

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 201**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 08863602 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014** **EP 2238168**

54 Título: **Agentes dirigidos contra CD138 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.12.2007 US 16630 P

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

10.07.2014

73 Titular/es:

**BIOTEST AG (100.0%)
LANDSTEINERSTR. 5
63303 DREIEICH, DE**

72 Inventor/es:

**KRAUS, ELMAR;
BRUECHER, CHRISTOPH;
DAELKEN, BENJAMIN;
GERMER, MATTHIAS;
ZENG, STEFFEN;
OSTERROTH, FRANK;
UHEREK, CHRISTOPH y
AIGNER, SILKE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 475 201 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes dirigidos contra CD138 y usos de los mismos

5 Referencia cruzada con otras solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de propiedad de la solicitud provisional de EE. UU. 61/016.630, presentada el 26 de diciembre de 2007.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes mejorados dirigidos contra el antígeno CD138 así como las composiciones que comprenden el agente dirigido y los métodos que los emplean.

15 Antecedentes

El antígeno CD138, que actúa como receptor para la matriz extracelular, está sobre-expresado en las células del mieloma múltiple (MM) y se ha demostrado su influencia en el desarrollo celular del MM y/o su proliferación. El CD138 se expresa también en células del carcinoma ovárico, carcinoma de riñón, carcinoma de vesícula, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma de colon y en células de los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL) por mencionar algunos.

Por conveniencia, las publicaciones y otros materiales, incluyendo patentes, que se referencian en el presente documento están referenciadas por nombre y fecha y/o están enumeradas alfabéticamente por autor en la bibliografía adjunta.

Tassone y col. (2004) han informado de la unión excelente del anticuerpo IgG1 B-B4 murino con el antígeno CD138 que se expresa en la superficie de las células de MM. Tassone también informa de la alta actividad citotóxica del inmunoconjugado B-B4-DM1, que comprende el maitansinoide DM1 como molécula efectora, contra las células del mieloma múltiple (véase también la Patente Publicada de EE. UU. 2007 0183971).

Sigue existiendo la necesidad de un agente dirigido, en particular un anticuerpo dirigido basado en B-B4 al que le falten ciertas propiedades y/o funciones asociadas con el B-B4. Tal anticuerpo dirigido puede comprender una o más regiones del anticuerpo que sea de un anticuerpo humano. Existe, en particular, la necesidad de un anticuerpo quimerizado basado en B-B4 que se una al CD138 como un B-B4 eficaz pero que se pueda administrar a seres humanos sin los significativos efectos secundarios. También sigue existiendo la necesidad de un agente dirigido que tenga una afinidad de unión que supere la afinidad de unión del B-B4. También existe la necesidad de tal agente dirigido basado en el B-B4 que muestre una o más propiedades ventajosas en relación a su equivalente murino. Estas propiedades incluyen unión antigénica mejorada, en particular al CD138 que se expresa en células tumorales y en células accesorias a estas o una unión más homogénea.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido modificado que reconoce el CD138, y una molécula efectora que induce la muerte celular, de forma que el anticuerpo dirigido modificado comprende una cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1 y una cadena ligera que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2, en donde (a) la cadena pesada comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y (b) la cadena ligera comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2, y en donde el anticuerpo dirigido modificado es del tipo IgG4.

El anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado puede además comprender los restos de aminoácido 123 a 448 de la SEC ID N° 1, y mutaciones de la misma que (i) mantengan o bajen la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o la citotoxicidad dependiente de complemento del anticuerpo dirigido modificado, y/o (ii) estabilicen el anticuerpo dirigido modificado. Más preferentemente (a) dicha cadena pesada tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1; y (b) dicha cadena ligera tiene la menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia SEC ID N°2.

El anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado puede ser un anticuerpo quimérico humano / de ratón.

El anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado puede comprender una cadena pesada que tiene la SEC ID N° 1 y una cadena ligera que tiene la SEC ID N° 2.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además el inmunoconjugado descrito anteriormente para su uso en medicina, y en particular el inmunoconjugado para su uso en un tratamiento dirigido contra células tumorales, en el que el anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado se une al CD138 expresado en las células que expresan CD138.

5 La presente descripción también proporciona un método para una unión homogénea al CD 138 que comprende:
 proporcionar un anticuerpo dirigido modificado, en donde dicho anticuerpo dirigido modificado comprende una
 10 región de unión al antígeno contra el CD138, donde dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, y una región de anticuerpo restante, en la que al menos parte de dicha región de anticuerpo restante es de un anticuerpo humano y que se administra dicho anticuerpo dirigido modificado a las células que expresan CD138,
 donde dicho anticuerpo dirigido modificado se une homogéneamente al CD138 expresado en dichas células que expresan CD138.

15 La presente descripción también proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma, en la que dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma tiene al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1, en donde un agente dirigido que comprende dicha cadena
 20 pesada de inmunoglobulina o parte de la misma se dirige contra CD138.

Dicha cadena pesada de inmunoglobulina o parte de la misma puede tener al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 31 a 35, los restos 51 a 68 y restos 99 a 111 de la SEC ID N° 1 y dicho agente dirigido puede ser un anticuerpo dirigido modificado.

25 Una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o dicha parte de la misma puede ser una región constante del isotipo IgG4.

Dicho agente dirigido puede ser un anticuerpo quimérico de ratón/ humano.

30 Dicho agente dirigido o anticuerpo dirigido modificado puede ser un anticuerpo humanizado.

El polipéptido aislado puede comprender además la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina o una parte de la misma, donde dicha cadena ligera de inmunoglobulina o parte de la misma puede tener al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2.

El polipéptido aislado puede comprender además una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina o una parte de la misma, donde dicha cadena ligera de inmunoglobulina o parte de la misma tiene al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 97% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2.

Dicha cadena pesada de inmunoglobulina puede ser idéntica a la secuencia SEC ID N° 1.

45 Dicha cadena ligera de inmunoglobulina puede ser idéntica a la secuencia SEC ID N° 2.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo dirigido modificado que reconoce el CD138 que comprende una región de unión antigénica contra el CD138, donde dicha región de unión antigénica es de un anticuerpo no humano, y una región de anticuerpo restante, en donde al menos parte de dicha región de anticuerpo restante es de un anticuerpo no humano, donde dicho anticuerpo dirigido modificado

(a) se une al CD138 con una afinidad de unión que supera la afinidad de unión de dicho anticuerpo no humano;
 y/o
 (b) proporciona la unión homogénea al CD138 de las células que expresan CD138.

55 Dicha región de anticuerpo restante puede ser al menos una región constante que comprende una región constante de cadena pesada o una parte de la misma que es de un anticuerpo humano, y donde dicho anticuerpo modificado es de un isotipo IgG4.

60 Dicho anticuerpo dirigido modificado puede ser un anticuerpo quimérico y dicho anticuerpo no humano puede ser B-B4.

Dicho anticuerpo dirigido modificado puede ser un anticuerpo humanizado y dicho anticuerpo no humano puede ser B-B4.

65

Dicha cadena pesada puede tener al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1.

5 Dicho anticuerpo dirigido modificado puede comprender al menos una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera tiene al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2.

10 Dicha cadena pesada puede tener al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% de identidad de secuencia con los restos 31 a 35, restos 51 a 68 y/o los restos 99 a 111 de la SEC ID N° 1. Dicha cadena ligera puede tener al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95%, al menos un 97% o 100% de identidad de secuencia con los restos 24 a 34, restos 50 a 56 y/o restos los 89 a 97 de la SEC ID N° 2.

La región de anticuerpo restante puede comprender:

15 (a) los restos de aminoácidos 123 a 448 de la SEC ID N° 1, y/o
(b) los restos de aminoácidos 108 a 214 de la SEC ID N° 2, respectivamente y mutaciones de la misma que mantienen o disminuyen la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o la citotoxicidad dependiente de complemento del anticuerpo dirigido modificado y mutaciones del mismo que y/o estabilizan el anticuerpo dirigido modificado.

20 Dicha región del anticuerpo restante puede tener una región pesada constante de un anticuerpo humano.

25 Dicho anticuerpo dirigido modificado puede unirse al CD138 con una variación de objetivo de menos del 150%, 140%, 130%, 120%, 110%, 100%, 90%, 80% 70%, 60% o 50%.

Dicha cadena pesada puede tener al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1.

30 Dicho anticuerpo dirigido modificado puede comprender al menos una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera tiene al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2.

35 Dicha cadena pesada puede tener al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% de identidad de secuencia con los restos 31 a 35, restos 51 a 68 y restos 99 a 111 de la SEC ID N° 1.

Dicha cadena pesada puede tener al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 97% de identidad de secuencia con los restos 24 a 34, restos 50 a 56 y restos 89 a 97 de la SEC ID N° 2.

40 La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende o consiste esencialmente en el anticuerpo dirigido modificado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un hibridoma que produce el anticuerpo dirigido modificado también forma parte de la presente descripción.

45 La presente descripción también incluye un ensayo basado en anticuerpos que comprende el anticuerpo dirigido modificado.

La presente descripción también proporciona el anticuerpo dirigido modificado descrito en el presente documento para su uso en medicina. En particular el anticuerpo dirigido modificado comprende:

50 una región de unión al antígeno contra CD138, donde dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, y una región restante, donde al menos una parte de dicha región de anticuerpo restante es de un anticuerpo humano.

55 Más particularmente, el anticuerpo dirigido modificado es para su uso en un tratamiento dirigido contra células tumorales.

La presente descripción también proporciona el uso del anticuerpo dirigido modificado descrito aquí para la fabricación de un medicamento contra células tumorales diana. En particular, el anticuerpo dirigido modificado comprende:

60 una región de unión al antígeno contra CD138, donde dicha región de unión al antígeno es de un anticuerpo no humano, y una región de anticuerpo restante, donde al menos una parte de dicha región de anticuerpo restante es de un anticuerpo humano.

65 Más particularmente, en estos usos médicos, el anticuerpo dirigido modificado es para administrarse a un individuo con células que expresan CD138. Además, el anticuerpo dirigido modificado es capaz de unirse homogéneamente al

CD138 expresado en dichas células que expresan CD138.

Breve descripción de las figuras

- 5 La **FIG. 1** proporciona una representación esquemática de nBT062 que tiene agregadas moléculas efectoras. La **FIG. 2** es una representación química de BT062. La **FIG. 3** muestra la conversión de ansamitocina P-3 en maitansinol. (la estereoquímica se omite para simplificar) La **FIG. 4** muestra un esquema representativo de la síntesis de DM4.
- 10 La **FIG. 5** es una representación esquemática de una conjugación de anticuerpo (nBT062 a DM4). La **FIG. 6** muestra un análisis de unión de los anticuerpos nBT602-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 y nBT062 a células OPM-2. La **FIG. 7 (A)-(D)** representa la citotoxicidad in vitro de los conjugados nBT062-DMx para las células MOLP-8 (CD138⁺) y BJAB (CD138⁻). Las células se cultivaron en placas de fondo plano y se incubaron con las concentraciones indicadas de inmunoconjugados durante 5 días. Se añadió el reactivo WST durante 3 horas más 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 μ M).
- 15 La **FIG 8** muestra los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) anticuerpo nBT062, (C) DM4 libre o (D) conjugado no dirigido huC242-DM4 con el paso del tiempo (días) tras la inoculación de células tumorales MOLP-8. La **FIG. 9** muestra los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) nBT062-SPDB-DM4, (C) B-B4-SPP-DM1 o (D) nBT062-SPP-DM1 con el paso del tiempo (días) tras la inoculación de células tumorales MOLP-8. La **FIG. 10** representa la media de volumen tumoral (+/- DE) de xenoinjertos de mieloma múltiple humano en ratones SCID CB.17 con el paso del tiempo (días) tras la inoculación. La **FIG. 11 A y B** muestra la actividad antitumoral de nBT062-DMx contra las células tumorales MOLP-8 CD138⁺ de la masa tumoral MOLP-8 en modelos tumorales de ratones SCID. El volumen del tumor se determina por la media (+/- DE) para cada grupo.

30 Descripción detallada de varias realizaciones preferidas

La presente descripción se refiere a agentes dirigidos, en particular anticuerpos dirigidos contra CD138, más en particular anticuerpos modificados dirigidos contra CD138. Los inmunoconjugados de la presente invención comprenden dichos anticuerpos dirigidos modificados contra CD138 que permiten el suministro de la(s) molécula(s) efectora(s) en los sitios diana y la liberación de molécula(s) efectora(s) en el sitio específico en, o cerca de las células, tejidos y órganos diana. La moléculas efectoras pueden activarse por escisión/disociación de la parte agente dirigido del inmunoconjugado en el sitio diana.

40 Los anticuerpos y/o inmunoconjugados que comprenden los mismos se pueden administrar a un sujeto que tenga necesidad de tratamiento terapéutico o a las células aisladas de tal sujeto que necesita el tratamiento. La molécula o moléculas efectoras se pueden liberar a partir del inmunoconjugado por escisión/disociación en o cerca de la célula, tejido y órgano diana.

45 Como ejemplo, se emplea el anticuerpo nBT062 en un ensayo cromatográfico. Se proporciona tejido de un paciente fijado en formalina, embebido en parafina. Se añade el anticuerpo nBT062 como anticuerpo primario y el CD138 expresado en la superficie de los tejidos se une al anticuerpo. Se añade un anticuerpo de detección para unirse al nBT062. En una etapa final, se determina la unión del anticuerpo de detección, que comprende un cromógeno. El anticuerpo nBT062 se utiliza para identificar células plasmáticas humanas entre las células hematopoyéticas y por tanto permite el diagnóstico de una variedad de enfermedades hematológicas malignas. El método también permite el seguimiento del progreso de ciertos carcinomas. Se observa una reducción de la detección inespecífica debido a una reactividad cruzada con los receptores Fc que está reducida cuando se emplea el nBT062 en oposición a su equivalente murino.

55 Como segundo ejemplo, se proporciona el anticuerpo nBT062 y un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo nBT062 y al menos un fármaco altamente citotóxico o una inmunotoxina como una molécula efectora y se administra a un paciente con cáncer. En este ejemplo una cantidad eficaz de nBT062 protege las células no tumorales que expresan CD138 de una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado que se administra intravenosamente después a un paciente para que se concentre en las células cancerosas. La molécula o moléculas efectoras se liberan del anticuerpo dirigido por medios externos para inducir la muerte celular o la detención del ciclo celular continuo en las células cancerosas.

65 El CD138 o sindecán-1 (también descrito como SYND1; SINDECAN; SDC; SDC1; ANTIGENO CD138, número de registro SwissProt: P18827 humana) es una glucoproteína de membrana que se describió originalmente que estaba presente en las células de origen epitelial, y posteriormente se encontró en las células hematopoyéticas (Sanderson, 1989). El CD138 tiene un dominio extracelular largo que se une con moléculas solubles (por ejemplo, factores de crecimiento EGF, FGF, HGF) y a moléculas insolubles (por ejemplo componentes de colágeno de la matriz

extracelular y fibronectina) por medio de cadenas de sulfato heparano (Langford, 1998; Yang, 2007) y actúa como un receptor para la matriz extracelular. El CD138 también media en la adhesión de célula con célula por medio de moléculas que se unen a la heparina que expresan las células adherentes. Se ha demostrado que el CD138 tiene un papel como co-receptor para los factores de crecimiento de las células de mieloma (Bisping, 2006). Los estudios de diferenciación de células plasmáticas mostraron que el CD138 debe ser considerado como un antígeno de diferenciación (Bataille, 2006).

