Agents*; 16(2) April-June 2002; pp.: 152-155.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 Yang et al.; "The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy;" *Blood*; 110(6); September 15, 2007 pp.: 2041-8.
- 45 Yasui et al.; "Recent advances in the treatment of Multiple Myeloma;" *Curr Pharm Biotechnol*; 7(5); October 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.
- 50 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.
- 55

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Biotest AG
- <110> ImmunoGen Inc
- <120> Usos de immunoconjugados dirigidos a CD138
- 65 <130> 324215.WO/JND/CJS

ES 2 726 022 T3

<150> US 61/176.069

<151> 06-05-2009

<160> 13

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 448

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de cadena pesada predicha de nBT062

15

<400> 1

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

ES 2 726 022 T3

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 de cadena ligera predicha de nBT062

<400> 2

ES 2 726 022 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador MHV7

	<400> 3 atgggcatca agatggagtc acagaccag g	31
5	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador MHCG1	
	<400> 4 cagtggatag acagatgggg g	21
15	<210> 5 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador MECV2	
25	<400> 5 atggagacag acacactcct gctatgggtg	30
30	<210> 6 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador MECV4	
35	<400> 6 atgagggccc ctgctcagtt tttggcttc ttg	33
40	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador MECV9	
45	<400> 7 atggtatcca cacctcagtt ccttg	25
50	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador MKC	
55	<400> 8 actggatggt gggaagatgg	20
60	<210> 9 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador directo	

ES 2 726 022 T3

<400> 9
agagaagctt gccgccacca tgattgcctc tgctcagttc cttggtctcc 50

5 <210> 10
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador BT03

<400> 10
caacagtata gtaagctccc tcggacggtc ggtgg 35

15 <210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador BT04

<400> 11
ccaccgaacg tccgaggag cttactatac tgttg 35

25 <210> 12
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador g2258

<400> 12
cgcgggatcc actcagttt gattccagc ttggtgcctc c 41

35 <210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador g22949

45 <400> 13
cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttcc 45

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a células diana que expresan CD138, comprendiendo el inmunoconjugado:
- 5 al menos un anticuerpo dirigido a diana que marca como diana células que expresan CD138 y al menos una molécula efectora,
- 10 en donde dicho anticuerpo dirigido está funcionalmente fijado a dicha molécula efectora para formar dicho inmunoconjugado,
- 15 en donde el anticuerpo dirigido comprende una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 31-35, 51-68 y 99-111 de SEQ ID NO: 1,
- en donde al menos una parte del anticuerpo dirigido confiere propiedades del isotipo IgG4,
- en donde dicha al menos una molécula efectora es al menos un maitansinoide,
- en donde dicha enfermedad es mieloma múltiple de relapso o refractario.
2. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el inmunoconjugado ha de administrarse al paciente en una cantidad de 5 mg/m² a 200 mg/m².
3. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inmunoconjugado ha de administrarse al sujeto en una cantidad de 5 mg/m² o 10 mg/m² a menos de 160 mg/m².
4. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el inmunoconjugado muestra toxicidad tolerable hacia células no diana que expresan CD138, en particular células epiteliales.
5. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicho inmunoconjugado comprende 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 dichas propiedades del isotipo IgG4.
6. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicho inmunoconjugado comprende nBT062 o un anticuerpo dirigido que comprende una cadena ligera que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y una cadena pesada que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.
7. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el maitansinoide es DM4.
8. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el uso consiste esencialmente en administrar una composición farmacéutica que comprende dicho inmunoconjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde un principio activo de dicha composición consiste esencialmente en dicho inmunoconjugado.
9. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el inmunoconjugado ha de administrarse intravenosamente.
10. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la enfermedad se asocia a dolores de huesos y/o complicaciones óseas y en donde la administración de dicho inmunoconjugado reduce dichos dolores de huesos y/o complicaciones óseas, preferentemente a un nivel aceptable.
11. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el paciente se identifica como que no responde o responde deficientemente al tratamiento con uno o más agentes citotóxicos incluyendo inmunomoduladores y/o inhibidores del proteasoma.
12. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el paciente muestra niveles de sCD138 en su plasma de más de 50 ng/ml.
13. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el paciente se está tratando con al menos un agente citotóxico.
14. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, un inhibidor del proteasoma, un inmunomodulador o un agente anti-angiogénico, un agente alquilante de ADN o una mezcla de dos o más de los mismos.
15. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde el agente

citotóxico es bortezomib, pomalidomida, talidomida, lenalidomida, melfalan o una mezcla de dos o más de los mismos.

FIG. 1

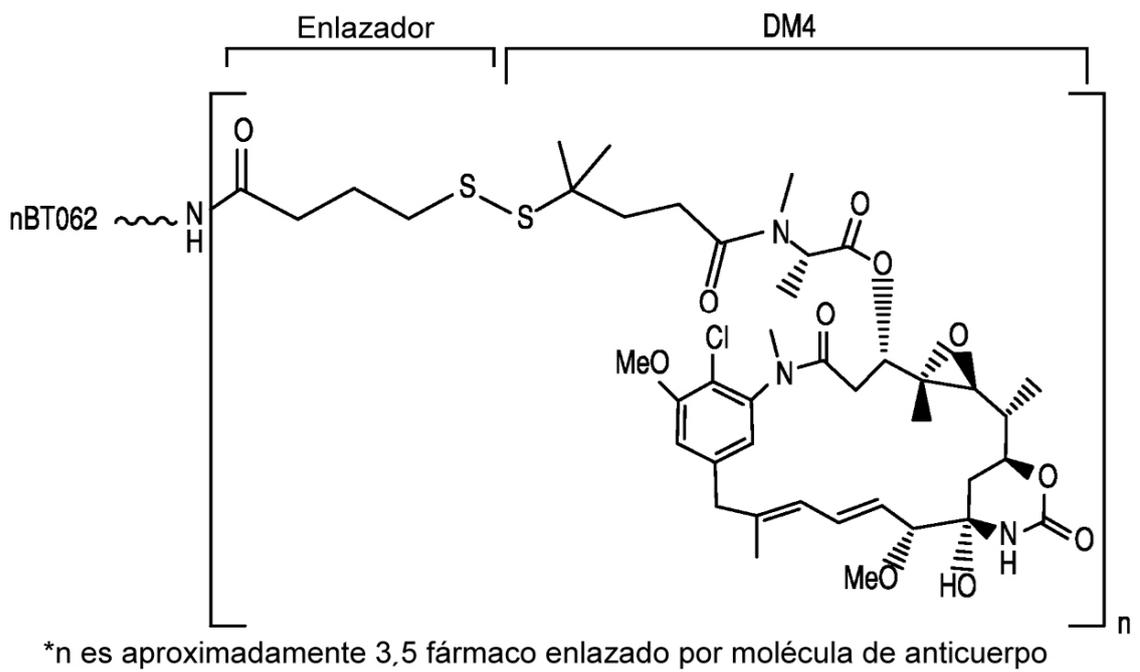
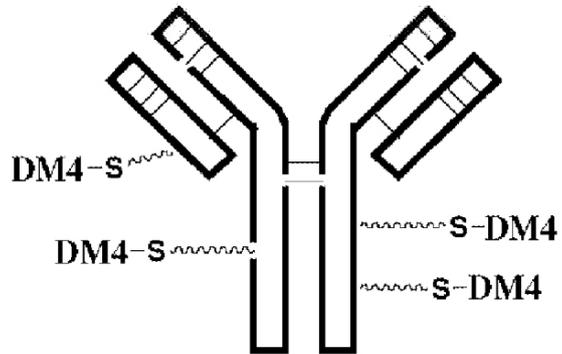


FIG. 2

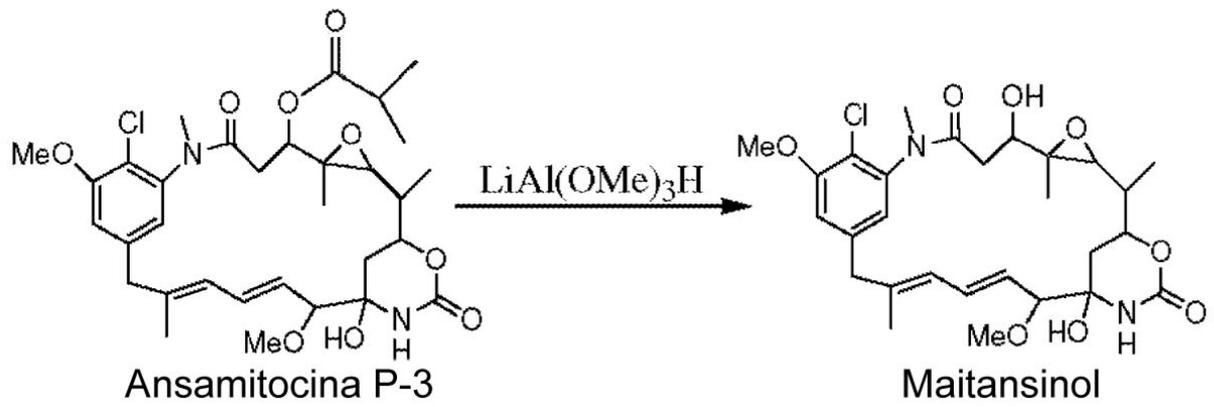
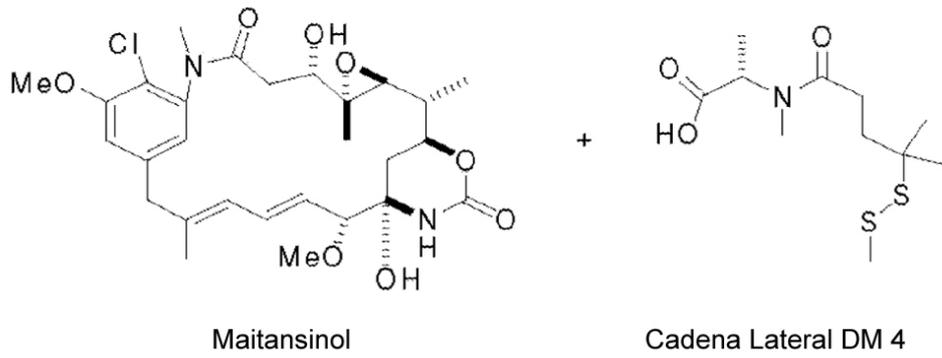


FIG. 3



Etapa I

1) DCC, ZnCl₂, CH₂Cl₂
2) Cromatografía

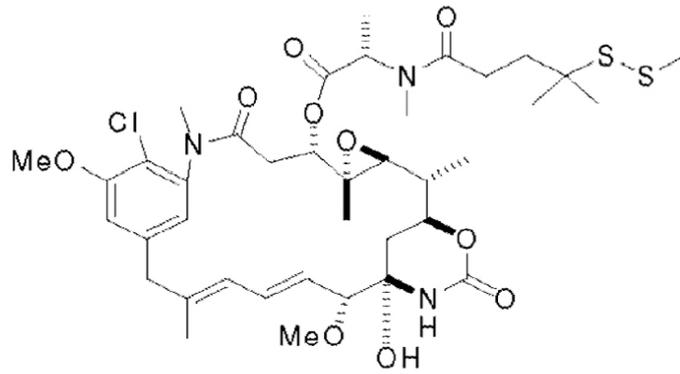
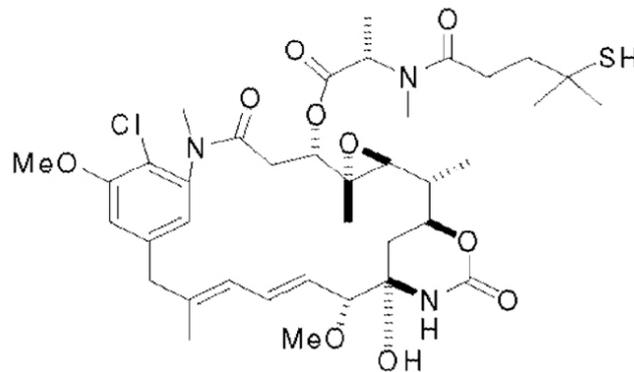