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

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

En el compartimento hematopoyético humano normal, la expresión de CD138 está restringida a las células plasmáticas (Wijdenes, 1996; Chilosi, 1999) y el CD138 no se expresa en linfocitos, monocitos, granulocitos y glóbulos rojos de sangre periférica. En particular, las células madre CD34⁺ y las células progenitoras no expresan CD138 y los anticuerpos monoclonales anti-CD138 no afectan al número de unidades formadoras de colonias de cultivos de células madre hematopoyéticas (Wijdenes, 1996). En los compartimentos no hematopoyéticos, el CD138 se expresa principalmente en los epitelios estratificados del pulmón, piel, riñón e intestino. Solamente se ha visto una débil tinción en las células endoteliales (Bernfield, 1992; Vooijs, 1996). Se ha informado de que el CD138 existe en las formas polimórficas de células de linfoma humano (Gattei, 1999).

Se han informado que los 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 el B-B4 son específicos del CD138. De estos, B-B4, 1D4 y MI15 reconocen ambos la molécula intacta y la proteína core de CD138 y se demostró que lo reconocían o bien como tal o como epítopos estrechamente relacionados (Gattei, 1999). Estudios anteriores habían informado de que el B-B4 no reconoce el CD138 soluble, sino solamente el CD138 en forma unida a la membrana (Wijdenes, 2002).

El B-B4, un anticuerpo monoclonal IgG1 murino, se une a un epítipo lineal entre los restos 90-95 de la proteína core del sindecán-1 humano (CD138) (Wijdenes, 1996; Dore, 1998). Consecuentemente con el patrón de expresión de CD138, el B-B4 demostró que reacciona fuertemente con la línea de células plasmáticas RPMI8226, pero no reacciona con las células endoteliales. También en consecuencia con el patrón de expresión de CD138, el B-B4 reacciona también con líneas celulares epiteliales A431 (derivadas de queratinocitos) y HepG2 (derivadas de hepatocitos). Una inmunotoxina B-B4-saporina era también altamente tóxica contra la línea de células plasmáticas RPMI8226, de hecho considerablemente más tóxica que la saporina libre. Sin embargo, de entre las dos líneas celulares epiteliales, la B-B4-saporina mostraba toxicidad solamente para la línea celular A431, aunque en un ensayo clonogénico la B-B4-saporina no mostró efectos inhibidores contra la extensión de las células A431 (Vooijs, 1996). Otros investigadores informaron de la falta de especificidad de los antígenos asociados a MM contra los tumores (Couturier, 1999).

Un anticuerpo "que está constituido esencialmente por" ciertos componentes significa en el contexto de la presente descripción que el anticuerpo consiste en los componentes especificados y cualquier material o componente adicional que prácticamente no afecte las características básicas del anticuerpo.

La presente invención utiliza la expresión "célula tumoral" para incluir las células cancerosas así como las células precancerosas que pueden formar parte o no de un tumor sólido.

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

0058 Un "anticuerpo dirigido" es o está basado en un anticuerpo natural y se produce sintéticamente o por modificación genética y se une a un antígeno sobre una célula o células (célula(s) diana) de interés. Un anticuerpo dirigido incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo dirigido se puede modificar para, por ejemplo, mejorar su afinidad hacia las células diana (Ross, 2003) o disminuir su inmunogenicidad. El anticuerpo dirigido

puede unirse a una formulación liposómica que incluye moléculas efectoras (Carter, 2003). Un fragmento de anticuerpo comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, pero también diacuerpos; dominios de anticuerpos (dAc) (Ward, 1989; Patente de Estados Unidos 6.005.079); anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla variable (scFv) las cadenas pesada y ligera (VH y VL) se pueden unir por un enlace de aminoácidos corto que tiene, por ejemplo, la secuencia (glicina₄serina)_n, que tiene suficiente flexibilidad para permitir a los dos dominios ensamblar un bolsillo de unión antigénico funcional. La adición de varias secuencias de señal puede permitir fijar la diana más precisamente por el anticuerpo dirigido. La adición de la región constante de cadena ligera (CL) puede permitir la dimerización por medio de enlaces disulfuro, produciendo un aumento de la estabilidad y la avidéz. Las regiones variables para construir el scFv pueden, si hay disponible un anticuerpo monoclonal contra una diana de interés, obtenerse por RT-PCR que clona las regiones variables a partir del ARNm extraído del hibridoma parental. De manera alternativa, el scFv se puede generar de novo por tecnología de fago de presentación (Smith, 2001). Como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento funcional", cuando se utiliza en 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 está unido específicamente al anticuerpo de referencia del que está hecho. 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 un resto de unión (Publicación de Patente de Estados Unidos 2002 0006379). Un anticuerpo biespecífico también se puede unir a más de un antígeno en una célula diana (Carter, 2003). Un anticuerpo se puede modificar, por ejemplo, introduciendo restos de cisteína para introducir grupos tiol (Olafsen, 2004).

El anticuerpo dirigido puede derivarse de cualquier fuente y puede ser, pero sin limitarse a, un anticuerpo de camello, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico humano/de ratón o un anticuerpo quimérico humano/de mono, en particular un anticuerpo quimérico humano/ de ratón tal como nBT062.

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias derivadas de un anticuerpo humano y de un anticuerpo no humano. Los métodos adecuados para humanizar anticuerpo incluyen el injerto CDR (injerto de la región determinante de complementariedad) (EP 0 239 400; documento WO 91/09967: Patentes de Estados Unidos 5.530.101; y 5.585.089) revestido o recubierto (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 199; Studnicka y col., 1994; Roguska y col., 1994), cadena mezclada (Patente de Estados Unidos 5.565.332) y Delmmunation™ (Biovation, LTD). En el injerto de CDR, las regiones determinantes de complementariedad de ratón (CDR) de, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal B-B4, se injertan en armazones variables humanos, que luego se unen a las regiones constantes humanas, para crear un anticuerpo B-B4 humano (hB-B4). Varios anticuerpos humanizados por injerto de CDR se utilizan ahora en la clínica, incluyendo MYLOTARG (Sievers y col., 2001) y HECEPTIN (Pegram y col, 1998).

La tecnología de recubrimiento utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de las regiones variables del anticuerpo para parecerse a las superficies de los anticuerpos conocidos del huésped diana. Las estrategias y métodos para el recubrimiento de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos en los diferentes huéspedes, se desvelan por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.638.641. Los anticuerpos humanos se pueden fabricar por medio de una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de fagos de representación. Véase también las Patentes de Estados Unidos 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patente internacional 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, tales como los anticuerpos quiméricos humanos/de ratón, anticuerpos humanizados o anticuerpos que se han modificado genéticamente, por ejemplo, mejoran su afinidad hacia las células diana o disminuyen su inmunogenicidad pero también los fragmentos de anticuerpo, en particular fragmentos funcionales de tales anticuerpos dirigidos que se han sometido a cualquier modificación no natural, diacuerpos, anticuerpos de dominio; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena ligera; y anticuerpos multiespecíficos se designan en el presente documento como **anticuerpos dirigidos modificados**.

Los anticuerpos quimerizados, mantienen la región de unión de anticuerpo (ABR o región Fab) del anticuerpo no humano, por ejemplo, el anticuerpo murino en el que se basan, mientras que cualquiera de las regiones constantes las proporciona, por ejemplo, un anticuerpo humano. Generalmente, la quimerización y/o el cambio de las regiones constantes de un anticuerpo no afectarán a la afinidad de un anticuerpo ya que el cambio no afecta a las regiones del anticuerpo que contribuyen a la unión con el antígeno. En una realización específica, el anticuerpo modificado genéticamente, en particular el quimerizado, puede tener una afinidad de unión más alta (como se expresa por los valores de K_D) que el respectivo anticuerpo no humano en el que se basa. En particular, el anticuerpo nBT062 y los anticuerpos basados en el mismo pueden tener una afinidad de anticuerpo más alta que el B-B4 murino. En otra realización preferida, los inmunocomplejos comprenden aquellos anticuerpos modificados genéticamente /quimerizados que también muestran esta afinidad de anticuerpo más alta. Estos inmunocombinados pueden también mostrar, en ciertas realizaciones, otras propiedades ventajosas tales como una mayor reducción de la carga

tumoral que sus equivalentes que contienen B-B4. En una realización preferida, los anticuerpos modificados genéticamente, en particular los anticuerpos dirigidos quimerizados muestran afinidades de unión que se caracterizan por constantes de disociación K_D (nM) de menos de 1,6, menos de 1,5 o aproximadamente o menos de 1,4, mientras que sus equivalentes murinos se caracterizan por constantes de K_D (nM) de aproximadamente o más de 1,6. Los inmunocombinados que comprenden agentes dirigidos tales como anticuerpos dirigidos se pueden caracterizar por constantes de disociación de K_D (nM) de menos de 2,6, menos de 2,5, menos de 2,4, menos de 2,3, menos de 2,2, menos de 2,1, menos de 2,0, menos de, o aproximadamente 1,9 que son los preferidos, mientras que los inmunocombinados que comprenden los anticuerpos del equivalente murino se pueden caracterizar por constantes de disociación K_D (nM) de aproximadamente o más de 2,6 (compárese la Tabla 3, en Materiales y Métodos).

También se pueden utilizar los anticuerpos totalmente humanos. Los anticuerpos se pueden seleccionar por la estrategia del fago de presentación, donde CD138 o un antígeno determinante del mismo se utiliza para unirse selectivamente al fago que expresa, por ejemplo, regiones variables de B-B4 (véase Krebs, 2001). Esta estrategia se acopla ventajosamente con 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.

En una realización, el anticuerpo dirigido, en su forma no conjugada, se internaliza moderada o escasamente. Una internalización moderada constituye aproximadamente de un 30% a aproximadamente un 75% de internalización del anticuerpo, una internalización escasa constituye desde aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 30% de internalización después de 3 horas de incubación a 37 °C. En otra realización preferida el CD138 se une al anticuerpo dirigido, por ejemplo, a los 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 generan por hibridación de células de mieloma, que se generaron por hibridación de células de mieloma SP02/0 con células esplénicas de ratón Balb/c se depositaron en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig el 11 de diciembre de 2007. El número de identificación de estos B-B4 que expresan las células de hibridoma es DSM ACC2874. En otra realización, el anticuerpo dirigido no se une sustancialmente al CD138 expresado que no es de superficie. Cuando el nombre de un anticuerpo específico se combina con la expresión "anticuerpo dirigido" tal como "anticuerpo dirigido nBT062", significa que este anticuerpo dirigido tiene especificidad de unión por el CD138. Si, por ejemplo, un anticuerpo dirigido se dice que se "basa en" un anticuerpo especificado, significa que este anticuerpo dirigido tiene la especificidad de unión de este anticuerpo, pero puede tomar cualquier forma consecuente 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 el término "anticuerpo dirigido" tal como "anticuerpo dirigido contra CD138", significa que este anticuerpo dirigido tiene especificidad de unión para CD138. Si, por ejemplo, se dice que un anticuerpo dirigido hace algo "selectivamente" tal como "se dirige selectivamente al CD138 expresado en la superficie celular" o que es "selectivo" para algo, significa que hay una selectividad significativa (es decir una alta afinidad para las células positivas a CD138 en comparación con las células negativas a CD138) para, en caso del ejemplo proporcionado, el CD138 expresado por la superficie celular, en comparación con cualquier otro antígeno. Debido a esta selectividad, los efectos secundarios en un entorno determinado se reducen o incluso se anulan.

Las "moléculas dirigidas no inmunoglobulinas" incluyen las moléculas dirigidas derivadas de proteínas no inmunoglobulinas así como las moléculas dirigidas no peptídicas. Las proteínas no inmunoglobulinas pequeñas que están incluidas en esta definición se diseñan para tener afinidades específicas, en particular, por el CD138 expresado en la superficie. Estas proteínas pequeñas no inmunoglobulinas incluyen moléculas modificadas basándose en la estructura tales como las moléculas Affilin® que tienen un peso molecular relativamente bajo tal como entre 10 kDa y 20 kDa. Las estructuras apropiadas incluyen, por ejemplo, la cristalina gamma. Estas moléculas no tienen, en estado natural, actividad de unión específica con las moléculas diana. Modificando las superficies de la proteína por medio de aleatorización definida localmente de los aminoácidos expuestos al disolvente, se crean sitios nuevos de unión completamente nuevos. De esta manera las proteínas que no se unían se transforman en proteínas de unión específica. Tales moléculas se pueden diseñar específicamente para unirse a una diana, tal como el CD138, y permiten el suministro específico de una o más moléculas efectoras (véase, scil Proteins GmbH en www.scilproteins.com, 2004). Otra clase de moléculas dirigidas no inmunoglobulinas se derivan de lipocalinas, e incluyen, por ejemplo ANTICALINS®, que se parecen de alguna manera en la estructura a las inmunoglobulinas. Sin embargo las lipocalinas se componen de una única cadena polipeptídica con 160 a 180 restos de aminoácidos. El bolsillo de unión de las lipocalinas se pueden reformar para que reconozcan una molécula de interés con alta afinidad y especificidad (véase, por ejemplo, Beste y col., 1999). Los receptores bacterianos artificiales tales como los fabricados bajo la marca registrada Affibody® (Affibody AB) también están en el ámbito de la presente descripción. Estas moléculas de receptor bacteriano artificial son proteínas simples, pequeñas y se pueden componer en un manojo tri-helicoidal que se basa en la estructura de uno de los dominios de unión de IgG a la proteína A (*Staphylococcus aureus*). Estas moléculas tienen propiedades de unión similares a muchas inmunoglobulinas, pero son sustancialmente pequeñas, que tienen un peso molecular que a menudo no supera los 10 kDa y también son comparativamente estables. Las moléculas de receptor bacteriano artificiales adecuadas están, por ejemplo, descritas en las Patentes de Estados Unidos 5.831.012; 6.534.628 y 6.740.734.

Una "molécula efectora" de acuerdo con la presente invención es una molécula o un derivado, o un análogo de la misma que se une a un agente dirigido, en particular un anticuerpo dirigido y/o anticuerpo dirigido modificado, y que ejerce el efecto deseado, por ejemplo, la apoptosis, u otro tipo de muerte celular, o la detención de un ciclo celular continuo en la célula o células diana. Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención incluyen

5 moléculas que pueden ejercer los efectos deseados en una célula diana e incluyen, pero no se limitan a estos, toxinas, fármacos, en particular fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, radionúclidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes formadores de poros, ribonucleasas, proteínas de cascadas de señalización apoptótica con actividades inductoras de apoptosis, enzimas citotóxicas, enzimas activadoras de profármacos, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos o citoquinas, así como derivados funcionales o análogos /fragmentos de los mismos. Las

10 toxinas pueden incluir toxinas bacterianas, tales como, pero sin limitarse a estas, toxina diftérica o Exotoxina A, toxinas vegetales, tales como pero sin limitarse a, Ricino. Proteínas de las cascadas de señalización apoptótica con actividades inductoras de apoptosis, que incluyen, pero sin limitarse a estas Granzima B, Granzima A, caspasa-3, Caspasa -7, Caspasa-8, Caspasa-9, Bid truncado (tBid), Bax y Bak.

15 En una realización preferida, el efector aumenta el suministro interno del efector del inmunoconjugado, en particular cuando la forma natural del anticuerpo en el que se basa el anticuerpo dirigido del inmunoconjugado se internaliza escasamente. En otra realización preferida el efector está en su forma nativa, no selectiva. En ciertas realizaciones el efector tiene una alta toxicidad no selectiva, incluyendo toxicidad sistémica, cuando está en su forma nativa. La "forma nativa" de una molécula efectora de la presente invención es la molécula efectora antes de que se una al

20 agente dirigido para formar un inmunoconjugado. En otra realización preferida, la toxicidad no selectiva de la molécula efectora se elimina sustancialmente en la conjugación con el agente dirigido. En otra realización preferida, la molécula efectora produce, al alcanzar las células diana, la muerte o la detención del ciclo celular continuo en la célula diana. Un fármaco de molécula efectora de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, un fármaco que incluye por ejemplo, fármacos pequeños altamente citotóxicos que actúan como inhibidores de la

25 polimerización de tubulina tales como los maitansinoides, dolastatinas, auristatina, y criptoficina; agentes alquilantes de ADN como los análogos del CC-1065 o sus derivados (Patentes de Estados Unidos 5.475.092; 5.585.499; 6.716.821) y duocarmicina; antibióticos enedina tales como calicheamicina y esperamicina; y potentes fármacos taxoides (taxano) (Payne, 2003). Son particularmente preferidos los maitansinoides y calicheamicinas. Un efector maitansinoide incluye maitansinoides de cualquier origen, incluyendo, pero sin limitarse a estos maitansinol y

30 análogos o derivados del maitansinol. Doxorubicina, daunomicina, metotrexato, vinblastina, neocarzinostatina, macromicina, treni-mon y α -amanitina y algunas otras moléculas efectoras en el ámbito de la presente invención. También en el ámbito de la presente invención se encuentran las moléculas de ADN antisentido y moléculas efectoras. Cuando el nombre de, por ejemplo, un fármaco específico o clase de fármacos se combina en el presente documento con el término "efector" o "molécula efectora", se hace referencia a un efector de un inmunoconjugado de

35 acuerdo con la presente invención que se basa en el fármaco especificado o clase de fármacos.

La maitansina es un producto natural derivado originalmente del arbusto etíope *Maytenus serrata* (Remillard, 1975; Patente de Estados Unidos 3.896.111). Este fármaco inhibe la polimerización de la tubulina, lo que da como resultado el bloqueo de la mitosis y la muerte celular (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). La

40 citotoxicidad de la maitansina es 200-1.000 veces mayor que la de los fármacos anticáncer de uso clínico que afectan la polimerización de la tubulina, tales como los alcaloides de la Vinca o el taxol. Sin embargo los ensayos clínicos de la maitansina indicaron que carecía de una ventana terapéutica debido a su alta toxicidad sistémica. La maitansina y los maitansinoides son altamente citotóxicos pero su uso clínico en la terapia contra el cáncer se ha limitado enormemente por estos graves efectos secundarios sobre el sistema nervioso central y sistema

45 gastrointestinal.

Los maitansinoides también se han aislado de otras plantas incluyendo tejidos de la semilla de *Trewia nudiflora* (Patente de Estados Unidos 4.418.064).

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

La presente invención se refiere a los maitansinoides de cualquier origen incluyendo el maitansinol sintético y los análogos del maitansinol que se desvelan por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos 4.137.230; 4.248.870;

55 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 es más preferentemente el que se produce de acuerdo con los procesos desvelados en la Patente de Estados Unidos 6.333.410 de Chari y col., o

60 en Chari y col.(Chari, 1992).

El DM-1 (N2-deacetil- N2-(3-mercapto- 1- oxopropil)- maitansina) es una molécula efectora preferida en el contexto de la presente invención. El DM1 es 3 a 10 veces más citotóxico que la maitansina, y se ha convertido en un profármaco uniéndolo por medio de enlace(s) disulfuro con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno

65 asociado a un tumor. Ciertos de estos conjugados(a veces llamados "profármacos activados por tumor" (TAP)) no son citotóxicos en el compartimento sanguíneo, mientras que se activan al asociarse con células diana y se

internalizan, liberando de esta manera el fármaco (Blatter, 2001). Se han desarrollado varios conjugados anticuerpo-DM1 (Payne, 2003) y se han evaluado en ensayos clínicos. Por ejemplo, el tratamiento con huC242-DM1 lo toleraban bien los pacientes con cáncer colorrectal, no inducía una respuesta inmunitaria detectable, y tenía un tiempo de circulación largo (Tolcher, 2003).

5 Otros maitansinoides particularmente preferidos comprenden una cadena lateral que contiene un enlace tiol con impedimentos estéricos, tal como, pero sin limitarse a los maitansinoides, N²-desacetil-N² - (4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también designado como "DM3" y N²-desacetil-N² - (4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también designado como "DM4". La síntesis de DM4 se muestra en las FIGs. 3 y 4 y se describe en otros sitios en el presente documento. El DM4 se diferencia de DM1 y DM 3 en que tiene grupos metilo en su [alfa] C. Estos dan como resultado impedimentos estéricos cuando el DM4 se une por medio de un enlazador en particular, pero que no se limita a un enlazador que comprende un enlace disulfuro, con un agente dirigido tal como nBT062. Una amplia variedad de maitansinoides que tienen un grupo tiol con impedimentos estéricos (que poseen uno o dos sustituyentes, en particular sustituyentes alquilo, tales como sustituyentes metilo de DM4) se desvelan en la Publicación de Patente de EE. UU. 2004/0235840, publicada el 5 de noviembre de 2004. Como han informado Goldmahker y col., 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 denominado espectador. Sin embargo, como apreciará un experto en la técnica, son parte de la presente invención otras moléculas efectoras que comprenden sustituyentes tales como grupos alquilo en las posiciones que den como resultado un impedimento estérico cuando el efector se une a un agente dirigido por medio de un enlazador. Preferentemente este impedimento induce una modificación química tal como la alquilación de los fármacos libres para aumentar su estabilidad general, lo que permite que el fármaco no solo induzca la muerte celular o la detención del ciclo celular continuo en las células tumorales que expresan CD138 sino que, opcionalmente, también afectan a las células auxiliares que por ejemplo, soportan o protegen al tumor de los fármacos, en particular las células del estroma tumoral y el sistema vascular del tumor y las que no expresan en general CD138, haciendo disminuir o perder su función de soporte o protección.

Los agentes alquilantes de ADN también son particularmente preferidos como moléculas efectoras e incluyen, pero no se limitan a estos, análogos de CC-1065 o derivados. El CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado de cultivos de *Streptomyces zelensis* y se ha demostrado que es excepcionalmente citotóxico in vitro (Patente de Estados Unidos 4.169.888). Están en el ámbito de la presente invención, por ejemplo los análogos o derivados de CC-1065 descritos en las patentes de Estados Unidos 5.475.092, 5.585.499 y 5.739.350. Como un experto en la técnica apreciará fácilmente, los análogos o derivados modificados de CC-106 descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.846.454 y los profármacos de los análogos o derivados de CC-1065 que se describen por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.756.397 también están en el ámbito de la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención los análogos o derivados de CC-1065, por ejemplo, pueden sintetizarse como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.534.660.

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

Las moléculas efectoras Calicheamicina de acuerdo con la presente invención incluyen la gamma 11, N-acetil calicheamicina y otros derivados de la calicheamicina. La calicheamicina se une de manera específica de secuencia al surco menor del ADN, se somete a una recolocación y se expone a radicales libres, dando lugar a la rotura de la doble cadena del ADN, lo que da como resultado la apoptosis celular y muerte. Un ejemplo de molécula efectora calicheamicina que se puede utilizar en el contexto de la presente invención se describe en la Patente de Estados Unidos 5.053.394.

Un inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención comprende un anticuerpo dirigido modificado y una molécula efectora. El inmunoconjugado puede comprender más moléculas por ejemplo para su estabilización. Para los inmunoconjugados, el término "conjugado" generalmente se utiliza para definir la asociación operativa del agente dirigido con o una o más moléculas efectoras y no pretende referirse solamente a cualquier tipo de asociación operativa, y no se limita particularmente a "conjugación" química. En tanto en cuanto el agente dirigido sea capaz de unirse al sitio diana y el efector unido funcione suficientemente como se pretende, particularmente cuando se suministra al sitio diana, cualquier modo de unión será adecuado. Los métodos de conjugación incluyen, pero sin limitarse a estos, la unión directa de la molécula efectora al anticuerpo dirigido, con o sin modificación previa de la molécula efectora y/o el anticuerpo dirigido o la unión por medio de enlazadores. Los enlazadores se pueden

clasificar funcionalmente en, por ejemplo, lábiles a ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores escindibles por enzimas, tales como los enlazadores que se pueden escindir por peptidasas. Los enlazadores escindibles son los preferidos, en muchas realizaciones de la invención. Tales enlazadores escindibles se pueden escindir bajo condiciones presentes en el ambiente celular, particularmente en un ambiente intracelular y que no tenga un efecto perjudicial en la liberación del fármaco al escindirse. Los pH bajos tales como un pH de 4 o 5 como existen en ciertos compartimentos intracelulares escindirán los enlazadores lábiles a ácido, mientras que los enlazadores fotolábiles se pueden escindir por, por ejemplo, luz infrarroja. Sin embargo, se prefieren los enlazadores que se escinden por/bajo condiciones fisiológicas presentes en la mayoría de las células y se denominan en el presente documento **enlazadores escindibles fisiológicamente**. En consecuencia, los enlazadores disulfuro se prefieren en muchas realizaciones de la invención. Estos enlazadores son escindibles por intercambio disulfuro, que pueden ocurrir bajo condiciones fisiológicas. Los enlazadores disulfuro heterobifuncionales preferidos incluyen, pero sin limitarse a; N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson y col., (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo, Pat. EE. UU. N° 4.563.304), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, número de registro CAS 341498-08-6), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (véase, por ejemplo, Yoshitake y col., (1979)), y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio] pentanoato (SMNP) (véase, por ejemplo, Pat. EE. UU. N° 4.563.304). Las moléculas enlazadoras más preferidas para su uso en la composición inventiva son SPP, SMCC, y SPDB.

Otros enlazadores adecuados pueden incluir enlaces "no escindibles" tales como, pero sin limitarse a estos, Sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC), que es un enlazador heterobifuncional capaz de unir compuestos con compuestos que contienen SH. Las moléculas bifuncionales y heterobifuncionales, tales como moléculas heterobifuncionales enlazadoras dirigidas a hidratos de carbono, tales como S-(2-hiopiridil)-L-cisteína hidrazida (TPCH), también están en el ámbito de la presente invención (Vogel, 2004). La molécula efectora, tal como un maitansinoide, se puede conjugar con el anticuerpo dirigido por medio de un proceso de dos etapas de reacción, que incluye una primera etapa de modificación del anticuerpo dirigido con un reactivo de unión cruzada tal como N-succinimidil piridilditio propionato (SPDP) para introducir grupos ditiopiridilo en el anticuerpo dirigido. En una segunda etapa, un reactivo maitansinoide que tiene un grupo tiol, tal como DM1, se puede añadir al anticuerpo modificado, lo que da como resultado el desplazamiento de los grupos tiopiridilo en el anticuerpo modificado, y la producción de un conjugado anticuerpo/ maitansinoide citotóxico ligado por disulfuro. (Patente de Estados Unidos 5.208.020). Sin embargo, los procesos en una etapa tal como el que se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20030055226 de Chari y col también están en el ámbito de la presente invención. En una realización de la presente invención se unen múltiples moléculas efectoras del mismo o diferente tipo al anticuerpo dirigido.

Los análogos y derivados de CC-1065 se pueden conjugar con el agente dirigido por medio, por ejemplo, de grupos de unión PEG como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.716.821.

Las calicheamicinas se pueden conjugar con los anticuerpos dirigidos por medio de enlazadores (Patente de Estados Unidos 5.877.296 y Patente de Estados Unidos 5.773.001) o de acuerdo con los métodos de conjugación descritos en la Patente de Estados Unidos 5.712.374, y 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 tener la forma de proteínas de fusión recombinantes.

El término identidad de secuencia se refiere a una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general las secuencias se alinean de forma que se obtenga el orden más alto de emparejamiento. "Identidad", per se, tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando técnicas publicadas, (véase, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., 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. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque hay varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la técnica (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

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

Si la secuencia de aminoácidos es al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% idéntica por ejemplo a la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, o a una parte de las mismas, se puede determinar convencionalmente utilizando programas de ordenador tales como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). El BESTFIT utiliza 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.

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

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

10 La molécula básica de anticuerpo es una estructura bifuncional en la que las regiones variables se unen al antígeno mientras que las regiones constantes restantes pueden desencadenar las respuestas independientes de antígeno. Las clases más importantes de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, se determinan por las regiones constantes. Estas clases se pueden dividir además en subclases (isotipos). Por ejemplo, la clase IgG tiene cuatro isotipos, a saber, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que se determinan por las regiones constantes. De las diferentes clases de anticuerpos humanos, solamente IgG1, IgG2, IgG3 e IgM se sabe que activan eficazmente el sistema de complemento. Aunque las regiones constantes no forman los sitios de unión al antígeno, la disposición de las regiones constantes y la región bisagra puede conferir flexibilidad segmentaria en la molécula que le permite unirse con el antígeno.

20 Los diferentes isotipos de IgG se pueden unir a los receptores Fc de las células tales como monocitos, células B y células NK, de manera que activan las células para segregar citoquinas. Los diferentes isotipos pueden también activar el complemento, lo que da como resultado la inflamación local o sistémica. En particular, los diferentes isotipos de IgG se pueden unir a FcγR en diferentes grados. Los FcγR son un grupo de glucoproteínas de superficie que pertenecen a la superfamilia de las Ig y que se expresan sobre todo en los leucocitos. Las glucoproteínas FcγR se dividen en tres clases que se designan como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Mientras que IgG1, IgG2 e IgG3 se unen fuertemente a una variedad de estas clases de glucoproteínas FcγR, la IgG4 muestra una unión mucho más débil. En particular, la IgG4 es un enlazador intermedio de FcγRI, lo que da como resultado una baja o ninguna ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), no se une a FcγRIIIA ni FcγRIIA. La IgG4 también es un enlazador débil de FcγRIIB, que es un receptor inhibitorio. Además IgG4 media solo débilmente o no media la fijación del complemento y es débil o no tiene citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La IgG4 puede emplearse específicamente para evitar la selección de diana mediada por Fc del FcR hepático ya que no muestra interacción con FcRγII o LSEC (células endoteliales sinusoidales del hígado), no tiene ninguna o débil interacción con VcRγI-III o células de Kupffer (macrófagos) y no interactúa con FcRγIII en las células NK hepáticas.