FIG. 4

Etapa II

1) DTT, DME, amortiguador de fosfato
2) Cromatografía



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

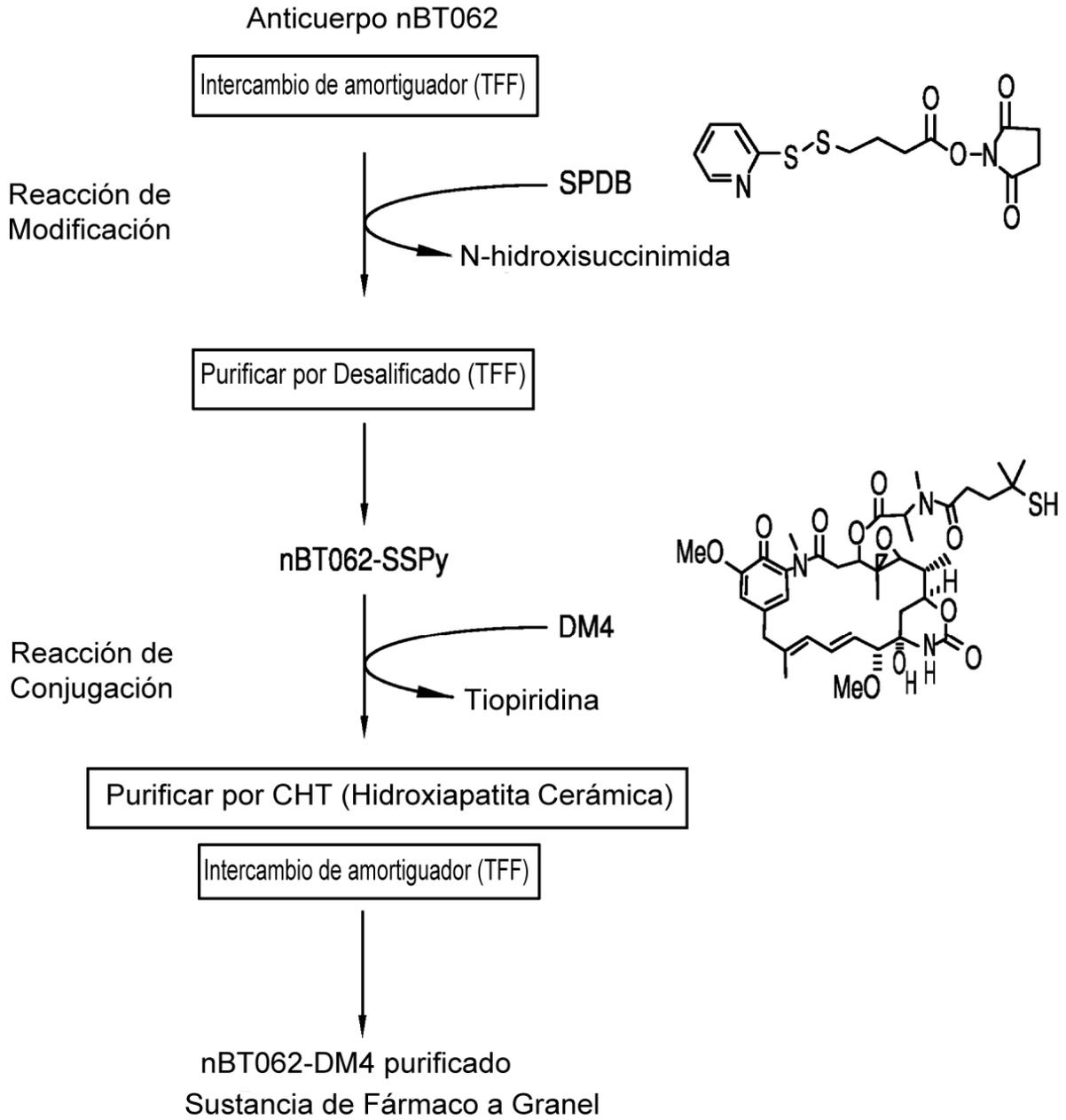


FIG. 5

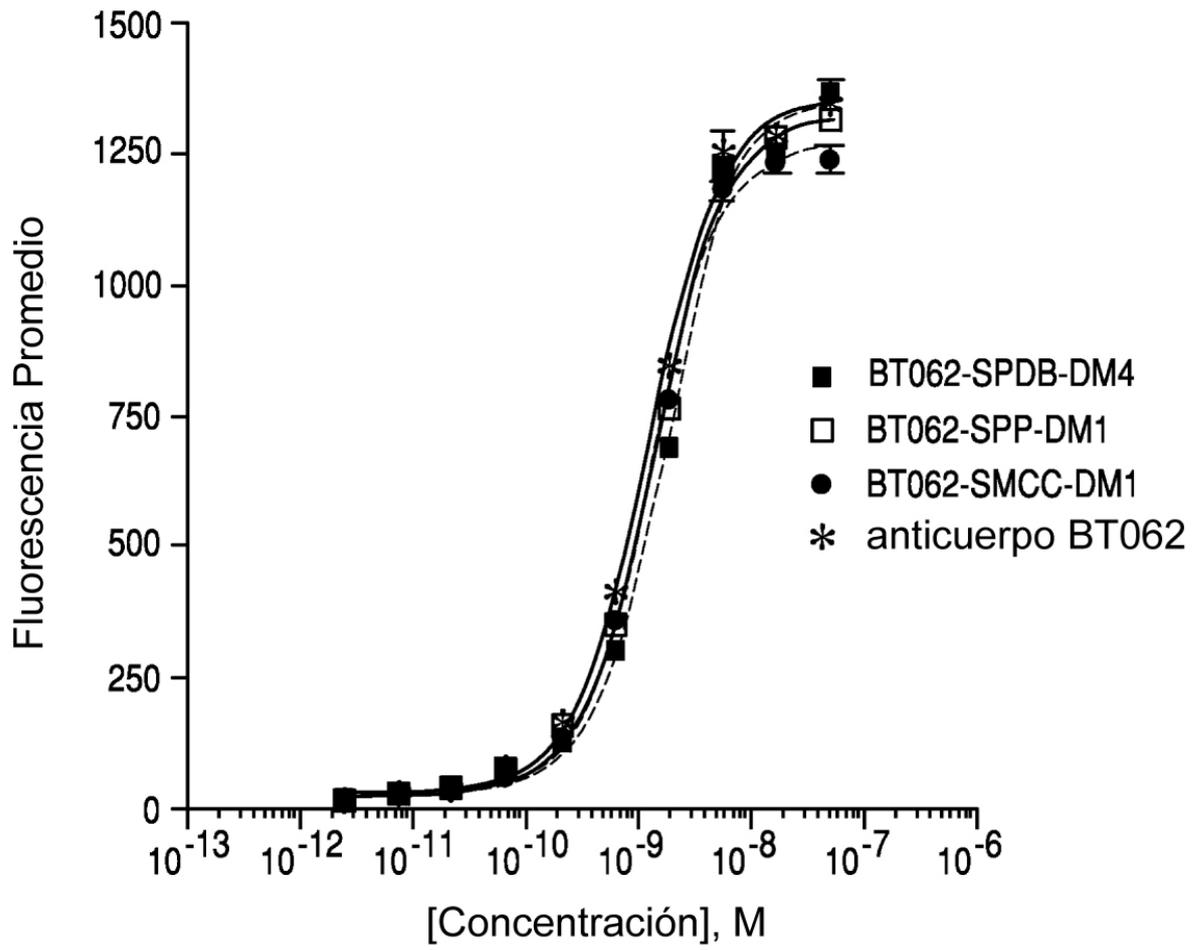


FIG. 6

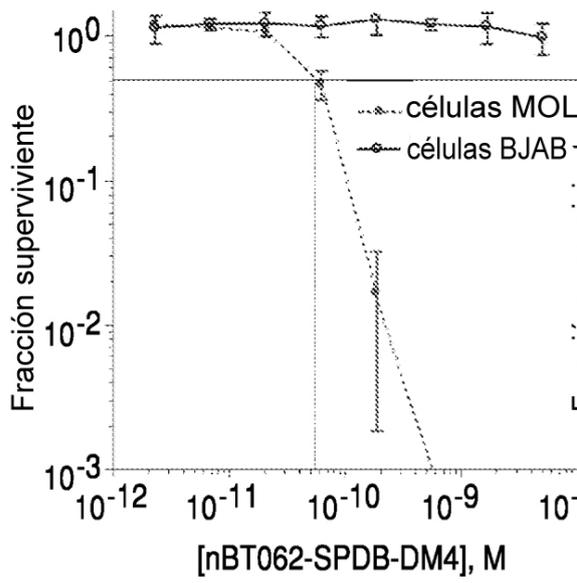


FIG. 7A

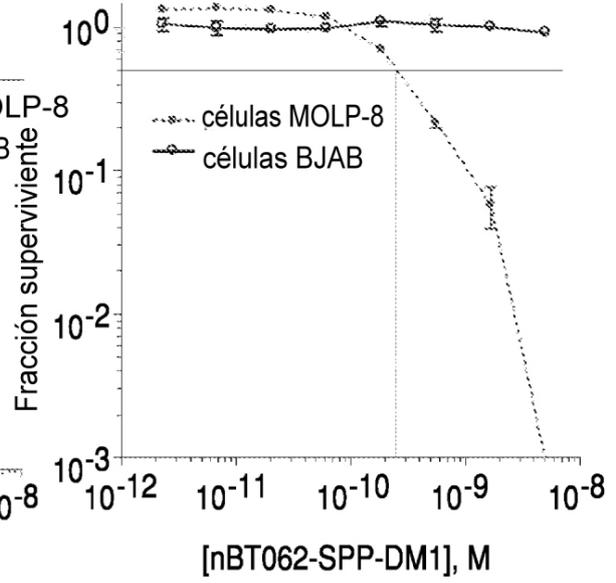


FIG. 7B

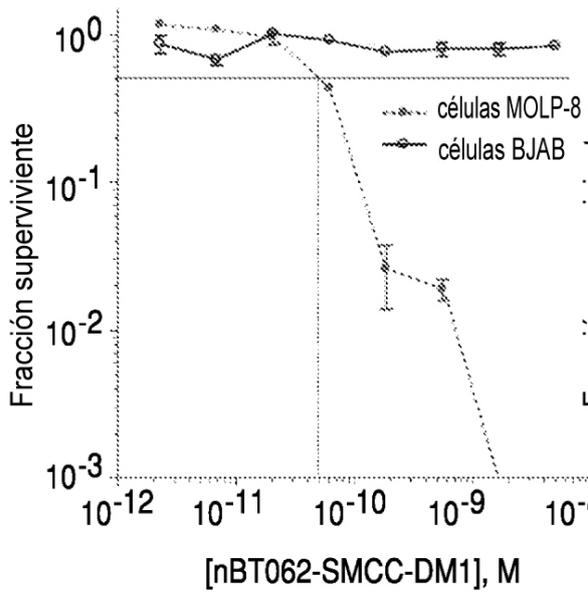


FIG. 7C

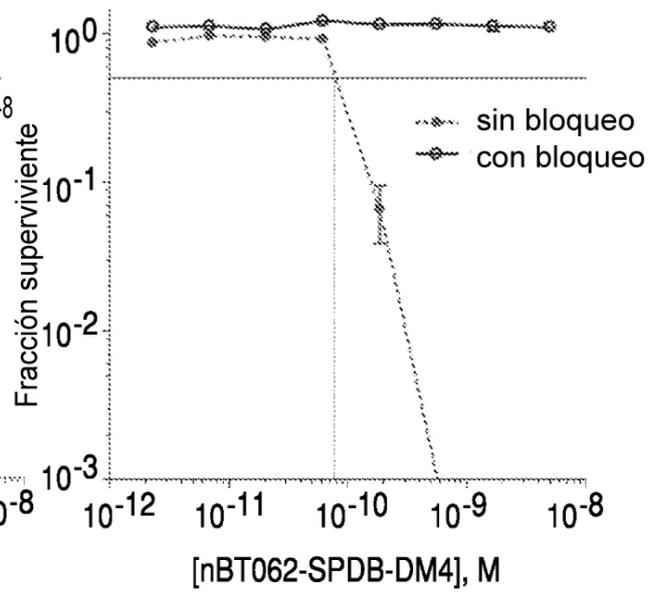


FIG. 7D

PBS, 200 μ L/ratón, bolo iv sencillo