30 Ciertas mutaciones que además reducen cualquier CDC también son parte de la presente invención. Por ejemplo se ha demostrado que los restos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducen la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Una o más mutaciones que estabilizan los anticuerpos son parte también de la presente invención (también denominadas "mutaciones estabilizantes"). Aquellas mutaciones incluyen en particular las mutaciones de leucina en ácido glutámico en la región CH2 de IgG4 y el intercambio de serina por prolina en el core bisagra de IgG4. Estas mutaciones disminuyen, en ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de medias moléculas a menos del 10%, menos del 5% y preferentemente menos del 2 o el 1%. Además la semivida in vivo de tales anticuerpos estabilizados puede aumentar en varios días, incluyendo 1, 2, 3, 4 o más de 5 días (Schuurman, 1999).

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

55 Una **región de unión al antígeno** (ABR) de acuerdo con la presente descripción variará basándose en el tipo de anticuerpo dirigido o el anticuerpo dirigido modificado empleado. En un anticuerpo que existe naturalmente y en la mayoría de los anticuerpos quiméricos y humanizados, la región de unión al antígeno se compone de una cadena ligera y los primeros dos dominios de una cadena pesada. Sin embargo, en un anticuerpo desprovisto de cadenas ligeras, la región de unión al antígeno se formará solo por ejemplo, con los dos primeros dominios de la cadena pesada, mientras que en anticuerpos de una cadena única (ScFv), que combina en una sola cadena de polipéptido los dominios variables de cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo la ABR se proporciona solamente por una molécula de polipéptido. Los fragmentos de FAB normalmente se obtienen por digestión con papaína y tienen una cadena ligera y parte de una cadena pesada y por lo tanto comprende una ABR con solo un sitio de combinación con el antígeno. Por otro lado, los diacuerpos son fragmentos pequeños de anticuerpo que tienen dos regiones de unión al antígeno. En el contexto de la presente descripción, sin embargo, una región de unión al antígeno o un anticuerpo dirigido o un anticuerpo dirigido modificado es cualquier región que determina

primariamente la **especificidad de unión** del anticuerpo dirigido o el anticuerpo dirigido modificado.

Si una ABR u otra región del anticuerpo dirigido se dice que es “**de un cierto anticuerpo**”, por ejemplo, un anticuerpo humano o no humano, significa en el contexto de la presente invención que la ABR o es idéntica a una ABR que se produce naturalmente o se basa en ella. Una ABR se basa en una ABR que se produce naturalmente si tiene la especificidad de unión de la ABR que se produce naturalmente. Sin embargo, tal ABR puede comprender, por ejemplo, mutaciones puntuales, adiciones, eliminaciones o modificaciones post-traduccionales tales como glucosilación. Tal ABR 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 que se produce naturalmente.

La **dirección homogénea** de un agente dirigido tal como un anticuerpo dirigido, pero en particular un inmunoconjugado que comprende el mismo, en el contexto de la presente descripción, es una medida de la variación asociada con la obtención del resultado deseado de dicha dirección con el agente dirigido. En ciertas realizaciones, el resultado deseado se obtiene por unión simple con la diana. Este es el caso, por ejemplo, en realizaciones en las que un cierto agente dirigido proporciona una protección contra uniones posteriores. Sin embargo, la homogeneidad de un agente dirigido se puede fácilmente evaluar, por ejemplo, por medio de la eficacia de un inmunoconjugado que comprende dicho agente dirigido. Por ejemplo, la eficacia de dicho inmunoconjugado contra un antígeno tumoral tal como CD138 que comprende un efector con el objetivo de destruir las células tumorales y/o detener el crecimiento de un tumor se puede determinar por el grado de supresión del crecimiento de un tumor que comprende las células que expresan el antígeno CD138. Tal inmunoconjugado puede mostrar una gran variación en su eficacia. Puede, por ejemplo, detener el crecimiento tumoral a veces con alta eficacia, pero otras veces con una eficacia que apenas supera la eficacia del control. Una variación baja en la eficacia de un inmunoconjugado, por otra parte, demuestra consecuentemente que el inmunoconjugado o el agente dirigido, respectivamente, proporcionan el resultado deseado. Una forma de cuantificar la homogeneidad de la dirección es calcular la **variación de dirección**. En el contexto de la detención del crecimiento tumoral por un inmunoconjugado que comprende un cierto agente dirigido, la variación de dirección se puede calcular, primero determinando el tiempo que tarda un tumor en alcanzar un determinado volumen, por ejemplo, 300 mm³. Preferentemente, el volumen predeterminado se elige de forma que cualquier crecimiento tumoral antes y después de alcanzar dicho volumen predeterminado aumente continuamente a aproximadamente la misma tasa. Después de que tal tiempo se haya determinado para un grupo de sujetos, se calcula la media de estos tiempos (T_m) en el grupo de sujetos (por ejemplo ratones SCID u otro modelo adecuado que muestra un crecimiento tumoral homogéneo). El T_m entonces se correlaciona con las observaciones hechas en el sujeto del grupo que muestra la menor eficacia en la selección de diana y por tanto se asocia con tumores que necesitan el menor tiempo T_f para alcanzar dicho volumen predeterminado, y, por otra parte, el sujeto del grupo que muestra la mayor eficacia de selección de la diana se asocia con tumores que necesitan el mayor tiempo (T_s) para alcanzar dicho volumen predeterminado calculando la variación de dirección para el volumen predeterminado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{VARIACIÓN DE DIRECCIÓN [\%]} = \frac{T_s - T_f}{T_m} \times 100$$

En una realización preferida, la variación de dirección del anticuerpo dirigido modificado es menos del 150%, menos del 140%, menos del 130%, menos del 120%, menos del 110%, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, y en algunas realizaciones menos del 45%. Preferentemente, la variación de dirección está entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 150%, preferentemente entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 80%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 60%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50%.

La homogeneidad de dirección (también denominada en el presente documento como homogeneidad de unión a un antígeno particular) puede cuantificarse también por otros medios tales como la determinación del retraso del crecimiento tumoral. También como entenderá fácilmente un experto en la técnica el volumen tumoral de un cierto tamaño es solamente un parámetro en el que se puede determinar la base de la variación de dirección. Dependiendo del resultado deseado, se pueden emplear otros parámetros que incluyen el tiempo (por ejemplo, para medir el retraso en el crecimiento tumoral) o el % de unión. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente tales otros parámetros.

El nBT062 (véase también la **FIG.1**) es un anticuerpo monoclonal tipo IgG4 quimérico humano-murino, una versión quimerizada de B-B4. Esta versión quimerizada de B-B4 se creó para reducir la respuesta de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón), a la vez que se mantenía la funcionalidad de la región de unión de anticuerpo del B-B4 para el CD138. Sorprendentemente se ha descubierto que este anticuerpo quimérico muestra unas afinidades de unión mejoradas con respecto al B-B4. También sorprendentemente el anticuerpo quimérico se ha asociado con una homogeneidad de la dirección, ya que reduce la variación en los resultados obtenidos cuando se utiliza el anticuerpo o el inmunoconjugado que comprende el mismo. El protocolo para producir nBT062 se especifica posteriormente. Las células ováricas de hámster chino que expresan nBT062 se han depositado en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig el 11 de diciembre de

2007. El número de identificación en el DSM es ACC2875. Al anticuerpo quimérico específico de CD138 basado en B-B4 se le denomina genéricamente en el presente documento c-B-B4.

5 La secuencia de aminoácidos de ambas, la cadena pesada y ligera se ha predicho a partir la traducción de la secuencia de nucleótidos para nBT062. Las secuencias de aminoácidos predichas para la cadena pesada y la cadena ligera se presentan en la **Tabla 1**. Las regiones variables predichas están en **negrita**, las CDR predichas están subrayadas.

Tabla 1. Secuencia de Aminoácidos Predicha para nBT062

10 - Secuencia predicha de cadena pesada nBT062 (**SEC ID N° 1**):

1	QVQLQQSGSE IMMPGASVKI SKATGYTFS <u>NYWIEWVKQR</u> PGHGLEWIGE
51	<u>ILPGTGRTIY</u> <u>NEKFKGKATF</u> TADISSNTVQ <u>MQLSSLTSED</u> <u>SAVYYCARRD</u>
101	<u>YYGNFYAMD</u> <u>YWGQTSVTV</u> SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151	VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201	KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPKPK
251	DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS
301	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351	YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401	DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG (K)

La lisina del extremo C es propensa al recorte pero puede estar presente debido a un recorte incompleto hasta cierto punto y no es parte de la SEC ID N° 1.

- Secuencia predicha de la cadena ligera de nBT062 (**SEC ID N° 2**):

1	DIQMTQSTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIN <u>NYLNWYQQKP</u> DGTVELLIYY
51	<u>TSTLQSGVPS</u> <u>RFSGSGSGTD</u> <u>YSLTISNLEP</u> <u>EDIGTYICQQ</u> <u>YSKLPRTFGG</u>
101	GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
15 201	LSSPVTKSFN RGEK

La **Tabla 2** muestra una comparación de las definiciones generales CDR de Khabat y Chothia y las CDR predichas para nBT062

Definición CDR de Khabat		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

20 El BT062 es un inmunocombinado que comprende el anticuerpo nBT062 quimérico dirigido contra CD138 que está unido por medio de un enlazador, aquí el SPDB, al derivado citostático maitansinoide DM4. Se proporciona una representación química de BT062 en las FIG. 1 y 2. Los inmunocombinados que comprenden nBT062 y una molécula efectora maitansinoide a menudo se caracterizan según su enlazador y el efector maitansinoide, por ejemplo, nBT062-SMCC-DM1, es un inmunocombinado que comprende nBT062, SMCC (un enlazador "no escindible" que contiene un enlace tioéster) y DM1 como efector. Más genéricamente, un inmunocombinado que

25

contiene nBT062 y una molécula efectora puede también describirse como nBT062-enlazador- efector o solo como nBT062- efector (nBT062N), donde N es cualquiera de los efectores descritos en el presente documento.

5 En el presente documento se hace referencia a un equivalente sin impedimentos (**UI: inmunconjugado sin impedimentos**) de un inmunconjugado que comprende un anticuerpo dirigido modificado contra CD138 unido a una molécula efectora por medio de un **enlazador escindible (CL)** y se describe en el presente documento como UICL, que contrasta con un inmunconjugado en el que dicha molécula efectora tiene un impedimento estérico, pero que contiene un enlazador escindible (**HICL**). El UICL es un inmunconjugado equivalente a HICL que comprende un anticuerpo dirigido modificado en el que la molécula efectora, sin embargo, no tiene impedimentos estéricos.
 10 Ejemplos de una pareja de HICL/UICL es BT062 y nBT062-SPP-DM1. Un equivalente sin impedimento de tal inmunconjugado que comprende un enlazador **no escindible (UINCL)** se refiere al inmunconjugado equivalente que comprende un anticuerpo dirigido modificado en el que la molécula efectora no tiene un impedimento estérico y comprende un enlazador no escindible. Para BT062, nBT602-SMCC-DM1 constituiría un ejemplo de tal equivalente sin impedimento que comprende un enlazador no escindible.

15 Una actividad inhibidora del crecimiento de un tumor (= actividad de inhibición de crecimiento tumoral) de un inmunconjugado es una medida relativa. Describe la actividad de inhibición del crecimiento tumoral de un conjugado con respecto a la actividad del inmunconjugado de actuación más alta cuya actividad se fija en el 100%. Por ejemplo si la actividad del inmunconjugado de actuación más alta, digamos BT062 que produce un retraso del crecimiento tumoral (TGD) de 32 días se fija como el 100%, la actividad de, por ejemplo el nBT062-DM1 que muestra un retraso del crecimiento tumoral (TGD) de 18 días se calcula de la siguiente manera:

Actividad de inhibición de crecimiento tumoral =

25
$$100 \times (\text{TGD}_{\text{nBT062-DM1}} / \text{TGD}_{\text{BT062}}),$$

más genéricamente:

Actividad de inhibición de crecimiento tumoral =

30
$$100 \times (\text{TGD}_{\text{Muestra}} / \text{TGD}_{\text{Referencia}})$$

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

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

Tabla 3: Retraso del crecimiento tumoral (TGD) y % de actividad de nBT062-DMx contra xenoinjertos tumorales MOLP-8 en ratones SCID basándose en grupos de tratamientos que recibían una dosis de 450 µg/kg.
 (*) Retraso del crecimiento tumoral en días (TGD) como tiempo medio en días para el grupo tratado para alcanzar un tamaño determinado (160 mm³) menos el tiempo medio para el grupo control para alcanzar este tamaño predeterminado.
 (**) Actividad de inhibición de crecimiento tumoral = 100 x (TGD_{Muestra}/TGD_{Referencia}). La actividad de BT062 se define como el 100%.

35 En el ejemplo proporcionado en la tabla 2, BT062 proporciona una actividad de inhibición del crecimiento de un tumor que supera la de su equivalente con impedimento (nBT602-SPP-DM1) un 60%, y una actividad de inhibición del crecimiento que supera la de su equivalente inmunconjugado con impedimento que comprende un enlazador no escindible nBT602-SMCC-DM1 un 44%.

40 Se había informado anteriormente de que un enlazador escindible en un inmunconjugado proporciona el denominado efecto espectador. Goldmahker y col. (Publicación de Patente de EE. UU 2006/0233814) también desvela que el efecto espectador es particularmente pronunciado cuando la molécula efectora se somete a más modificaciones, en particular alquilación, durante la escisión del agente dirigido. Goldmahker y col. también mostraron que UICL muestra mejor TGD que el UINCL respectivo, un hecho que también se atribuyó al que se denomina efecto espectador (véase, por ejemplo, Fig. 6 de la Publicación de Patente de EE. UU. 2006/0233814).
 45 Aquí, se encontró sorprendentemente que UICL en un régimen de dosificación único alto (250 µg/kg) normalmente no mostraba un resultado mejor que el UINCL. De hecho, en el TGD en días que se observó en un UICL con tal régimen era normalmente más bajo que el UINCL. Esta observación se volvía más pronunciada con un aumento de la dosificación (450 µg/kg). En suma, el HICL supera a UICL en experimentos de dosis única en un grado inesperado. Además, el UICL fue superado inesperadamente por UINCL a dosificaciones más altas.

50

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

Las composiciones farmacéuticas que contienen un agente dirigido no conjugado como principio activo se pueden preparar de acuerdo las técnicas de composición farmacéuticas convencionales. Véase por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a Ed. (1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Típicamente, las cantidades eficaces de los principios activos se mezclarán con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos pueden tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo intravenosa, oral, parenteral, intratecal, transdérmica o en aerosol.

Para su administración oral, el agente dirigido y/o inmunoconjugado se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, grageas, para disolver en la boca, polvos, suspensiones o emulsiones. En la preparación de las composiciones en una forma de dosificación oral, se pueden emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes suspensores y similares en el caso de preparaciones orales líquidas (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos). Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación más ventajosas, en cuyo caso obviamente se utilizan vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden estar recubiertos con azúcar o con revestimiento entérico según las técnicas de referencia. El principio activo debe ser estable para el paso a través del tracto gastrointestinal. Si fuera necesario, se pueden utilizar agentes adecuados para que pasen estables, y pueden incluir fosfolípidos o derivados de la lecitina descritos en la bibliografía, así como liposomas, micropartículas (incluyendo microsferas y macrosferas).

Para la administración parenteral, el agente dirigido y/o el inmunoconjugado se puede disolver en un vehículo farmacéutico y administrarse bien como una solución o una suspensión. Vehículos adecuados ilustrativos son agua, solución salina, solución tampón 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 suspensores, agentes solubilizantes, tampones y similares. Cuando el agente dirigido no conjugado y/o inmunoconjugado se va a administrar por vía intracerebroventricular o intratecal, se pueden disolver también en fluido cefalorraquídeo.

Las dosificaciones que se administran a un sujeto se pueden especificar como cantidad por superficie de área del sujeto (lo que incluye humanos así como animales no humanos). Las dosis se pueden administrar a tal sujeto en cantidades, preferentemente, pero no exclusivamente, desde aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m², incluyendo aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 200 mg/m², y aproximadamente 250 mg/m². Los agentes dirigidos/inmunoconjugados se administran adecuadamente de una vez o en una serie de tratamientos. En un régimen de dosis múltiples estas cantidades se pueden administrar una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada seis semanas. La carga de dosis con una dosis única alta o, de manera alternativa, dosis bajas que se administran en un corto intervalo entre ellas seguido por dosificaciones a intervalos más largos constituye una realización preferida de la presente invención. En una realización preferida el intervalo de las dosificaciones para un sujeto, se ajusta para que pase el tiempo suficiente de forma que la dosis previa se haya metabolizado sustancialmente antes de un segundo y/o posterior tratamiento, pero para que la cantidad de inmunoconjugado presente en el sistema del sujeto aún inhiba, retrase y/o prevenga el crecimiento del tumor. Un régimen ejemplar de "dosis única repetida" comprende la administración de una dosis inicial de inmunoconjugado de aproximadamente 200 mg/m² una vez cada tres semanas, De manera alternativa, una dosis inicial alta se puede continuar con una dosis de mantenimiento bisemanal de aproximadamente 150 µg/m². Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos conocidos. Las dosificaciones pueden variar dependiendo de si se administran con fines preventivos o terapéuticos, el curso de cualquier terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente dirigido/inmunoconjugado, y según el criterio del médico asistente.

De acuerdo con la presente descripción se trata el MM de la manera siguiente, por ejemplo, con el uso de nBT062 y BT062. Este ejemplo no pretende limitar la presente descripción de manera alguna, y un experto podría fácilmente determinar otro inmunoconjugado y sistemas basados en nBT062 y otros regímenes de tratamiento que podrían utilizarse para enfermedades tales como MM.

Debido a la expresión selectiva de CD138 en las células MM del paciente en las células accesibles por medio de la corriente sanguínea, a la especificidad de nBT062 y a la estabilidad de BT062 en la corriente sanguínea, el BT062

elimina la toxicidad sistémica de DM4 y proporciona la opción de dirigir el suministro de las moléculas efectoras DM4. La administración de dosis de nBT062 es beneficiosa para proteger las células no tumorales positivas que expresan CD138 de la unión del BT062 a estas células y preferentemente de la destrucción, a la vez que los inmunocombinados proporcionan un medio para la administración eficaz de las moléculas efectoras en los sitios celulares donde las moléculas efectoras pueden liberarse de los inmunocombinados. Este suministro dirigido y la liberación proporcionan un avance significativo en el tratamiento del mieloma múltiple, para el que los métodos de quimioterapia actual a veces proporcionan una remisión incompleta.

La presente invención además se describe en referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen como una manera solo de ilustración. Se utilizan técnicas de referencia bien conocidas en la técnica o técnicas descritas específicamente posteriormente.

Materiales y métodos

15 Construcción del anticuerpo quimérico (cB-B4: nBT062)

B-B4

El anticuerpo murino B-B4 se utilizó en estos experimentos como se había caracterizado anteriormente (Wijdenes y col., Br J Haematol., 94 (1996), 318).

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

Se llevaron a cabo técnicas de ADN recombinante de referencia como se describen en detalle en los libros de texto, por ejemplo en J. Sambrook; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 2ª Ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU, o como recomiendan las instrucciones del fabricante en los casos en que se utilizaron kits. La clonación por PCR y la modificación de las regiones variables de ratón se llevaron a cabo utilizando metodología PCR. Se utilizaron los cebadores indicados en la respectiva sección de resultados.

30 Expresión de cB-B4/ nBT062

Las células COS en crecimiento exponencial, cultivadas en DMEM suplementado con un 10% de FCS, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin, se recolectaron por tripsinización y centrifugación y se lavaron en PBS. Las células se suspendieron en PBS a una concentración final de 1×10^7 células/ml. Se transfirieron 700 µl de la suspensión celular de COS a una cubeta Gene Pulser y se mezclaron con el vector ADN de expresión de cadena pesada y ligera kappa (10 µg de cada o 13 µg de Suprvector). Las células se electroporaron a 1900 V, 25 µF utilizando el Bio-Rad Gene Pulser. Las células transformadas se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de gamma-globulina libre de FBS, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin durante 72 h antes de recolectarse los sobrenadantes del cultivo celular que contenían los anticuerpos.

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

Se recubrieron placas de 96 pocillos con alícuotas de 100 µl de 0,4 µg/ml de anticuerpo IgG de cabra anti-humano diluido en PBS (a 4 °C una noche). Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS+ 0,1% de Tween-20). Los pocillos se bloquearon con de BSA al 0,2%, Tween-20 al 0,02% en PBS antes de la adición de 200 µl de sobrenadante del cultivo celular que contenía el anticuerpo segregado (incubación a 37 °C durante 1 hora). Los pocillos se lavaron seis veces con tampón de lavado, antes de la detección de la unión del anticuerpo con el conjugado peroxidasa - cadena ligera kappa de cabra anti-humana.

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

El anticuerpo cB-B4 se purificó del sobrenadante de las células COS7 transformadas utilizando el kit de Proteína A ImmunoPure Plus (Pierce, Rockford, IL), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Unión de cB-B4 y ensayo de competición

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

Preparación del ARN y síntesis de ADNc

Las células de hibridoma B-B4 se cultivaron y se 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 cadena de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo del fabricante.

Clonación del ADNc de la inmunoglobulina B-B4

5 El ADNc de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) se amplificó por PCR utilizando el cebador IgH MHV7 (5'-ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG- 3') [SEC ID N° 3] y el cebador de la región constante de IgG1 MHCG1 (5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG- 3') [SEC ID N° 4]. De manera similar, la cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) se amplificó utilizando los diferentes cebadores Ig κ MKV2 (5'-ATGGAGACAGACACACTCCTG
10 CTATGGGTG-3') [SEC ID N° 5], MKV4 (5'-ATGAGGGCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTCTTG-3') [SEC ID N° 6] y MKV9 (5'-ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') [SEC ID N° 7], cada uno en combinación con el cebador MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3') [SEC ID N° 8]. Todos los productos de amplificación se ligaron directamente con el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

Determinación de la secuencia ADNc

20 Los plásmidos se secuenciaron utilizando el kit BigDye Termination v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI, Foster City, CA). Cada plásmido seleccionado se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores 1210 y 1233 ciclados en una máquina PCR GeneAmp9600. El análisis de secuencia electroforética se hizo en un secuenciador de capilaridad ABI.

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

Secuencia de ADN B-B4 V κ

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

40 Los productos de la PCR utilizando cebadores MKC, con MKV4 y MKV9 fueron similares unas a otras y se diferenciaban solamente en las posiciones oscilantes con el cebador director de secuencia.

Secuencia de ADN B-B4 VH

45 La síntesis de la primera cadena se llevó a cabo en tres reacciones independientes y los productos PCR se clonaron y se secuenciaron de cada producto de 1ª cadena. Se secuenciaron cinco clones de cada 1ª cadena.

Construcción de los vectores de expresión de cB-B4 quimérico

50 La construcción de los vectores de expresión quiméricos conlleva la adición de una secuencia directora adecuada para VH y VK, precedida por el sitio de restricción BamHI y una secuencia Kozak. La secuencia de consenso Kozak es crucial para la traducción eficaz de una secuencia de región variable. Define el codón correcto AUG desde el que un ribosoma puede comenzar la traducción, y la única base más crítica es la adenina (o menos preferentemente, una guanina) en la posición 3, corriente arriba del AUG de inicio. La secuencia directora se selecciona como la secuencia más similar en la base de datos Kabat (Kabat y col., NIH National Technical Information Service, 1991).

55 Estas adiciones se codificaron con los cebadores directos (For) (ambos tenían la secuencia 5'-AGAGAAGCTTGCCGCCACCATGATT-GCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCC-3' [SEC ID N° 9]; el sitio de restricción está subrayado; la secuencia Kozak está en negrita). Además, la construcción de los vectores de expresión quiméricos conllevan la introducción de un fragmento 5' de la región constante humana gamma1, por encima de un sitio de restricción natural Apal, contiguo con el extremo 3' de la región J de B-B4 y, para la cadena ligera, la adición de un sitio de unión donante y un sitio *Hind*III. La secuencia donante de unión es importante para corregir la unión en fase de la región variable a su región constante apropiada, uniéndose así al intrón V: C. El intrón kappa +CK se codifican en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia B-B4 V κ . De manera similar, la CH gamma-4 está codificada en la construcción de expresión corriente abajo de la secuencia B-B4 VH.

65 Los genes B-B4 VH y V κ se analizaron primero cuidadosamente para identificar sitios donantes de unión no deseados, sitios aceptores de unión, secuencias Kozak y la presencia de cualquier sitio de restricción extra de sub-

clonación que más tarde interferirían en la subclonación y/o expresión de un anticuerpo funcional completo. Se encontró un sitio *HindIII* no deseado en la secuencia V_K que se eliminó necesariamente por mutagénesis dirigida al sitio por medio de PCR sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Para estas reacciones se utilizaron los cebadores oligonucleótidos BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEC ID N° 10] y BT04 (5'-CCACCGAACGTCCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3') [SEC ID N° 11] y se llevó a cabo la mutagénesis de acuerdo con el protocolo del kit de mutagénesis Quickchange de Stratagene (La Jolla, CA).

Cebadores de quimerización de la cadena Kappa

La secuencia directora B-B4 V_K no ambigua, independiente de la secuencia cebadora de PCR, se alineó con las secuencias murinas directoras de la base de datos Kabat. La correspondencia más cercana de la directora B-B4 VH era VK-10 ARS-A (Sanz y col., PNAS, 84 (1987), 1085). Esta secuencia directora se predice que se ha recortado correctamente por el algoritmo SignalP (Nielsen y col., Protein Eng, 10 (1997); 1). Se diseñaron los cebadores CBB4Kfor (véase anteriormente) y g2258 (5'-CGCGGATCCACTCACGTTTGATTCCAGCTTGGTGCCTCC-3') [SEC ID N° 12]; el sitio de restricción está subrayado) para generar un producto de PCR que contenía esta directora completa, la región B-B4 VK y los sitios terminales de restricción *HindIII* y BamHI, para clonarlos en el vector de expresión pKN100. El cebador directo, CBB4K introduce el sitio de restricción *HindIII* un sitio de inicio de traducción Kozak y la secuencia directora VK-10 ARS-A. El cebador inverso g2258 introduce un sitio donante de unión y un sitio de restricción *BamHI*. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *HindIII/BamHI* de pKN100.

Cebadores de quimerización de cadena pesada

La secuencia directora no ambigua B-B4 VH, independiente de la secuencia cebadora de PCR, se alineó con secuencias directoras murinas de la base de datos Kabat. La correspondencia más cercana para la directora B-B4 VK era VH17-1A (Sun y col., PNAS, 84 (1987), 214). Se predecía que esta secuencia directora se recortaría correctamente por el algoritmo SignalP. Se diseñaron los cebadores cBB4Hfor (véase anteriormente) y g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGA-GACGGTGACTGAGGTTCC-3') [SEC ID N° 13]; el sitio de restricción está subrayado) para generar un producto PCR que contenía la directora VH17-1A, la región B-B4 VH, y los sitios de restricción terminales *HindIII* y *Apal*, para clonarlos en el vector de expresión pG4D200. El cebador directo cBBHFor introduce un sitio de restricción *HindIII*, un sitio de inicio de la traducción Kozak y la secuencia directora VH17-1A. El cebador inverso g22949 introduce el extremo 5' de la región gamma 4 C y un sitio de restricción *Apal* natural. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *HindIII/Apal* de pG4D200, dando como resultado el vector pG4D200cBB4.

Producción de anticuerpo B-B4

Se descongeló un vial de células COS7 y se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de suero fetal clon I con antibióticos. Una semana más tarde, las células (0,7 ml con 10^7 células/ml) se electroporaron con pG4D200cBB4 más pKN100cBB4 (10 μ g de ADN cada uno) o sin ADN. Las células se pusieron en placas en 8 ml de medio de crecimiento durante 4 días. Se repitió la electroporación siete veces.

Detección de anticuerpo quimérico

Se utilizó un ELISA sándwich para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes de los cultivos. Las células COS 7 transformadas transitoriamente segregaban aproximadamente 6.956 ng/ml de anticuerpo (datos no mostrados).

Actividad de unión de cB-B4

Para ensayar la actividad de unión de cB-B4 en los sobrenadantes del cultivo de COS 7, se utilizó el kit Diaclone sCD138 un ELISA sándwich de fase sólida. Se revistieron los pocillos con un anticuerpo monoclonal específico para sCD138 de las tiras microtiter proporcionadas. Durante la primera incubación, se incubaron simultáneamente sCD138 y anticuerpo B-B4 biotinilado (bio-B-B4) junto con series de diluciones de anticuerpo no marcado (B-B4 o cB-B4).

Las concentraciones de bio-B-B4 en este ensayo se redujeron con el fin de obtener una competición con bajas concentraciones de anticuerpo no marcado (la concentración de cB-B4 en sobrenadantes de cultivo celular COS 7 eran por otra parte demasiado baja para obtener una competición suficiente). Los resultados de este ensayo revelan que ambos anticuerpos tiene la misma especificidad para el CD138 (datos no mostrados).

Purificación de cB-B4

El B-B4 quimérico se purificó a partir de los sobrenadantes de las células COS7 utilizando el kit de proteína A ImmunoPure Plus (Pierce), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (datos no mostrados).

Determinación de K_D : Comparación de nBT062/ B-B4

Purificación de CD138 soluble

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

10 *Biotinilación de CD138*

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

15 Para la biotinilación de CD138 se desalaron 50 μ l de CD138 utilizando las columnas de centrifugación de desalado proteico (Pierce). El Reactivo de biotinilación (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) se disolvió en H₂O desionizada enfriada en hielo hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. El reactivo de biotinilación y la solución del reactivo de captura se mezclaron obteniendo un exceso molar de reactivo de biotinilación de 12 veces comparado con el reactivo de captura (50 pmol de CD138 cada 600 pmol de reactivo de biotinilación) y se incubó 1 h a temperatura ambiente mientras se agitaba el vial cuidadosamente. El reactivo de biotinilación no unido se eliminó utilizando las columnas de desalado proteico.

25 *Inmovilización de bCD138*

El chip sensor (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) que se utiliza en el ensayo BIACORE está diseñado para unirse a moléculas biotiniladas por el análisis de interacción en sistemas BIACORE. La superficie consiste en una matriz de dextrano carboximetilado preinmovilizado con estreptavidina y preparado para la captura de alta afinidad de ligandos biotinilados. La inmovilización de bCD138 se llevó a cabo en el SENSOR CHIP SA utilizando una tasa de flujo de 10 μ l/min por inyección manual. La superficie del chip se acondicionó con tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1 M en 50 mM de NaOH. Luego se inyectó el CD138 biotinilado durante 1 minuto.