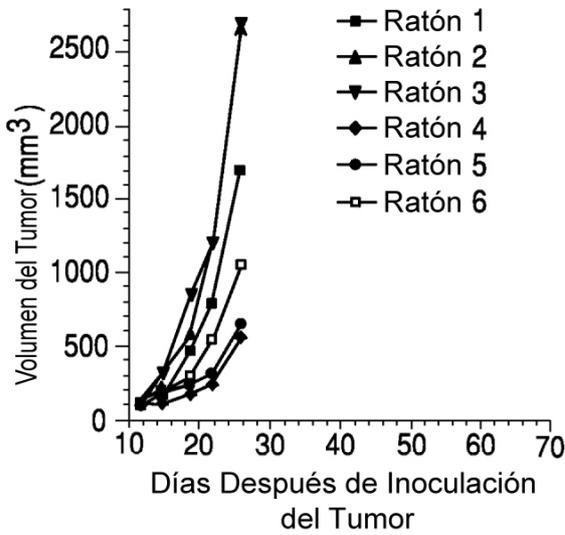


FIG. 8A

anticuerpo nBT062, 13.8 mg/kg, bolo iv sencillo

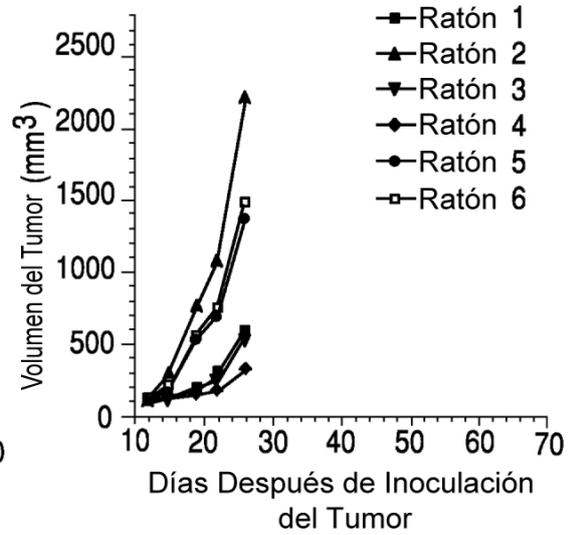


FIG. 8B

DM4, 250 μ g/kg, bolo iv sencillo

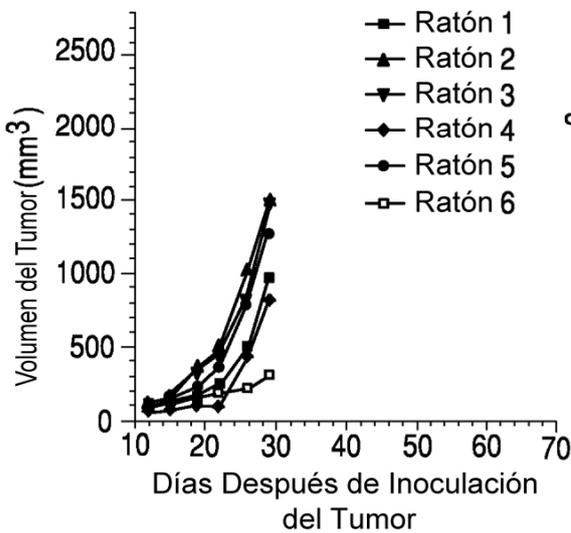


FIG. 8C

huC242-DM4, 250 μ g/kg, bolo iv sencillo

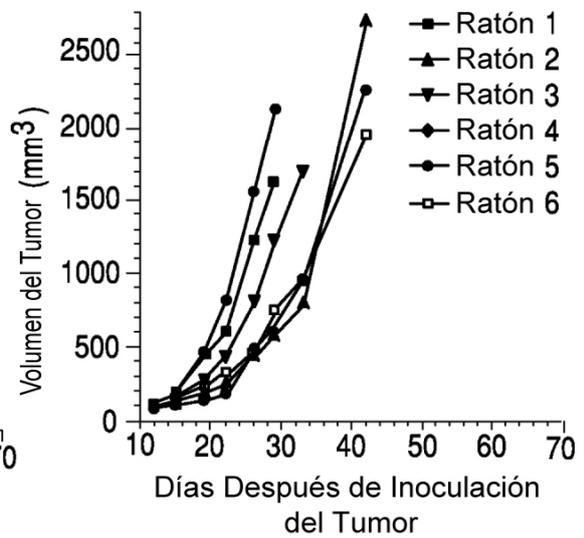


FIG. 8D

PBS, 200 μ L/ratón, bolo iv sencillo

nBT062-SPDB-DM4, 250 μ g/kg, bolo iv sencillo

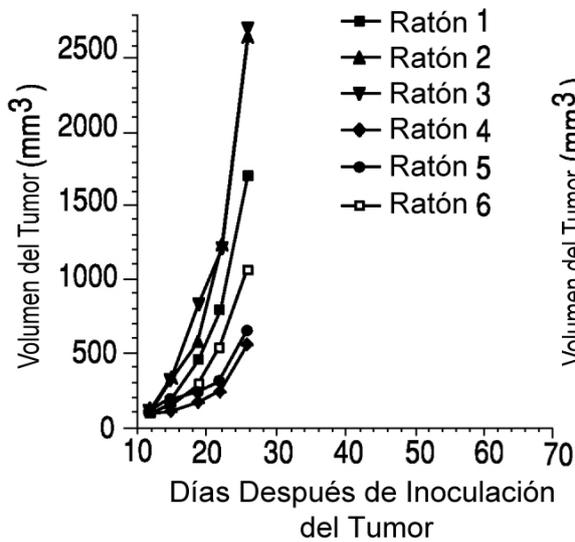


FIG. 9A

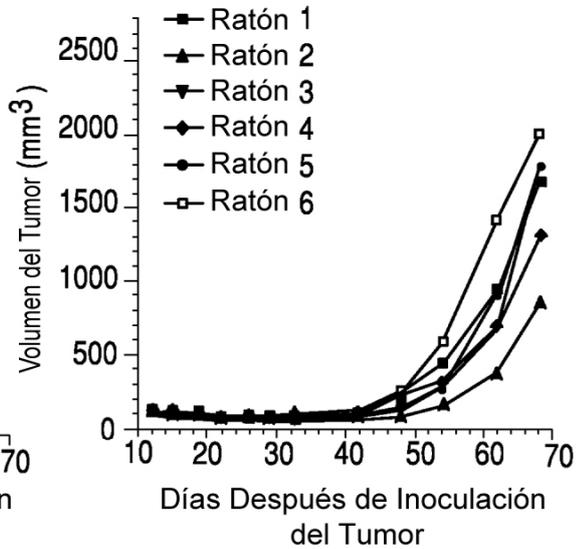


FIG. 9B

B-B4-SPP-DM1, 250 μ g/kg, bolo iv sencillo

nBT062-SPP-DM1, 250 μ g/kg, bolo iv sencillo

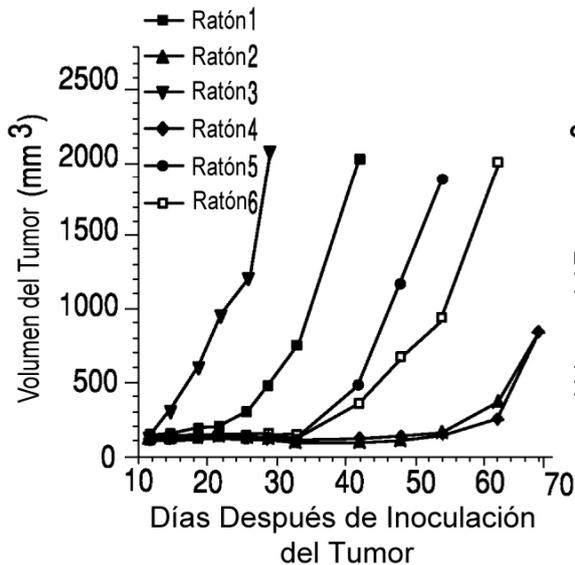


FIG. 9C

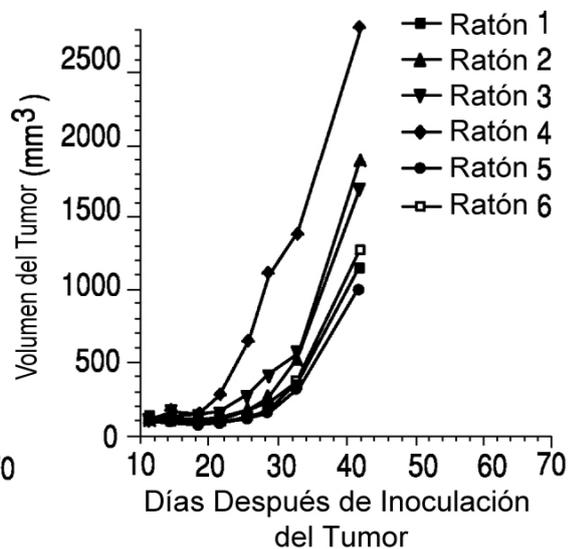


FIG. 9D

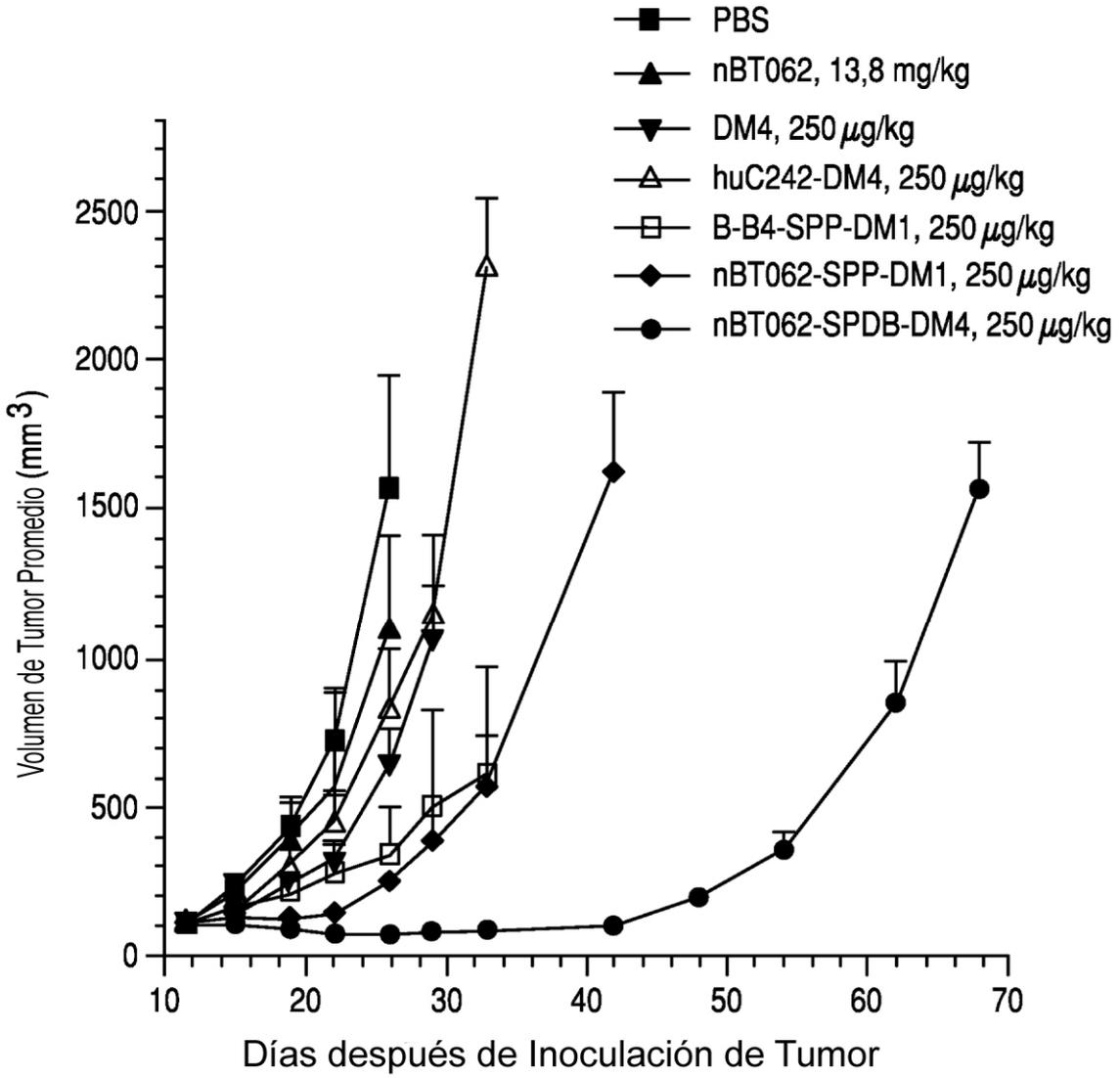


FIG. 10

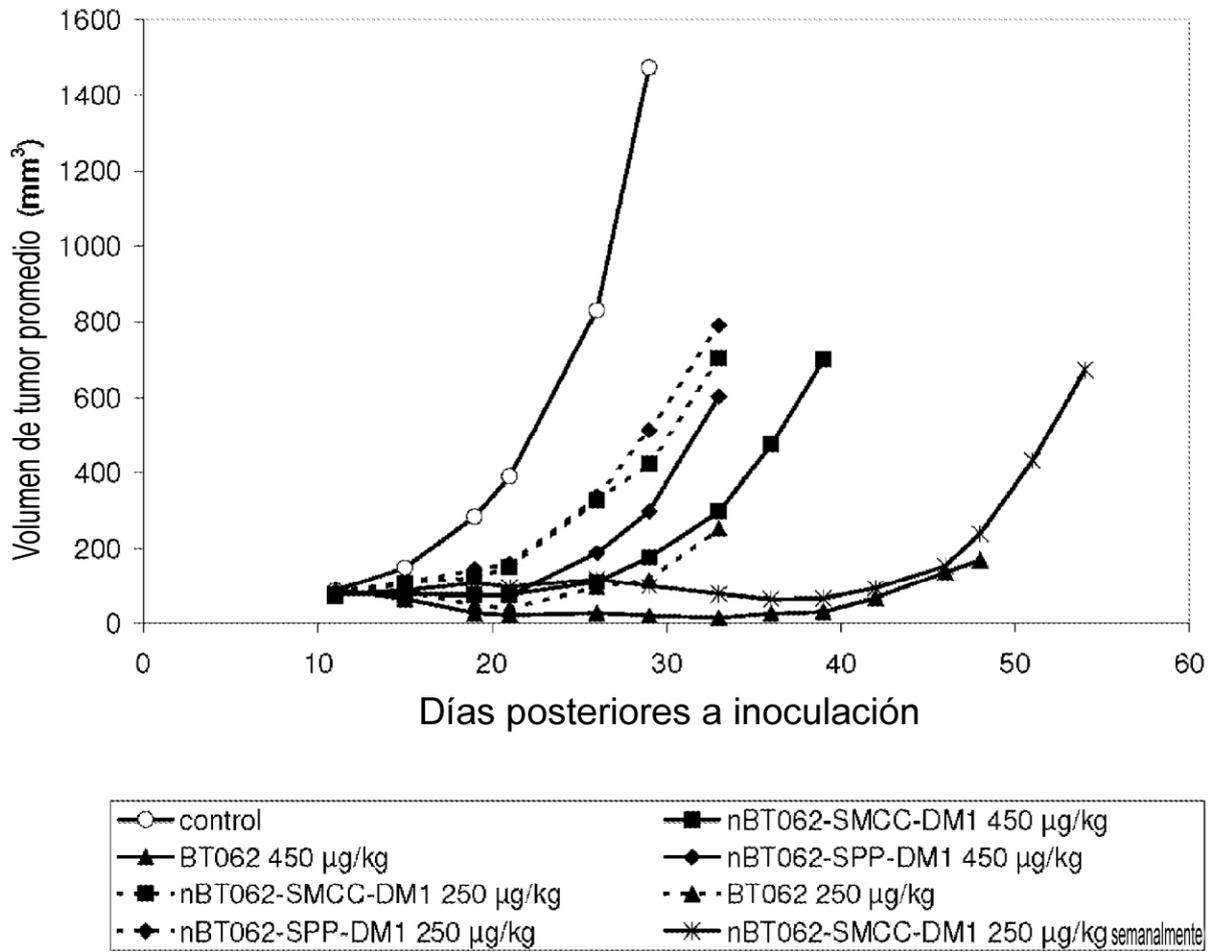


FIG. 11A

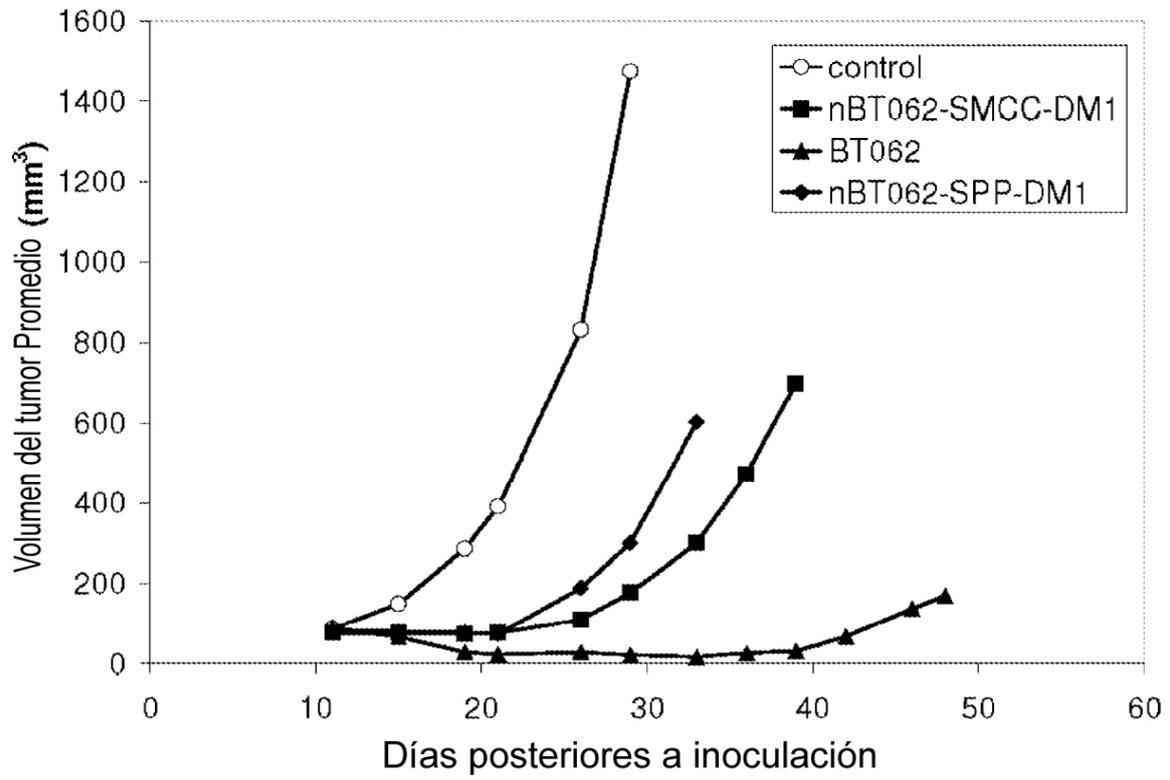


FIG. 11B

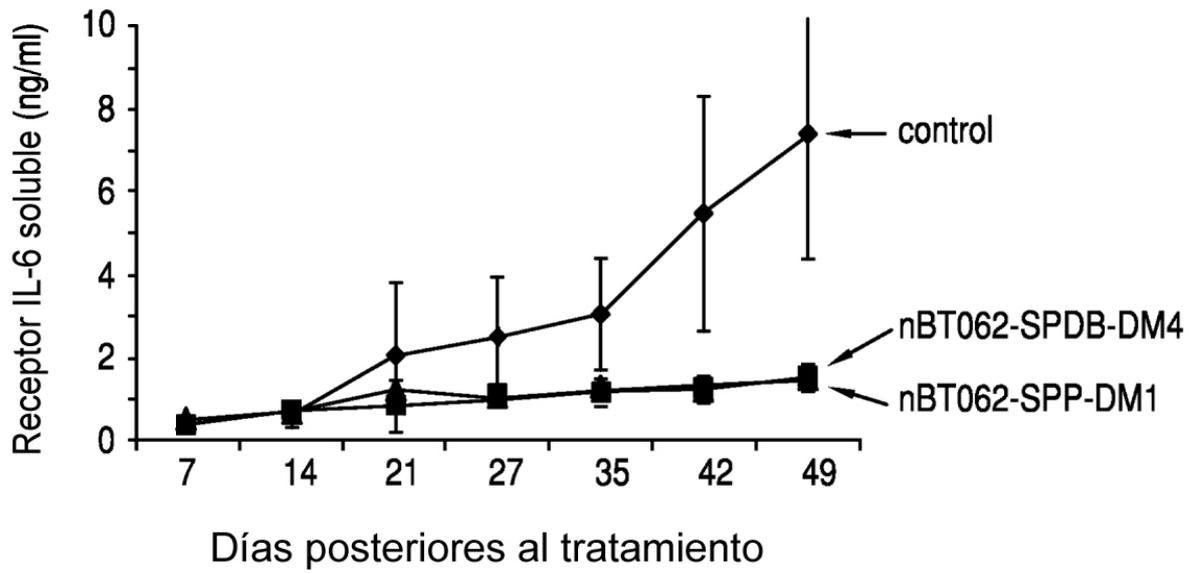


FIG. 12

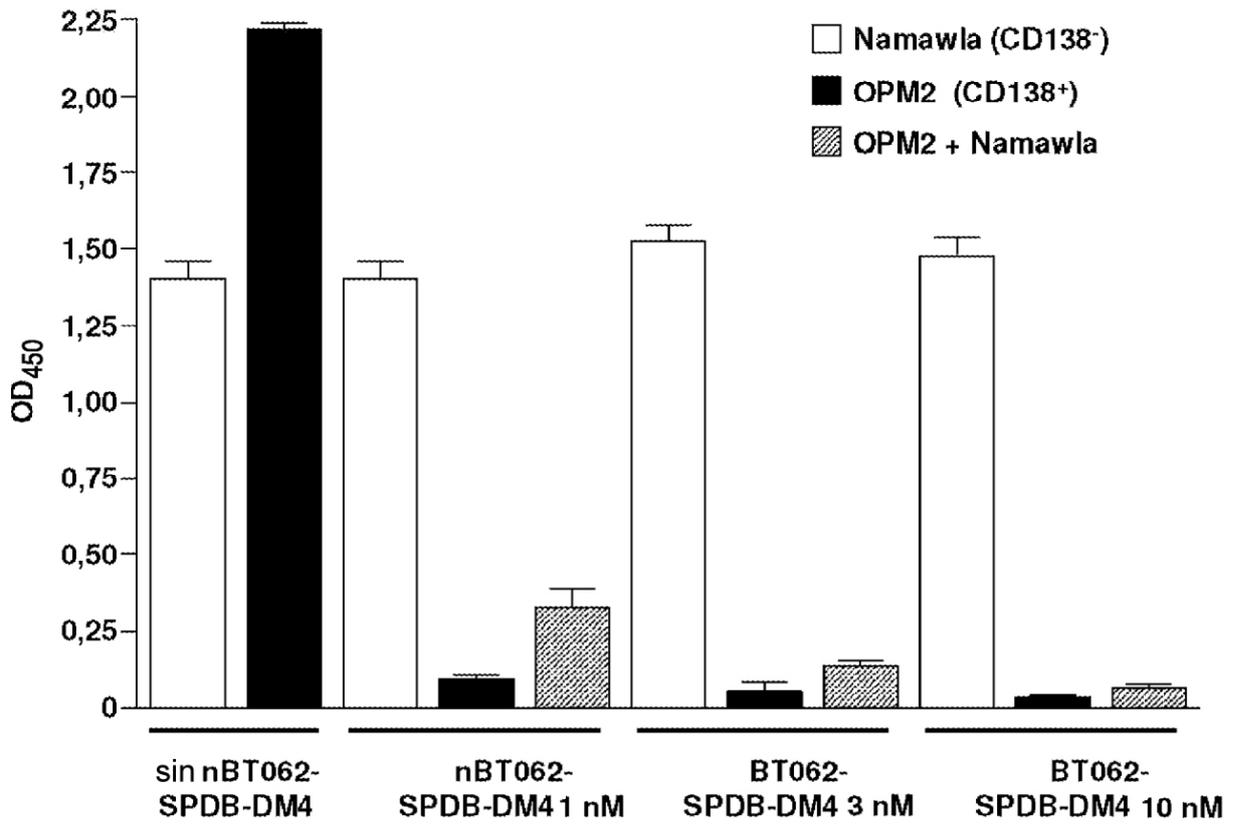
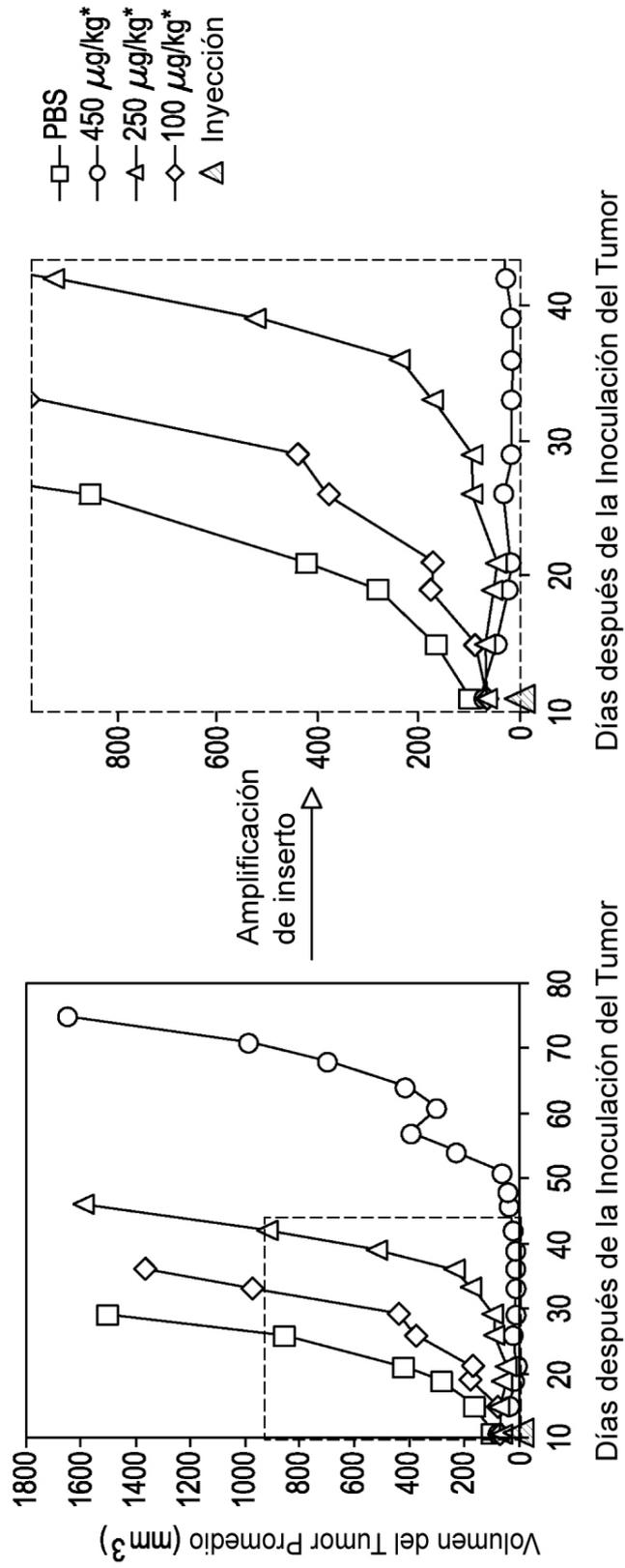