Determinación de K_D de diferentes anticuerpos utilizando BIACORE

35 El software de BIACORE C utiliza máscaras pre-definidas, denominadas "Asistentes" para los diferentes experimentos donde solo se pueden cambiar ciertos ajustes. Como el BIACORE C se desarrolló originalmente para medir concentraciones, no hay un asistente diseñado para llevar a cabo mediciones de afinidad. Sin embargo, con los ajustes adecuados, el asistente para "uniones no específicas" se podía utilizar para medir las constantes de la tasa de afinidad y por lo tanto se utilizó para la determinación de la K_D . Con este asistente, se midieron los flujos de dos células y la fase de disociación se fijó a 90 s actuando la "Regeneración 1" con el tampón de operación BIACORE. La "Regeneración 2" que es equivalente a la regeneración real se llevó a cabo con Glicina-HCl 10 mM a pH 2,5. Tras esta etapa, el ligando CD138 estaba en su estado de unión competente de nuevo. Durante todo el procedimiento se utilizó HBS-EP como tampón de trabajo y dilución. Para determinar la unión de los diferentes anticuerpos (~ 150 kDa) a CD138, se analizó la asociación y disociación a diferentes concentraciones (100, 50, 25 40 12,5, 6,25 y 3,13 nM). Las constantes de equilibrio de disociación se determinaron calculando las tasas de las constantes k_a y k_d . Tras esto, se calcularon los valores de K_D de los analitos por el cociente de k_d y k_a con el software BIAevaluation. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

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

Anticuerpo	Afinidad	
	K_D (nM)	media de K_D (nM)
nBT062	1,4	1,4 +/- 0,06
	1,4	
	1,5	
B-B4	1,7	1,6 +/- 0,06
	1,7	
	1,6	
n BT062-SPDB-DM4	1,9	1,9 +/- 0,00
	1,9	
	1,9	
B-B4-SPP-DM1	2,6	2,6 +/- 0,06
	2,7	
	2,6	

Conclusiones

Los valores medios de K_D para cada anticuerpo se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que todas las mediciones nBT062 presentan valores de K_D menores comparados con los de B-B4 (los valores medios de K_D fueron 1,4 y 1,6 nM, respectivamente).

Preparación de Inmunoconjugados

n BT062-DM1 y huC242-DM1

El maitansinoide DM1 que contiene tiol se sintetizó como producto de fermentación microbiana de la ansamitocina P-3, como había descrito anteriormente Chari (Chari y col., Cancer Res. 1 (1992), 127). Se había descrito anteriormente la preparación de C242 humanizado (huC242) (Roguska y col., PNAS, 91 (1994), 969). Los conjugados anticuerpo-fármaco se prepararon como se había descrito anteriormente (Liu y col., PNAS, 93 (1996), 8618). Se unieron una media de 3,5 moléculas de DM1 a las moléculas de anticuerpo.

n BT062-DM4

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

Síntesis de DM-4

El DM-4 se preparó a partir del derivado bien conocido maitansinol (Kupchan y col., J. Med. Chem., 21 (1978), 31). El Maitansinol se prepara por escisión reductiva del resto éster del producto de fermentación microbiana, ansamitocina P3, con hidruro de litio trimetoxialuminio (véase FIG. 3).

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

BT062 Inmunoconjugado

El procedimiento para la preparación de nBT062-DM4 se representa en la FIG. 5. El anticuerpo nBT062 se modifica con N-succinimidil-5-(2-piridilditio) butirato (enlazador SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El DM4 se mezcla con el anticuerpo modificado a una concentración en exceso de los equivalentes de los grupos ditiopiridilo. El conjugado de BT062 se forma por una reacción de intercambio disulfuro entre el grupo tiol de DM4 y los grupos ditiopiridilo introducido en el anticuerpo por medio del enlazador. La purificación por cromatografía y diafiltración retira los reaccionantes de bajo peso molecular (DM4) y los productos de reacción (tiopiridina), así como los agregados de anticuerpo conjugado, para producir la sustancia fármaco a granel.

Análisis FACS y ensayos de citotoxicidad WST

Análisis FACS

Las células OPM-2 son células plasmáticas de líneas celulares de leucemia que muestran una alta expresión de CD138. Las células OPM-2 se incubaron con nBT062, nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (indicado en la FIG- 6). Se lavaron las células y se detectaron los anticuerpos unidos a CD138 o los conjugados utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en el análisis FACS. La fluorescencia media medida en estos experimentos se representó contra la concentración de anticuerpos.

Ensayo de viabilidad celular

Las células MOLP-8 CD138⁺ se sembraron en placas de fondo plano a 3.000 células/pocillo. Las células control BJAB CD138⁻ se sembraron a 1.000 células/pocillo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 o nBT062-SMCC-DM1 a diferentes concentraciones (indicadas en la FIG.7) durante cinco días. Se añadió el reactivo WST (sal de tetrazolol soluble en agua, ROCHE) con el fin de medir la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). El reactivo se incubó durante 7,5 h en las células MOLP-8 y durante 2 h en las células BJAB. La fracción de células supervivientes se calculó basándose en las densidades medidas en un lector de microplacas utilizando los procedimientos de referencia.

Conclusiones

Se analizó la unión de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 o nBT062 por FACS. Se incubaron las células OPM-2 CD138⁺ como células diana con nBT062 o inmunoconjugados y se detectaron las moléculas de unión celular utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. En la FIG. 6, las fluorescencias medias medidas por la cantidad de células unidas al anticuerpo se representaron contra los diferentes anticuerpos o las concentraciones de conjugado. 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 de los anticuerpos no conjugados no se afectan por las toxinas conjugadas.

En los ensayos de viabilidad celular, se analizó la actividad citotóxica de los anticuerpos contra las células diana MOLP-8 CD138⁺ y contra las células control de linfoblastoma B BJAB CD138⁻. Ambas líneas celulares se sembraron en placas de fondo plano y se incubaron con concentraciones crecientes de los inmunoconjugados. El anticuerpo no conjugado se utilizó como control. La actividad citotóxica se analizó cinco días después de la adición de los inmunoconjugados utilizando el reactivo WST con el fin de medir la viabilidad celular. En la FIG. 7 (A) – (C), la fracción de células supervivientes en relación a las células control tratadas con el vehículo control, se representa contra las concentraciones crecientes de inmunoconjugados. Los resultados muestran que la actividad citotóxica de nBT062- SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 contra las células MOLP-8 era muy similar. Como se esperaba las células control BJAB CD138⁻ no fueron destruidas por los inmunoconjugados lo que indica que todos los inmunoconjugados actúan por medio de unión específica celular al CD138. En los experimentos de competición, en los que las células MOLP-8 fueron preincubadas con un exceso molar de nBT062 no conjugado. La preincubación bloquea sustancialmente la citotoxicidad de nBT062-SPDB-DM4, proporcionando una prueba más de que los inmunoconjugados destruyen las células por medio de la unión específica a CD138 en la superficie celular (FIG. 7 (D)).

Experimentos de xenoinjerto en ratón

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

En estos ratones, se establecieron tumores subcutáneos (ratones hembra SCID CB.17) por inoculación con suspensiones celulares de MOLP-8. El tratamiento con una inyección única en embolada se realizó cuando los volúmenes tumorales alcanzaron una media de 113 mm³. Los cambios en el volumen tumoral y el peso corporal se controlaron dos veces por semana. Los experimentos se llevaron a cabo durante 68 días después de la inoculación de las células tumorales.

Experimentos de xenoinjerto en ratón A

Ratones

Ratones hembra SCID CB.17, de cinco semanas de edad, que se obtuvieron en Charles River Laboratories.

Líneas celulares tumorales humanas

MOLP-2, una línea celular de mieloma múltiple humano, suministrado por la ATCC. Las células MOLP-2, que expresan el antígeno CD138 en su superficie celular y desarrolla tumores por xenoinjerto en ratones SCID, se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina 4 nM (Biowhittaker, Walkersville, MD), 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah) y un 1% de estreptomycin/penicilina, a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂.

PARTE I

Crecimiento tumoral en ratones

Cada ratón se inoculó con 1x10⁷ células MOP-2 por vía subcutánea en el área bajo el hombro derecho. El volumen total era de 0,2 ml por ratón, en el que la relación de medio libre de suero y matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) era 1/1 (v/v). Antes del tratamiento, los tumores de xenoinjerto se controlaron diariamente y se permitió que se establecieran. El volumen tumoral alcanzó 113 mm³ aproximadamente 11 días después de la inoculación de las

células tumorales. La tasa de adquisición del tumor en los ratones SCID CB.17 fue del 100%.

Once días después de la inoculación de las células tumorales, se seleccionaron 42 ratones basándose en los volúmenes tumorales y los pesos corporales. El volumen tumoral estaba en un intervalo de 68,2 a 135,9 mm³. los cuarenta y dos ratones se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos (A-G) de seis animales cada uno según el volumen tumoral.

Cada uno de los seis ratones del Grupo A recibieron 200 µl de PBS como control de vehículo. Cada ratón del grupo B recibieron 13,8 mg/kg de anticuerpo nBT062 sin más. Esta dosis es equivalente a la cantidad de 250 µg/kg de componente BT062 unido al maitansinoide. La relación de pesos moleculares de maitansinoides respecto al anticuerpo nBT062 en una molécula conjugada es aproximadamente de 1/55. Cada ratón el Grupo C recibió 250 µg/kg de DM4. Cada ratón del Grupo D recibió 250 µg/kg de huC242-DM4. Los ratones de los grupos E, F y G recibieron 250 µg/kg de nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1 cada uno, respectivamente.

Todos los agentes se administraron por vía intravenosa como inyección única en embolada por la vena lateral de la cola con una jeringa de 1 ml fijada a una aguja de 27 gauge, de media pulgada. Antes de la administración las soluciones madre de anticuerpos 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 forma que el volumen inyectado a cada ratón estaba entre 120-220 µl.

PARTE II

En un segundo grupo de experimentos, se inyectaron 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 subcutáneamente en el área bajo el hombro derecho a 100 µl. Los volúmenes alcanzaron volúmenes de aproximadamente 80 mm³ el día 11 y la media de los controles era aproximadamente de 750 mm³ el día 25, después de la inoculación de las células. El tiempo de doblaje del tumor se estimó que era 4,58 días. Cada ratón del grupo control (n=6) recibió 0,2 ml de PBS estéril administrado en la vena lateral de la cola (i.v.) por inyección en embolada. Todas las dosis de tratamiento se basaron en el maitansinoide conjugado. Se trataron nueve grupos (n=6) con una inyección única intravenosa de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDBDM4, o nBT062-SPP-DM1, cada dosis de 450, 250 y 100 µg/kg. Un grupo adicional (n=6) recibió 250 µg/kg de nBT062-SMCC-DM1 en dosificación repetida (semanalmente durante cinco semanas). Los ratones se repartieron aleatoriamente en once grupos (n=6) por el volumen tumoral utilizando el Programa LabCat. Los volúmenes tumorales variaban desde 40,0 a 152,5 mm³. Los ratones se dosificaron en base a su peso corporal.

El tamaño tumoral se midió dos veces a la semana en tres dimensiones utilizando el Sistema LabCat (Medición y Seguimiento Tumoral, Innovative Programming Associated, Inc., Princeton, NJ). El tamaño del tumor en mm³ se calculó utilizando la metodología descrita en Tomayko y col., Cancer Chemother. Pharmacol, 24 (1989), 148:

$$\text{Volumen} = \text{Longitud} \times \text{Anchura} \times \text{Altura} \times 1/2$$

El Log₁₀ de destrucción celular se calculó con la fórmula descrita en Bissery y col., Cancer Res., 51 (1991), 4845:

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

donde (T-C) o retraso del crecimiento tumoral, es el tiempo medio que se necesita en días para el grupo de tumores en tratamiento (T) y el grupo control (C), para alcanzar un tamaño predeterminado (600 mm³). T_d es el tiempo de doblaje del tumor, basándose en el volumen tumoral medio en los ratones control, y 3,32 es el número de doblajes celulares por el log de crecimiento celular.

Resultados

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

Al compararse con el crecimiento tumoral en los animales tratados con PBS, el tratamiento con anticuerpo nBT062, no conjugado libre de DM4 o el conjugado huC242-DM4 no dirigido irrelevante no produjeron inhibición significativa del crecimiento tumoral.

Los tres conjugados dirigidos contra CD138, nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1, a la dosis de 250 µg/kg produjeron un marcado retraso del crecimiento tumoral. Basándose en la media de volúmenes tumorales medidos en los grupos de tratamiento el conjugado con DM4, nBT062-SPDB-DM4, era el más activo, mientras que el conjugado nBT062-SPP-DM1 mostraba una actividad ligeramente mayor al compararse con su equivalente murino B-B4-SPP-DM1 (FIG. 10). Los resultados obtenidos en ratones individuales mostraron además de que la actividad antitumoral obtenida con B-B4-SPP-DM1 es más heterogénea y por lo tanto menos predecible que la que se mide con los ratones tratados con nBT062-SPP-DM1. En términos de homogeneidad de actividad

antitumoral, el otro conjugado que utilizaba nBT062 como anticuerpo dirigido nBT062-SPDB-DM4 permanecía siendo similar a nBT062-SPP-DM1.

5 No se observó ninguna reducción de peso en ningún grupo de tratamiento, sugiriendo que los tratamientos se toleraban bien.

Conclusiones

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

15 El inmunoconjugado preparado a partir del anticuerpo quimérico humano, nBT062-SPP-DM1, tenía una actividad antitumoral ligeramente mayor que el conjugado preparado a partir de su equivalente murino B-B4-SPP-DM1. Además, el tratamiento con nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4 daba como resultado respuestas más homogéneas en ratones individuales al compararse con el tratamiento con B-B4-SPP-DM1. La alta variabilidad de unión de nBT062-SPP-DM1 explicaba que la medición del volumen medio tumoral (+/- DE) de los xenoinjertos de células MOLP-8 de mieloma múltiple humano en ratones SCID CB.17 durante el tiempo (días) tras inoculación proporcionara normalmente resultados relativamente mejores para B-B4-SPP-DM1 que para nBT062-SPP-DM1, (datos no mostrados). Esta característica de los inmunoconjugados que utilizan nBT062 como anticuerpo dirigido parece que es beneficioso especialmente para el uso terapéutico de los conjugados.

20 Por último, el conjugado maitansinoide más potente, a continuación de la administración única iv en modelos de ratones SCID con xenoinjertos de MOLP-8, era el nBT062-SPDB-DM4.