FIG. 13

FIG. 14



Carcinoma de Xenoinjerto de páncreas

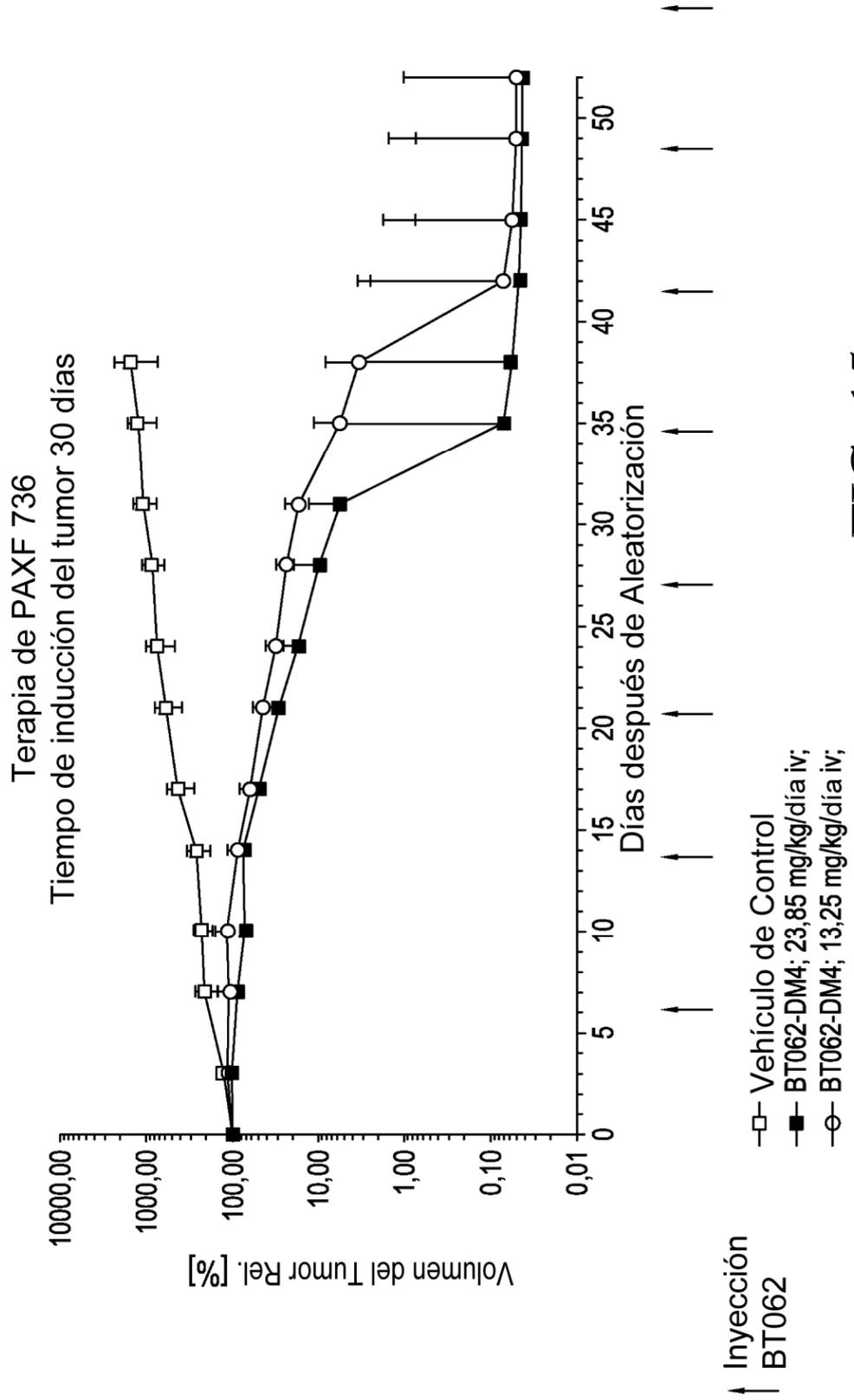


FIG. 15

Carcinoma mamario-xenoinjerto

Terapia de MAXF 1322

Tiempo de inducción del tumor 31 días

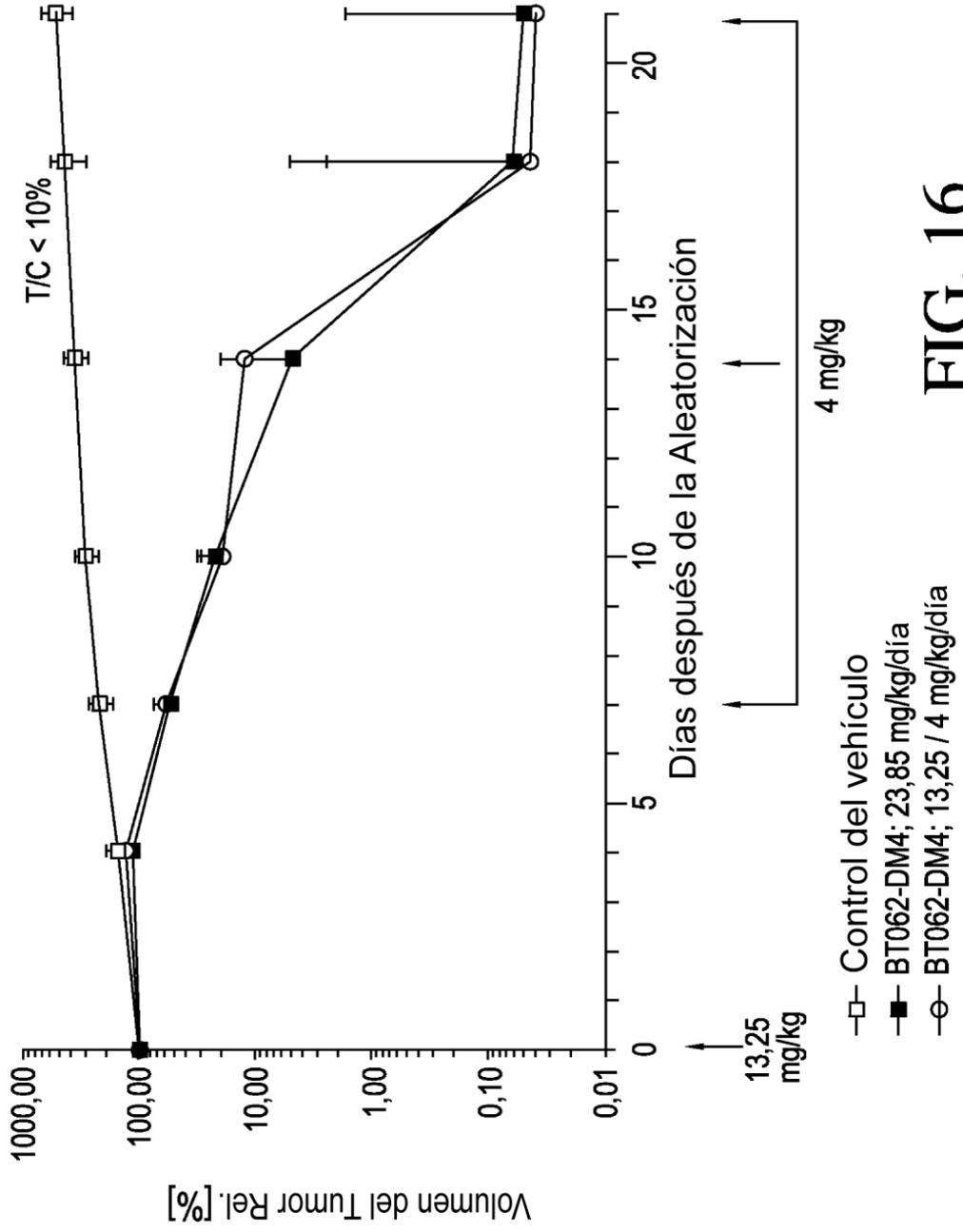


FIG. 16

FIG. 17

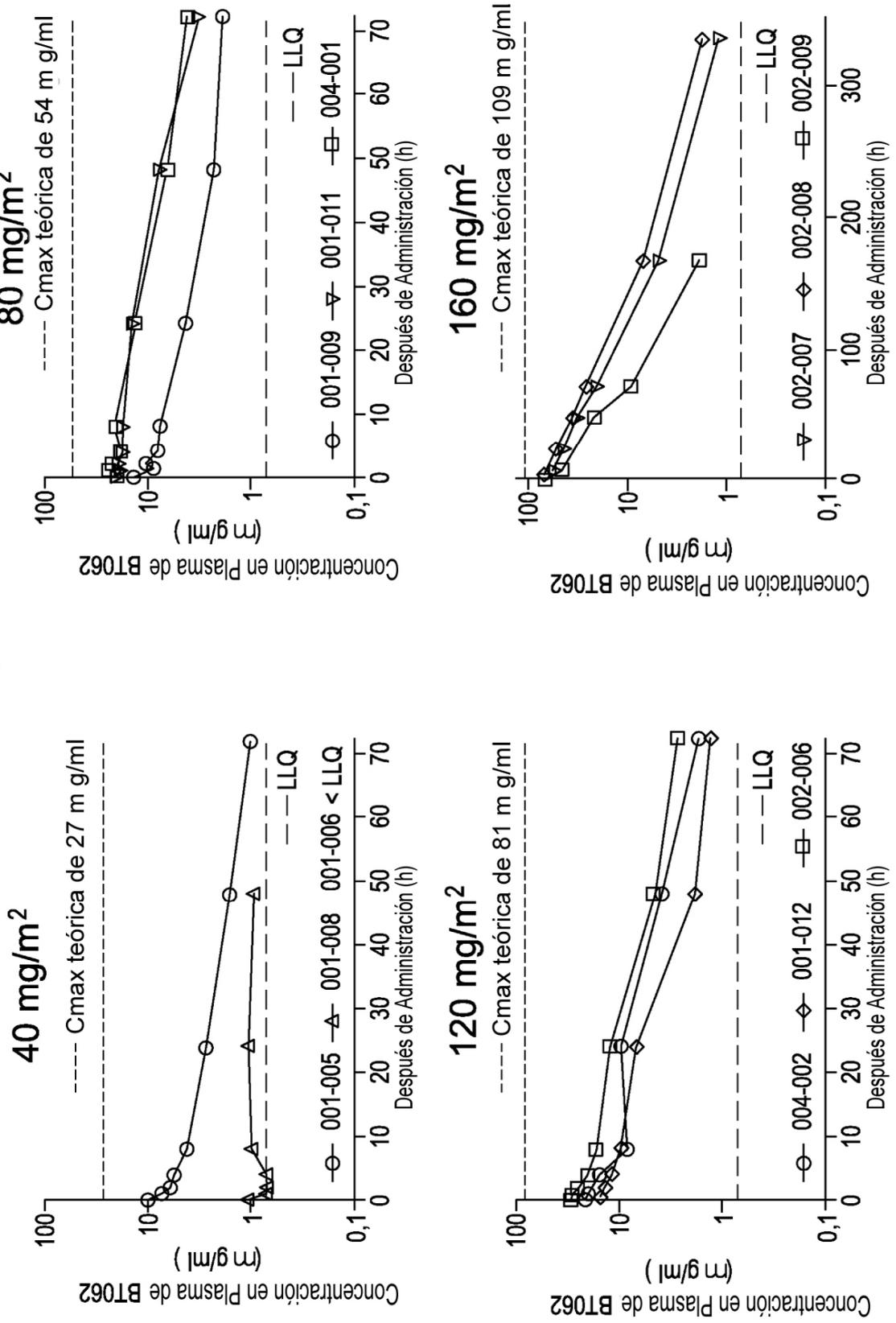