Experimentos de xenoinjerto en ratón B

30 En este grupo de experimentos, se inocularon ochenta y cinco ratones con células MOLP-8 ($1,5 \times 10^7$ células/ ratón) por vía subcutánea en el hombro derecho. La tasa de adquisición del tumor era del 100%. Sesenta y seis ratones SCID que tenían masas tumorales de MOLP-8 con un volumen medio tumoral de aproximadamente 80 mm^3 se repartieron aleatoriamente en 11 grupos de tratamiento ($n=6$). Los ratones se trataron con una dosis única de uno de los tres conjugados (nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1). Un grupo adicional recibió cinco dosis semanales de nBT062-SPP-DM1 y un grupo control recibió una dosis única de PBS. Los volúmenes tumorales medios se muestran en la **FIG. 11A**. Se estableció una respuesta a la dosis para cada conjugado. Se alcanzó un volumen tumoral medio de 750 mm^3 en los animales tratados con PBS el día 25. El tiempo de doblaje del tumor que se determinó por la curva de regresión lineal mejor ajustada sobre un gráfico logarítmico lineal de control del crecimiento tumoral era de 4,58 días. Los animales tratados con $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ de nBT062-SPDB-DM4 tenía el mayor logaritmo de destrucción celular ($\text{LCK}= 2,1$; véase la Tabla 5). La comparación de las curvas de la media de crecimiento tumoral para los grupos de tratamiento por mediciones ANOVA repetidas realizando el ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett mostró una diferencia significativa entre el grupo control de PBS y el nBT062-SPDB-DM4 a $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.01$), el nBT062-SPDB-DM4 ($p<0.05$) $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ y el nBT062-SMCC-DM1 con cinco dosis semanales de $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.05$). No se produjo la regresión completa ni parcial del tumor en ninguno de los grupos de tratamiento con la excepción de un animal que recibió $450 \mu\text{g}/\text{kg}$ de nBT062-SPDB-DM4, que tuvo una regresión parcial del tumor hasta el día 85 tras la inoculación.

Tabla 5. Valores del Log de destrucción celular (LCK) como medida de la actividad antitumoral de los diferentes conjugados n BT062-DMx en diferentes esquemas de dosificación. Véase la sección Materiales y métodos para la información sobre el cálculo de los valores LCK

Material de ensayo	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LCK	Dosificación
PBS			Dosis única
nBT062-SMCC-DM1	450	0,85	Dosis única
nBT062-SMCC-DM1	250	0,53	Dosis única
nBT062-SMCC-DM1	100	0	Dosis única
nBT062-SPDB-DM4	450	2,89	Dosis única
nBT062-SPDB-DM4	250	1,05	Dosis única
nBT062-SPDB-DM4	100	0,39	Dosis única
nBT062-SPP-DM1	450	0,8	Dosis única
nBT062-SPP-DM1	250	0,39	Dosis única
nBT062-SPP-DM1	100	0,2	Dosis única
nBT062-SMCC-DM1	200	2,1	Semanalmente durante 5 semanas

Referencias:

- 5 Akkina RK, Rosenblatt JD, Campbell AG, Chen IS, Zack JA. Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1994; 84:1393-1398.
- 10 Armour KL, Clark MR, Hadley AG, y col. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*. 1999; 29(8):2613-24.
- 15 Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. 2001 Jun; 32(3):297-305.
- 20 Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 1 Ago. 2003;98(3):474-83.
- 25 Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. Sep. 2006;91(9):1234-40. Review.
- 30 Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992; 8:365-393.
- 35 Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96, 1898-1903.
- 40 Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett*. 1977; 75:159-162.
- 45 Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Müller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2079-89. Epub 8 Nov 2005.
- 50 Blättler WA and Chari RVJ. Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs. In: Ojima, I., Vite, G.D. and Altmann, K.-H., Editors, 2001. *Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 317-338.
- 55 Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1490-1496.
- 60 Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, Ferlito A, Rinaldo A, Stein H. AIDS-related plasma- blastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 1999; 108: 95-99.
- 65 Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J* 1978; 173: 723-737.
- Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1:118-129.
- Chari RV, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blattler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res*. 1992; 52:127-131.
- Chari RV, Jackel KA, Bourret LA, Derr SM, Tadayoni BM, Mattocks KM, Shah SA, Liu C, Blättler WA y Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res*. 1995; 55: 4079-4084.
- Charnaux N, Brule S, Chaigneau T, Saffar L, Sutton A, Hamon M, Prost C, Lievre N, Vita C, Gattegno L. RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. *Glycobiology*. 8 Sep 2004 [Epub ahead of print]

- Chen BP, Galy A, Kyoizumi S, Namikawa R, Scarborough J, Webb S, Ford B, Cen DZ, Chen SC. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*. 1994; 84: 2497-2505.
- 5 Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*. 1999; 12: 1101-1106.
- 10 Clement C, Vooijs, W.C., Klein, B., y Wijdenes, J. En: al. SFSe, ed. J. Leucocyte Typing V. Oxford: Oxford University Press; 1995:714-715.
- Couturier O, Faivre-Chauvet A; Filippovich IV; Thedr ez P, Sai-Maurel C; Bardi es M; Mishra AK; Gauvrit M; Blain G; Apostolidis C; Molinet R; Abbe JC; Bateille R; Wijdenes J; Chatal JF; Cherel M; Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 5(10 Suppl.) (Oct 1999) 3165s-3170s.
- 15 Davies EJ y col., Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer *Clin Cancer Res*. 2004; 10(15):5178-86.
- 20 Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*. 1998; 91: 2679-2688.
- 25 Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of BB2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett*. 1998; 426: 67-70.
- Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibodytargeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol*. 2001; 41: 1206-1214.
- 30 Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia*. 1999; 1: 303-310.
- 35 Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol*. 1999;104:152-162.
- 40 Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upeslaciis J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem*. 2002; 13: 40-46.
- 45 Han I, Park H, Oh ES. New insights into syndecan-2 expression and tumorigenic activity in colon carcinoma cells. *J Mol Histol*. 2004; 35(3): 319-26.
- Horvathova M, Gaillard, J.-P., Liutard, J., Duperray, C., Lavabre-Bertrand, T., Bourquard, P y col. In: al. SFSe, ed. *Leucocyte Typing V*. Oxford: Oxford University Press; 1995: 713-714.
- 50 Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A y col. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. 2001. *J. Immunol. Methods* 254, pp. 67-84.
- 55 Kupchan SM, Sneden AT, Branfman AR, Howie GA, Rebhun LI, Mclvor WE, Wang RW, Schnaitman TC. Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids. *J Med Chem*. 1978;21:31-37.
- Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H, McCune JM, Yee EJ, Namikawa R. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*. 1992; 79: 1704-1711.
- 60 Kyoizumi S, Murray LJ, Namikawa R. Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1993; 81: 1479-1488.
- 65 Langford JK, Stanley MJ, Cao D, Sanderson RD. Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function. *J Biol Chem*. 1998 Nov 6; 273 (45): 29965-71.

- 5 Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blattler WA, Chari RV. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8618-8623. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*. 1988; 241: 1632-1639.
- 10 Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz HD, Thierauch KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*. Jun 2004; 40(9):1373-82.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
- 15 Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCIDhu mice. *Blood*. 1993; 82: 2526-2536.
- O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:254-263.
- 20 Ojima I, Geng X, Wu X, Qu C, Borella CP, Xie H, Wilhelm SD, Leece BA, Bartle LM, Goldmacher VS and Chari RV. Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates. 2002. *J. Med. Chem.* 45, pp. 5620-5623.
- 25 Olafsen, T, Cheung, CC, Yazaki, PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman, MA, Williams, LE, Shively, JE, Raubitschek, AA, and Wu, AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. 2004; *Prot. Eng. Design & Selection* 17:1: 21-27.
- Orosz Z, Kopper L. Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. *Anticancer Res*. 2001; 21(1B):733-7. Padlan, EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol*. 1991; 28: 489-498.
- 30 Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2003; 3: 207-212.
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA and Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. 1998. *J. Clin. Oncol.* 16, pp. 2659-2671.
- 35 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997; 97: 46-55.
- Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science*. 1975; 189: 1002-1005.
- 45 Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 969-973.
- 50 Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, Lutz RJ, Frantz G, Hillan K, Peale F, Tobin P, Eberhard D, Rubin MA, Lasky LA, Koeppen H. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res*. 1 May 2002; 62(9): 2546-53.
- 55 Ross JS, Gray K, Gray G, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer Antibodies, *Am J Clin Pathol*. (4/17/2003). Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*. 1989; 1: 27-35.
- 60 Sandhu JS, Clark BR, Boynton EL, Atkins H, Messner H, Keating A, Hozumi N. Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone. *Blood*. 1996; 88:1973-1982.
- Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res*. 1995; 55: 3551-3557.
- 65

- Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *Br J Haematol.* 1997; 97: 56-64.
- 5 Schuurman J, Van Ree R, G. J. Perdok GJ, Van Doom HR, Tan KY, Aalberse RC, Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites, *Immunology* 1999; 97: 693-698.
- Sebestyen A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol.* 1999; 104(2):412-9.
- 10 Seftalioglu A, Karakus S. Syndecan-1/CD138 expression in normal myeloid, acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells. *Acta Histochem.* 2003; 105: 213-221.
- Seftalioglu A, Karakus S, Dundar S, Can B, Erdemli E, Irmak MK, Oztas E, Korkmaz C, Yazar F, Cavusoglu I. Syndecan-1 (CD138) expression in acute myeloblastic leukemia cells--an immuno electron microscopic study. *Acta Oncol.* 2003; 42: 71-74.
- 15 Senter PD, Doronina S, Cerveny C, Chace D, Francisco J, Klussman K, Mendelsohn B, Meyer D, Siegall CB, Thompson J y col. (2002). Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates. Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.), 414.
- 20 Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001; 276(9): 6591-604.
- 25 Sievers EL, Larson R.Å., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L. y col. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. 2001. *J. Clin. Oncol.* 19, pp. 3244-3254.
- 30 Sievers EL and Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. 2001. *Curr. Opin. Oncol.* 13, pp. 522-527.
- Smith R., Single chain antibody variable region fragments; www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html (última actualización en Mayo, 2001).
- 35 Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng.* 1994; 7(6): 805-814.
- 40 Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shamma MA, Whiteman KA, Hylander-Gans LL, Carrasco DR, Hideshima T, Shringarpure R, Shi J, Allam CK, Wijdenes J, Venuta S, Munshi NC, Anderson KC, Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells, *Blood*, 2004, 104 (12), pp. 3688-3696.
- 45 Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, Patnaik A, Edwards T, Takimoto C, Smith L, de Bono J, Schwartz G, Mays T, Jonak ZL, Johnson R, DeWitte M, Martino H, Audette C, Maes K, Chari RV, Lambert JM, Rowinsky EK. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 211-222.
- 50 Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dedera DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood.* 1997; 90: 754-765.
- 55 Vogel CW. Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties. *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods.* 2004; 283: 087-108.
- Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, Stirpe F, Bast EJ, de Gast GC. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother.* 1996; 42: 319-328.
- 60 Ward, E.S., D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, and G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 1989. 341: 544-546.
- 65

- Wargalla UC, Reisfeld RA. Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 5146-5150.
- 5 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996; 94:318-323.
- Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138, *J Biol Regul Homeost Agents.* Abr-Jun 2002; 16(2): 152-5.
- 10 Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry.* 1996; 26:113-120.
- Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* Mar 2004; 308(3):1073-82.
- 15 Yang M, Jiang P, An Z, Baranov E, Li L, Hasegawa S, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 3549-3559.
- 20 Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 1206-1211.
- 25 Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodavsky I, Suva LJ, Epstein J, Yaccoby S, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Sanderson RD. The syndecan- 1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood.* 2007 Sep 15; 110(6):2041-8. Epub 29 May 2007.
- 30 Yoshitake S, Yamada Y, Ishikawa E, Masseyeff R. Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. *Eur J Biochem* 1979; 101: 395-399.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Biotest AG
- <120> AGENTES DIRIGIDOS CONTRA CD138 Y USOS DE LOS MISMOS
- 40 <130> 319936.WO/JND/CJS
- <150> 61/016.630
- <151> 26-12-2007
- 45 <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 448
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos (predicha) de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano/de ratón
- <220>
- <221> CDR1
- <222> (31)..(35)
- 60 <220>
- <221> CDR2
- <222> (51)..(68)
- 65 <220>
- <221> CDR3

ES 2 475 201 T3

<222> (99)..(111)

<220>

<221> región IgG4

5 <222> (123)..(448)

<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

ES 2 475 201 T3

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

ES 2 475 201 T3

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

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

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

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

- 5 <210> 2
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos (predicha) de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humano/de ratón

- <220>
- <221> CDR1
- <222> (24)..(34)

- 15 <220>
- <221> CDR2
- <222> (50)..(56)

- 20 <220>
- <221> CDR3
- <222> (89)..(97)

- 25 <220>
- <221> región IgG4
- <222> (108)..(214)

- <400> 2

ES 2 475 201 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 IgH MHV7

<400> 3
 atgggcatca agatggagtc acagaccag g 31

<210> 4

5

10

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

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

<400> 4
 cagtggatag acagatgggg g 21

10

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

15

<220>
 <223> Cebador kappa Ig MKV2

<400> 5
 atggagacag acacactcct gctatgggtg 30

20

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

25

<220>
 <223> Cebador kappa Ig MKV4
 <400> 6
 atgagggccc ctgctcagtt ttttgcttc ttg 33

30

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

35

<220>
 <223> Cebador kappa Ig MKV9

<400> 7
 atggtatcca cacctcagtt ccttg 25

40

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

45

<220>
 <223> cebador MKC

50

<400> 8
 actggatggt ggaagatgg 20

55

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

60

<220>
 <223> Cebador directo (For)

<400> 9
 agagaagctt gccgccacca tgattgctc tgctcagttc cttggctcc 50

65

<210> 10
 <211> 35

ES 2 475 201 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador de oligonucleótidos BT03

<400> 10
caacagtata gtaagctccc tcggacgttc ggtgg 35

10 <210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador de oligonucleótidos BT04

<400> 11
ccaccgaacg tccgagggag cttactatac tggttg 35

20 <210> 12
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador g2258

<400> 12
cgcgggatcc actcacgttt gattccagc ttggtgcctc c 41

30 <210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador g22949

40 <400> 13
cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gtcc 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido que reconoce CD138, y una molécula efectora para inducir la muerte celular, donde el anticuerpo dirigido modificado comprende una cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1 y una cadena ligera que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2, donde (a) la cadena pesada comprende los restos de aminoácidos 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) de la SEC ID N° 1, y (b) la cadena ligera comprende los restos de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) de la SEC ID N° 2, y donde el anticuerpo dirigido modificado es del isotipo IgG4.
- 10 2. El inmunoconjugado de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo dirigido modificado comprende los restos de aminoácido 123 a 448 de la SEC ID N° 1, y mutaciones de los mismos que
- 15 (i) mantienen o disminuyen la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o la citotoxicidad dependiente de complemento del anticuerpo dirigido modificado, y/o
- (ii) estabilizan el anticuerpo dirigido modificado.
- más preferentemente en donde: (a) dicha cadena pesada tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1; y (b) dicha cadena ligera tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2.
- 20 3. El inmunoconjugado de la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo dirigido modificado es un anticuerpo quimérico humano/de ratón.
- 25 4. El inmunoconjugado de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo dirigido modificado comprende una cadena pesada que tiene la SEC ID N° 1 y una cadena ligera que tiene la SEC ID N° 2.
5. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. Un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en medicina.
- 35 7. Un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un tratamiento dirigido a células tumorales, donde el anticuerpo dirigido modificado del inmunoconjugado se une al CD138 expresado en células que expresan CD138.