FIG. 18

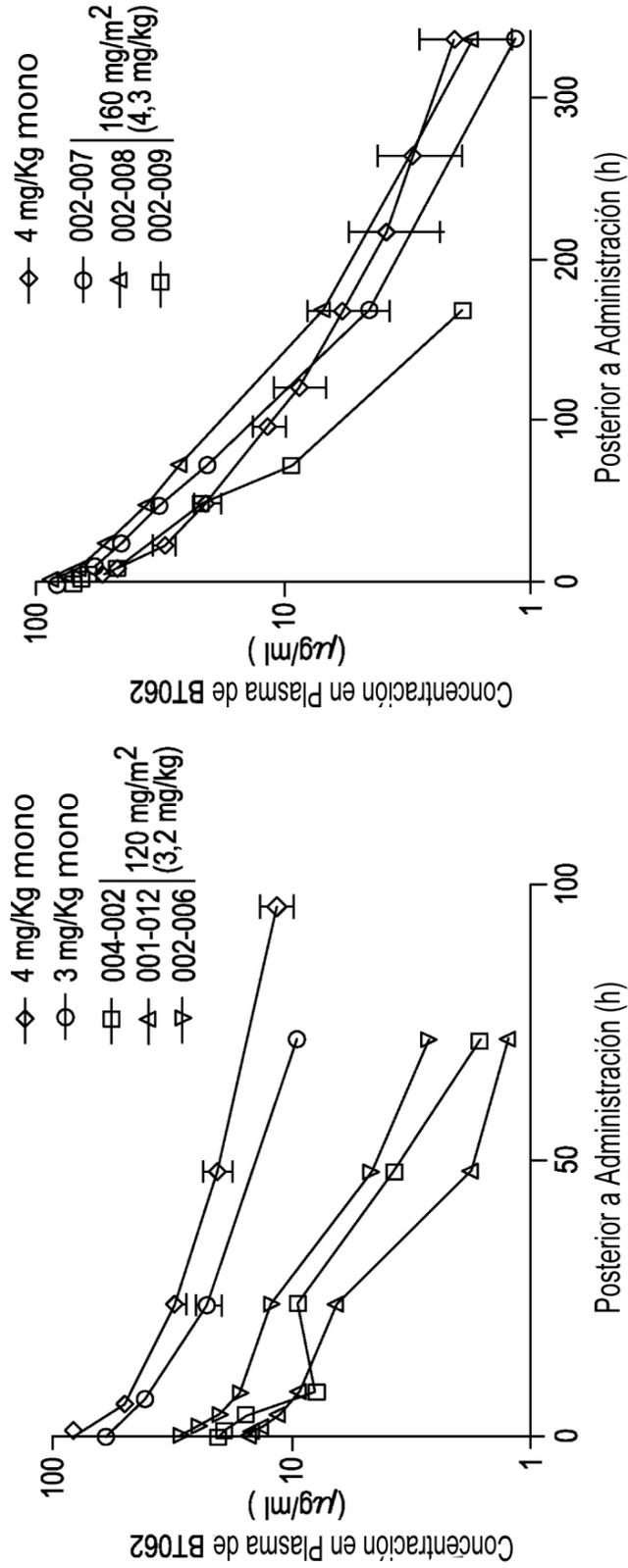


FIG. 19

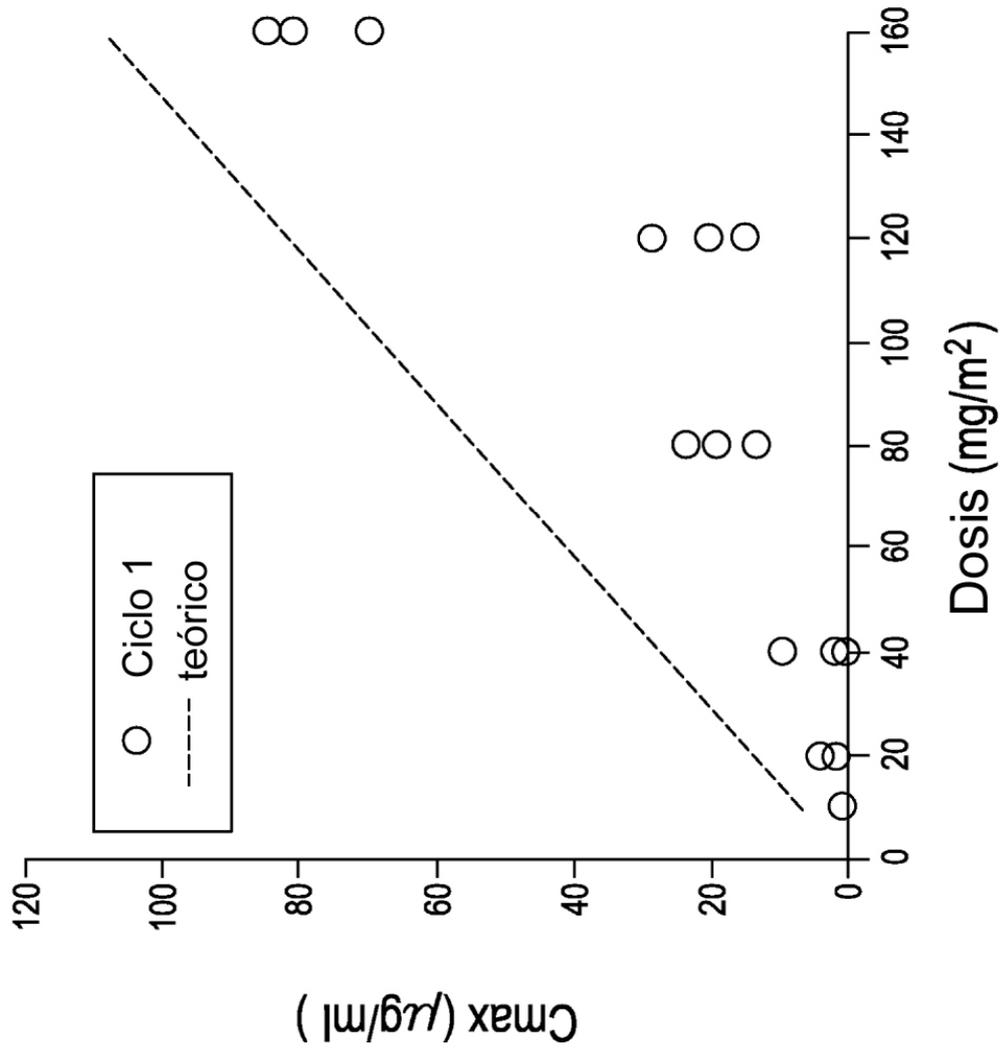


FIG. 20

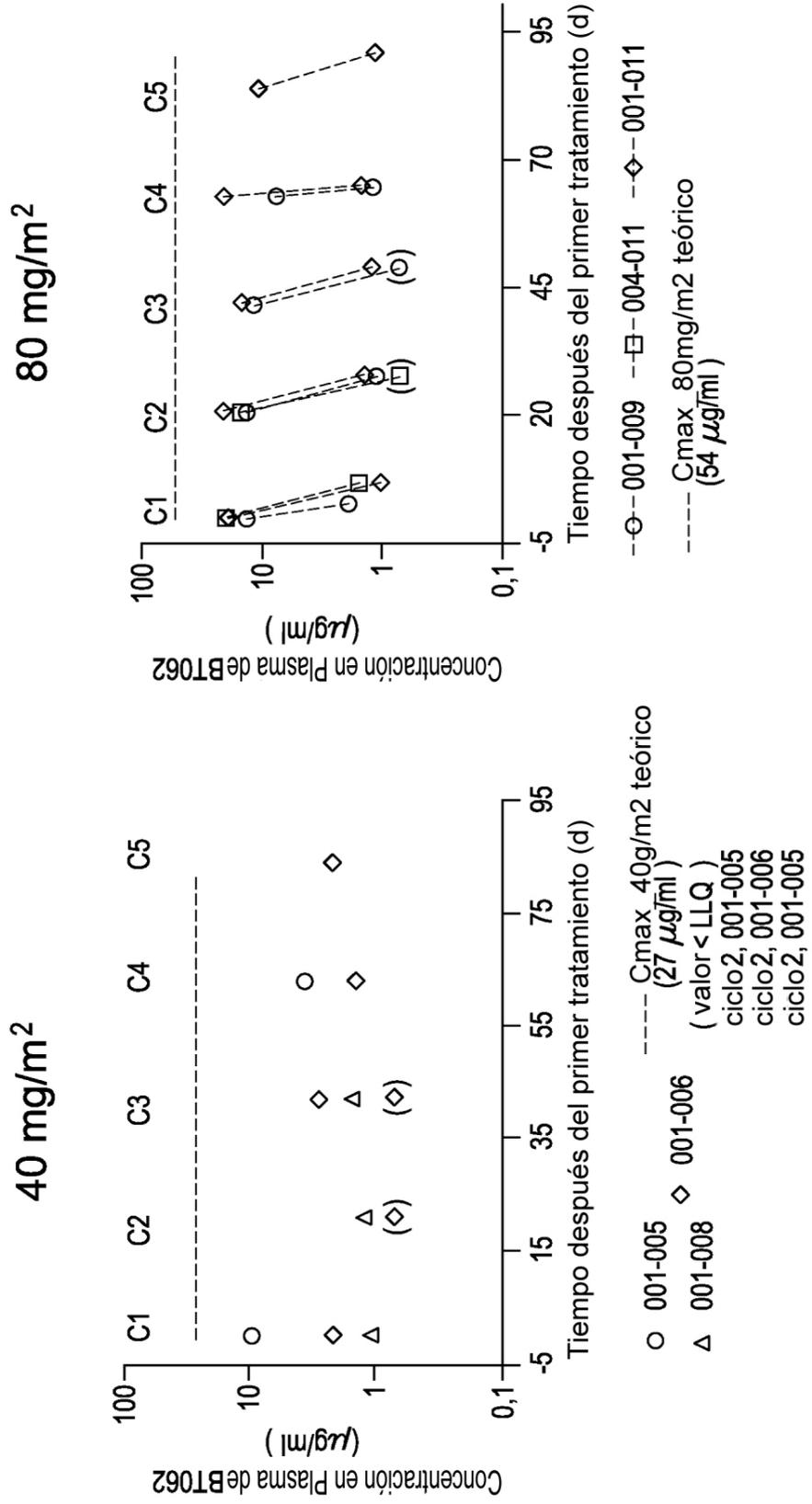


FIG. 21

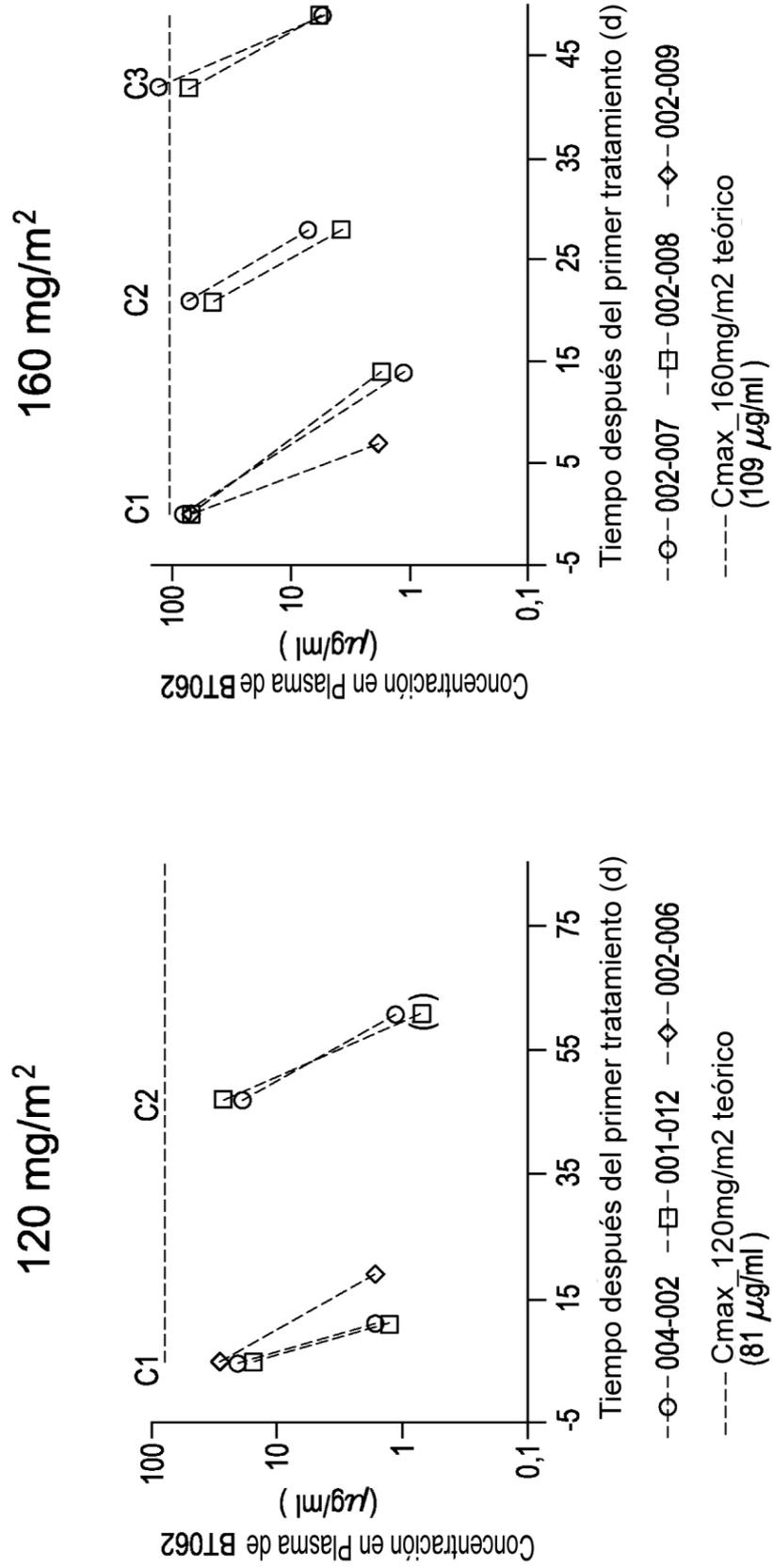


FIG. 22

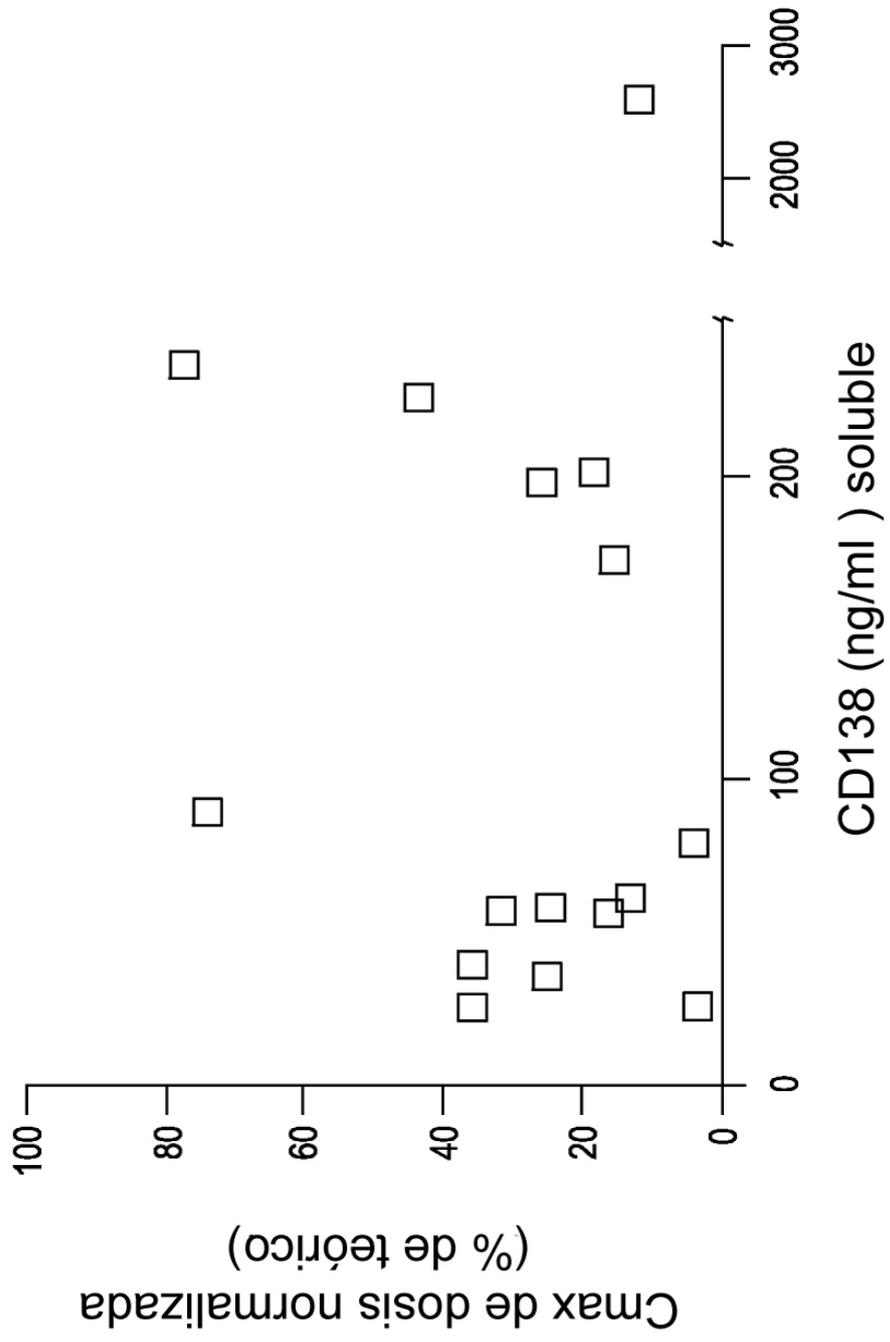
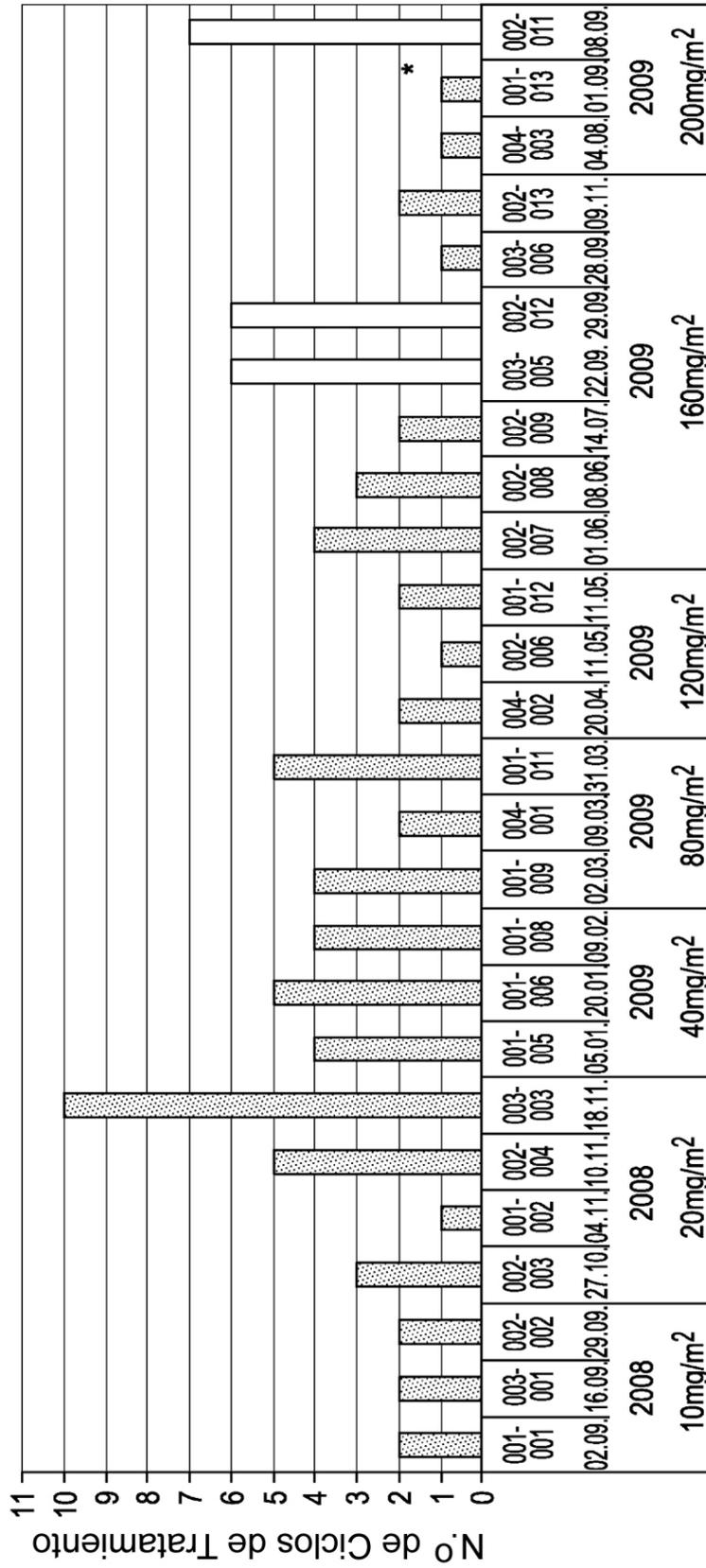


FIG. 23



*= sujeto 02-11 recibió la primera dosis a 200 mg/m² y todas las dosis después de 1 ciclo a 160 mg/m²

FIG. 24

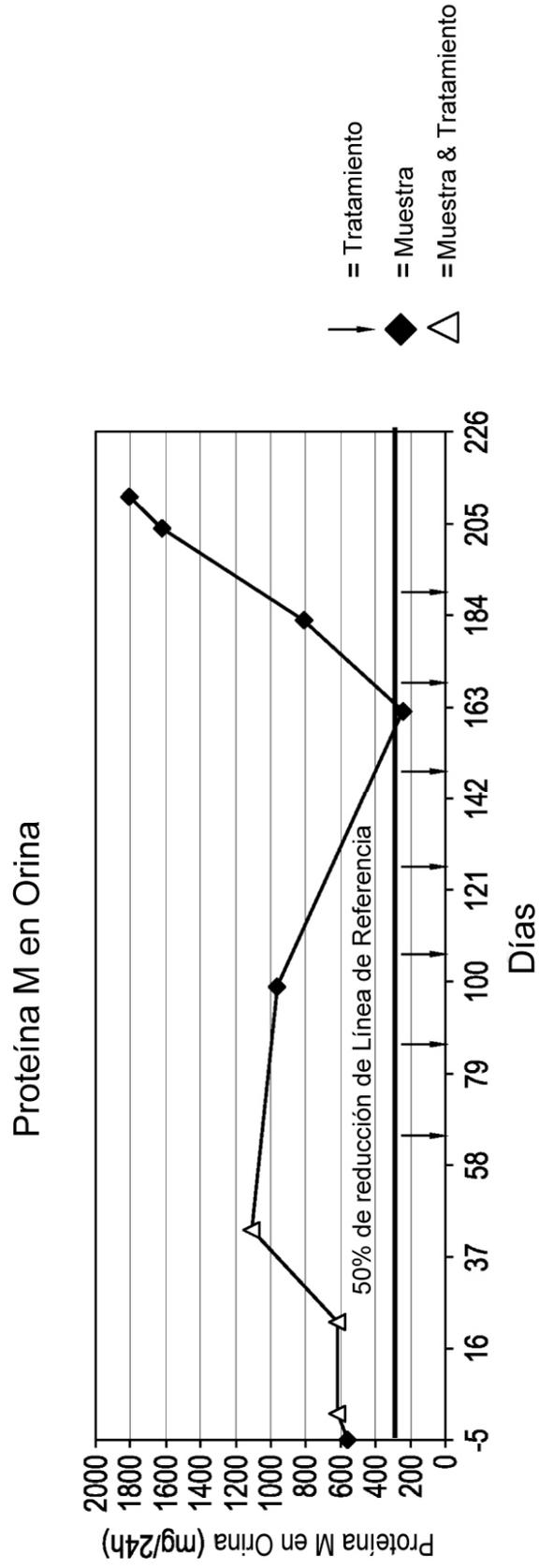


FIG. 25

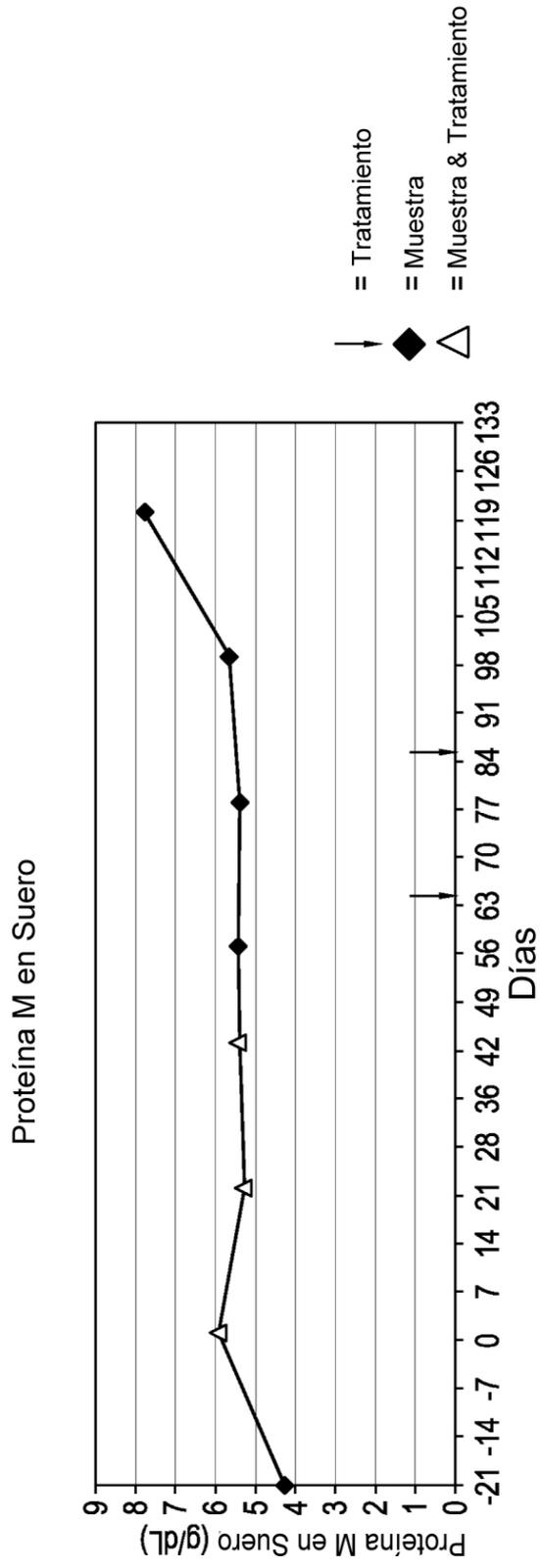


FIG. 26

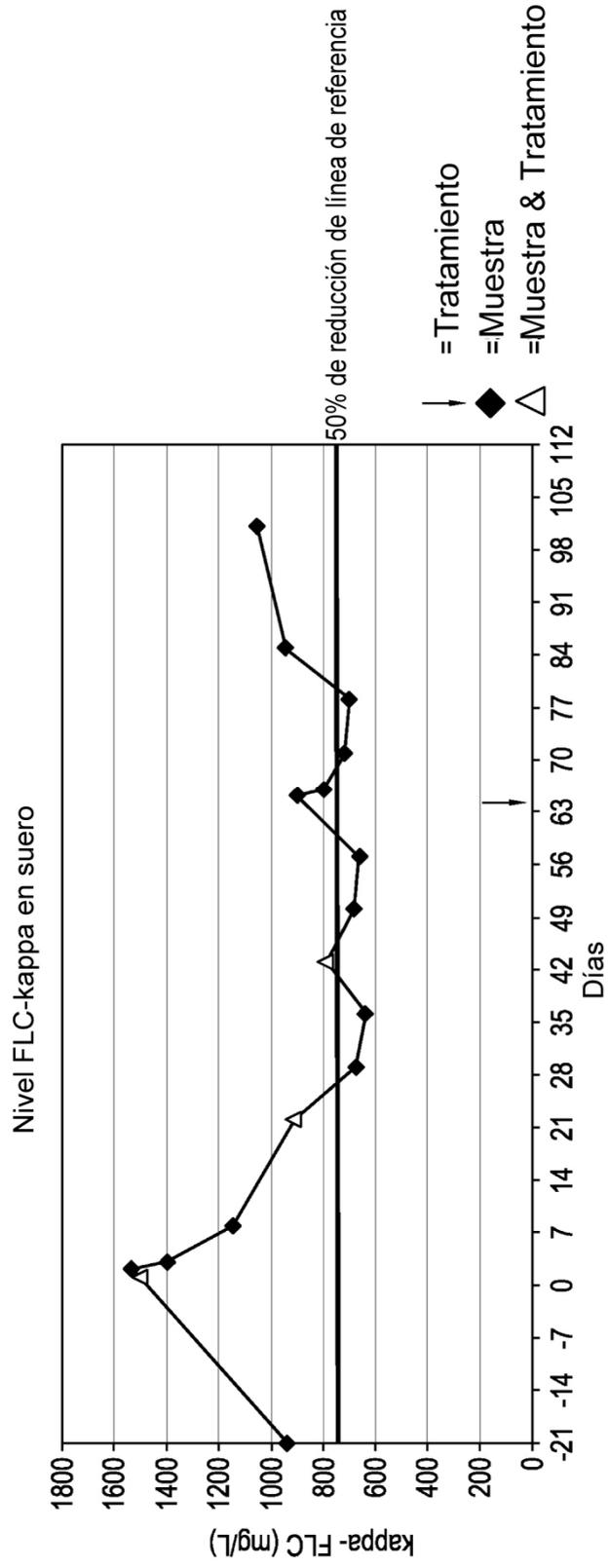
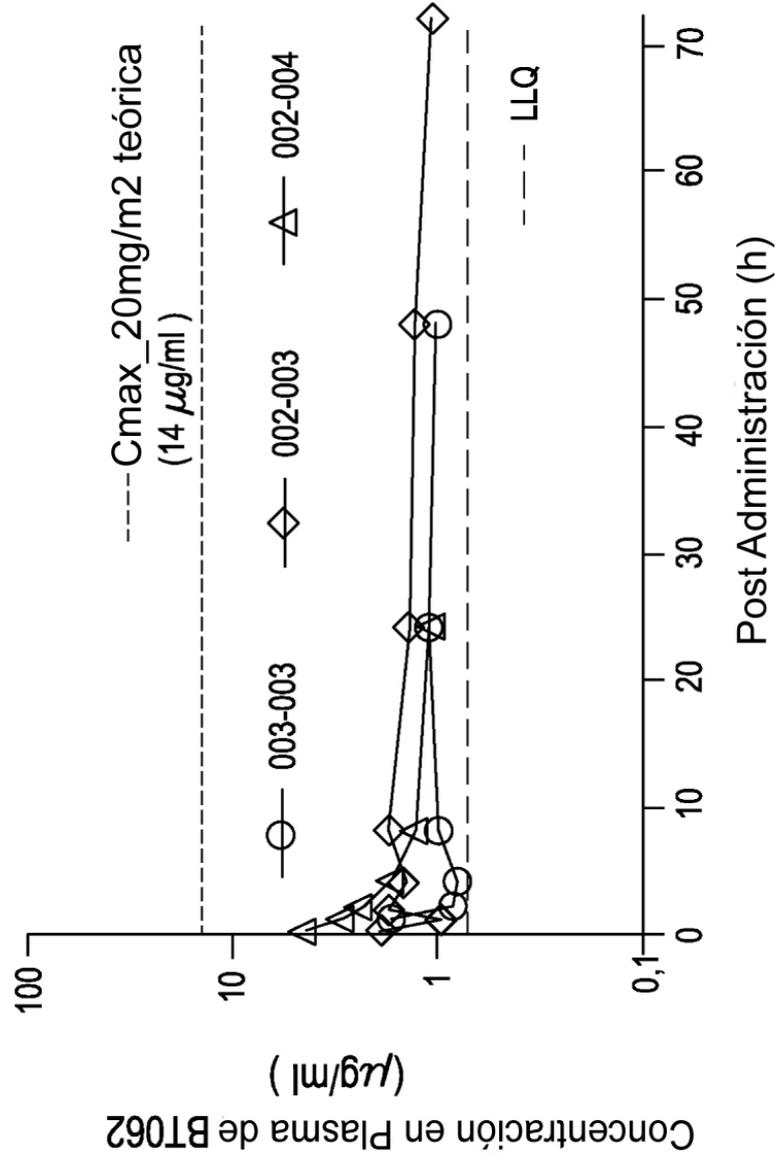


FIG. 27



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

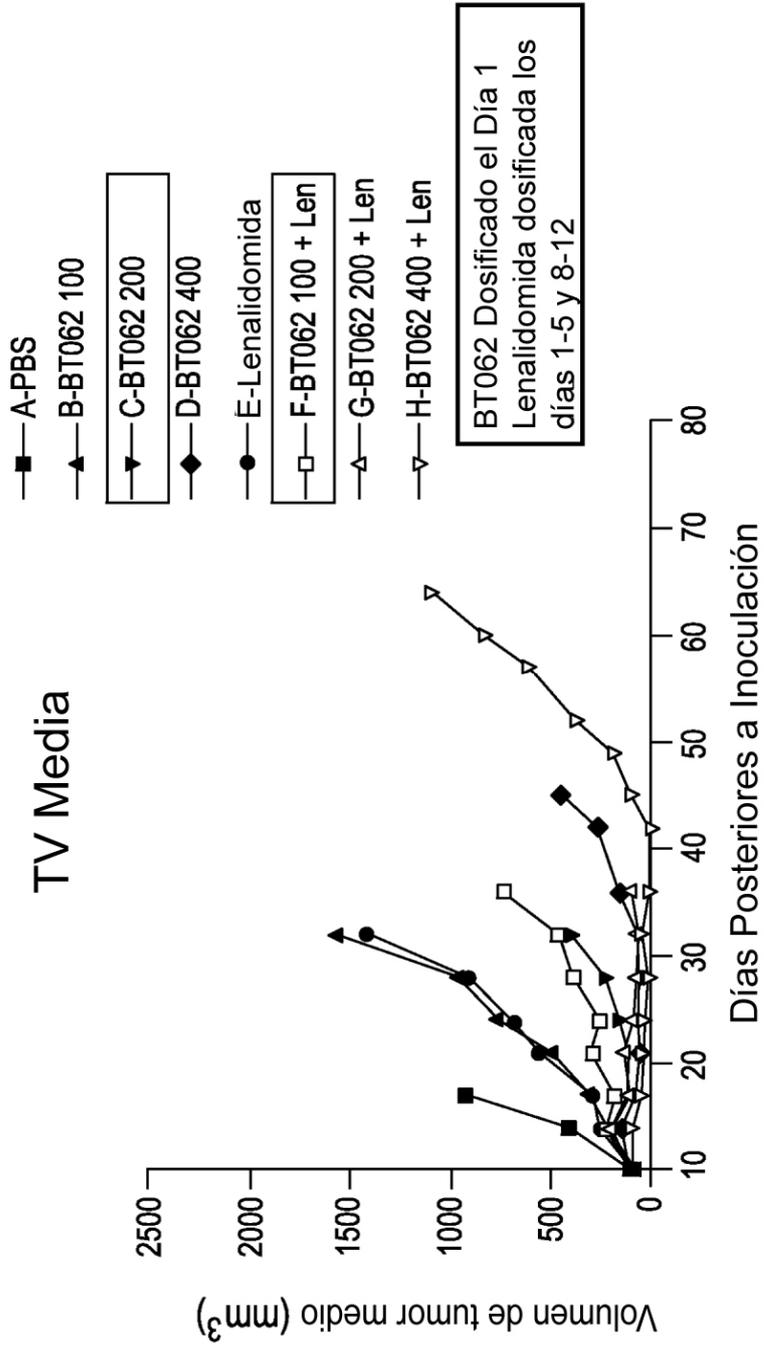


FIG. 28

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

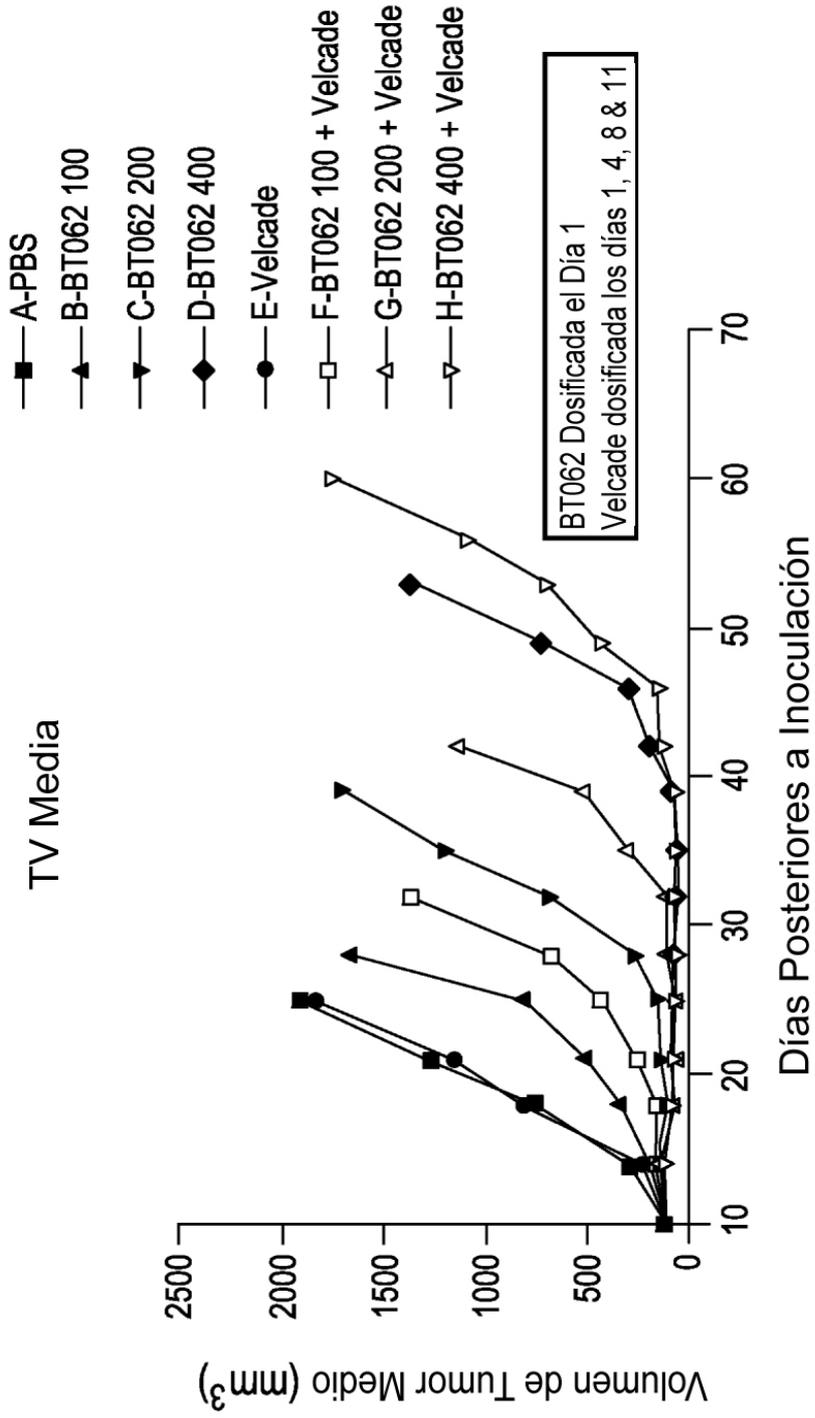


FIG. 29

Tratamiento de combinación de BT062 con Melfalán:
Mieloma RPMI Modelo de Xenoinjerto

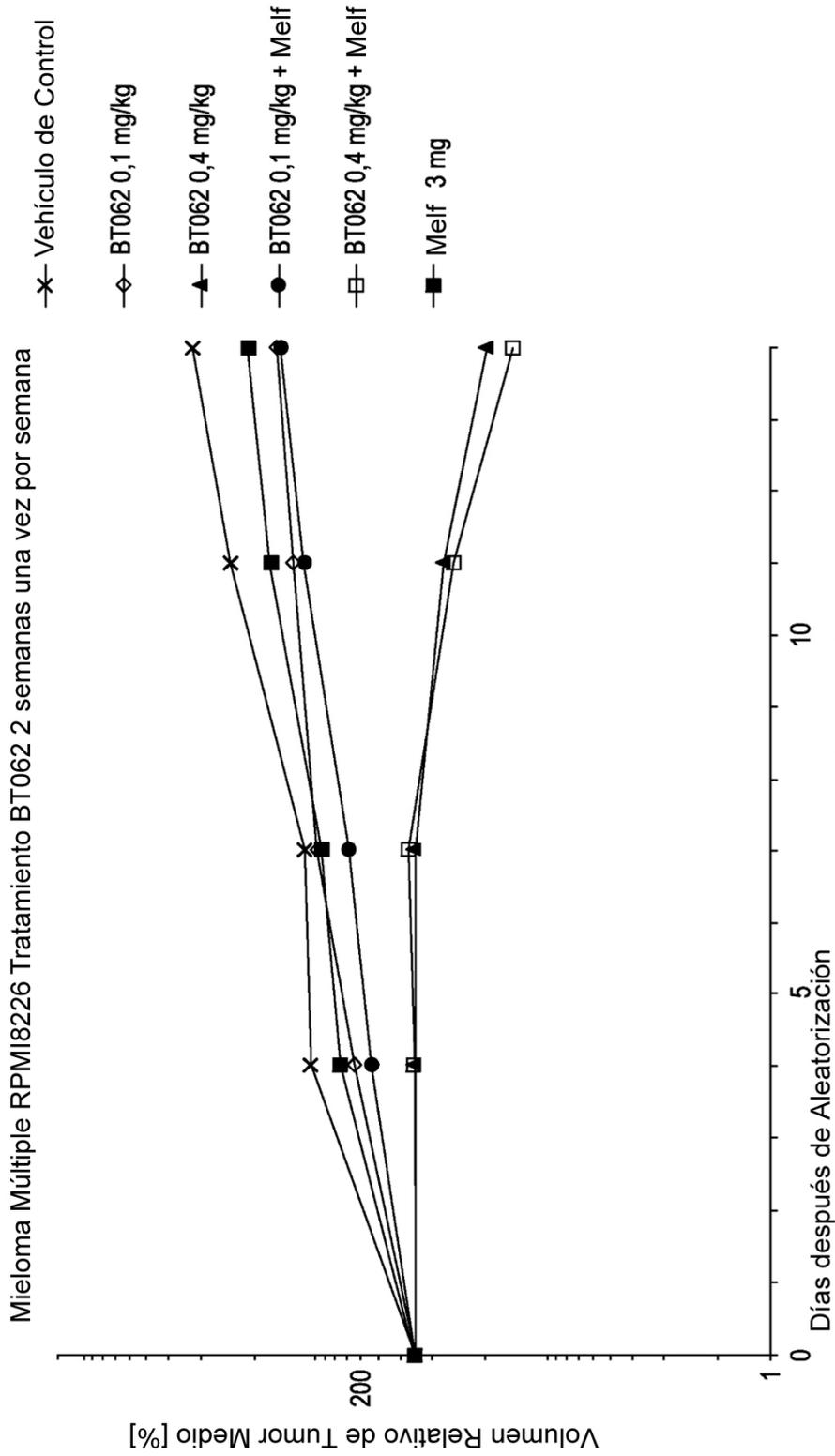


FIG. 30