FIG. 1

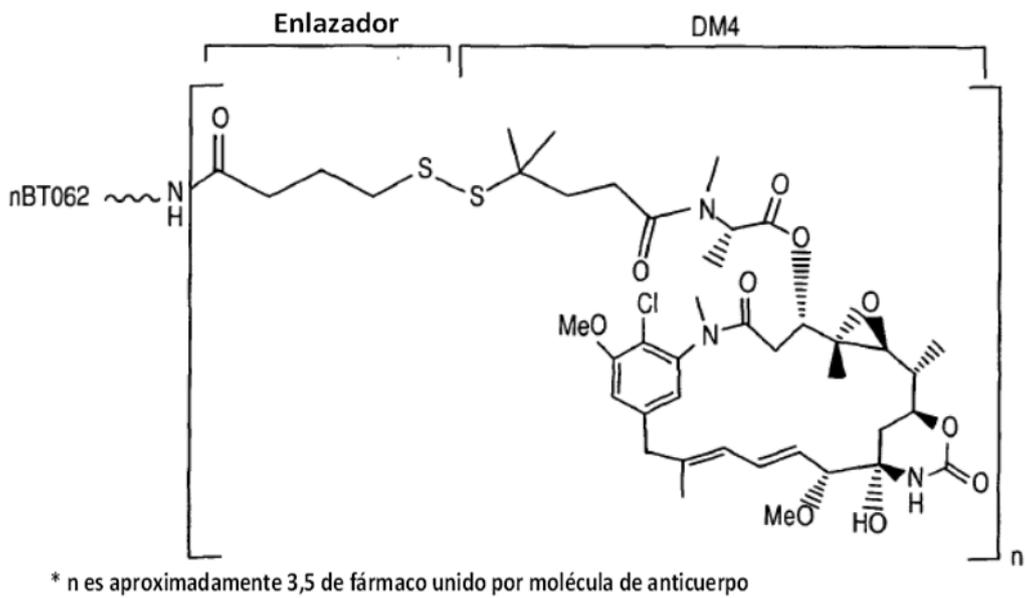
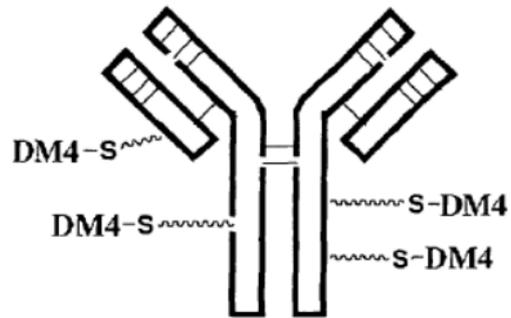


FIG. 2

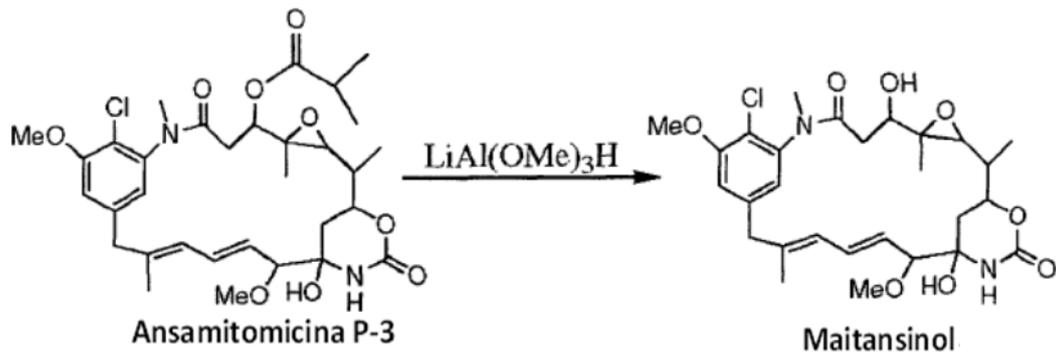


FIG. 3

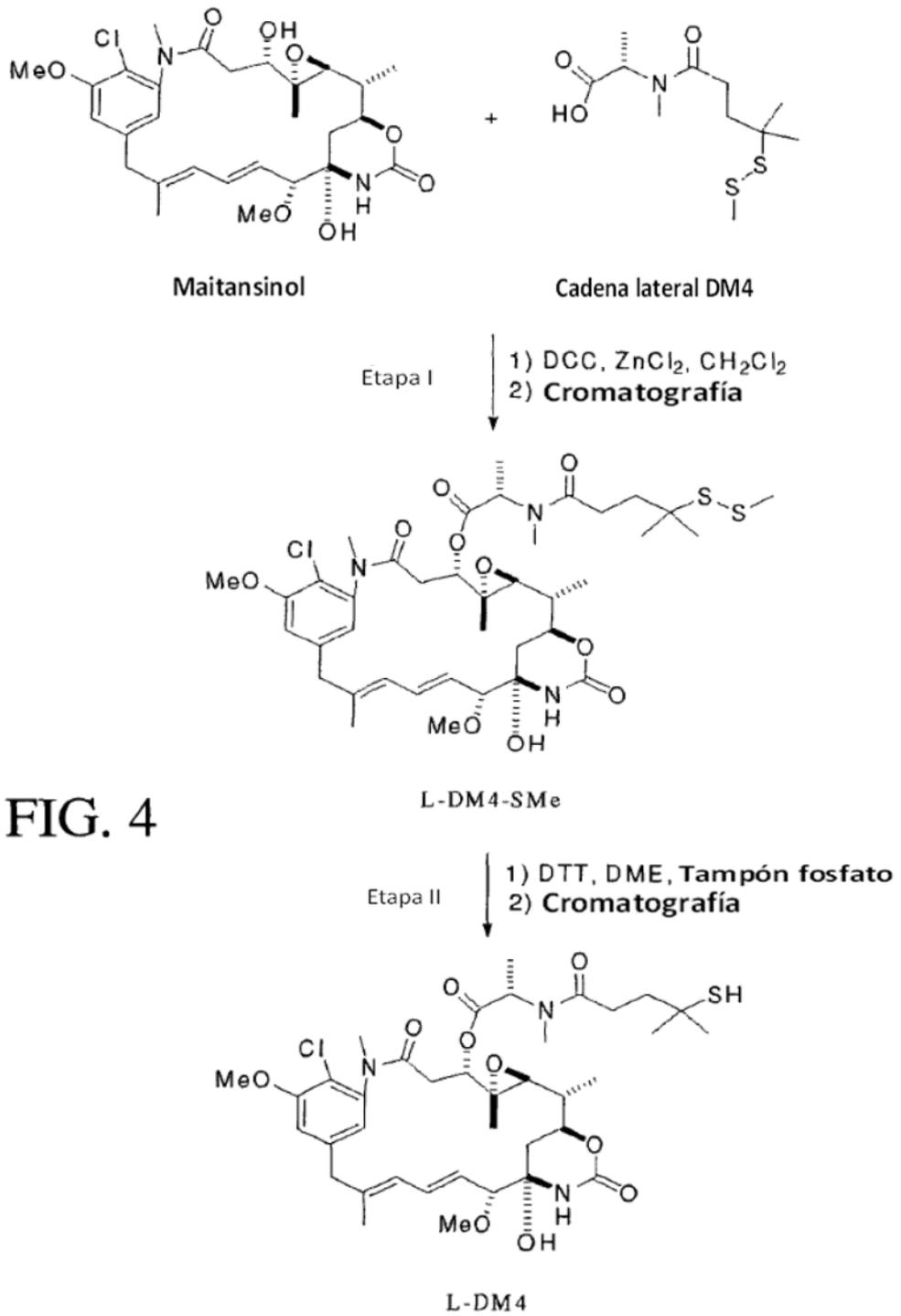


FIG. 4

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

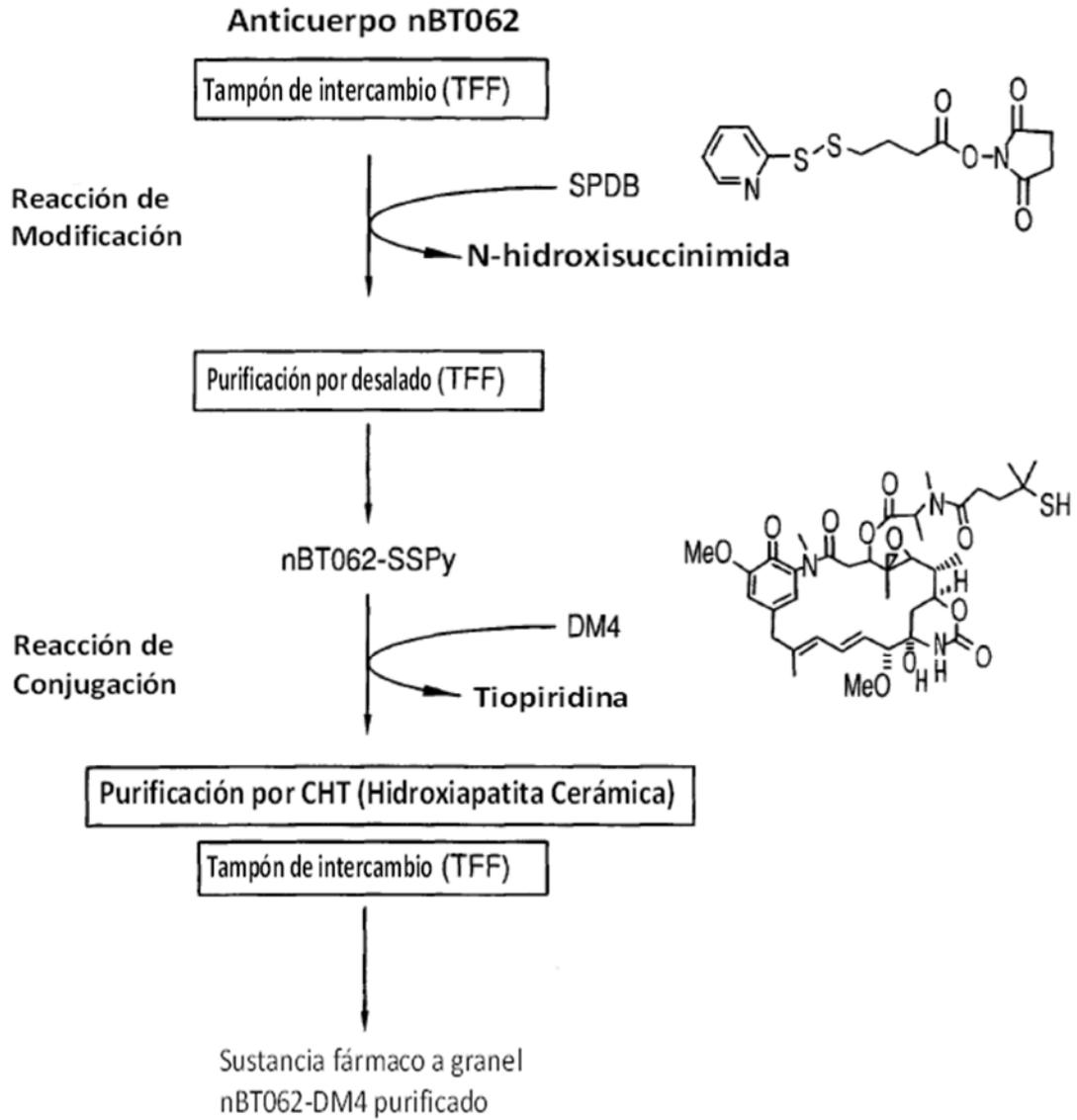


FIG. 5

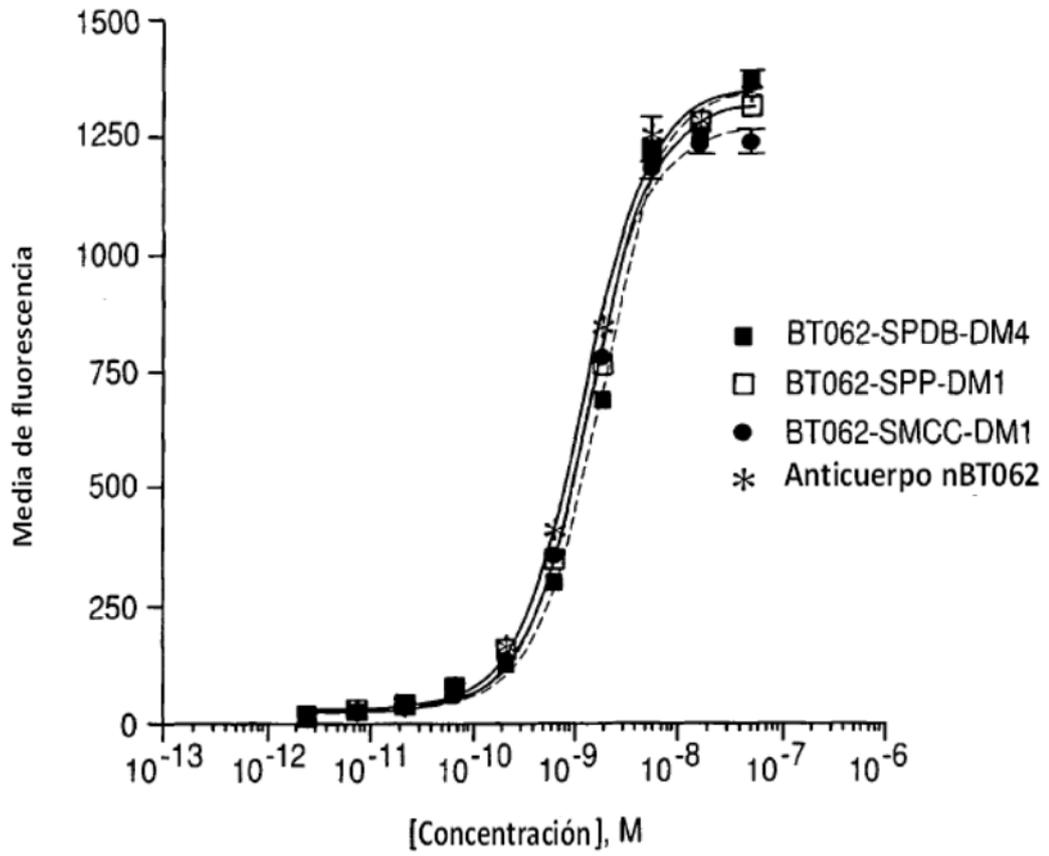


FIG. 6

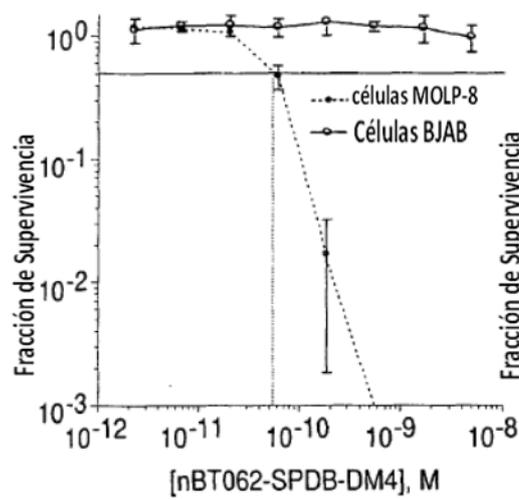


FIG. 7A

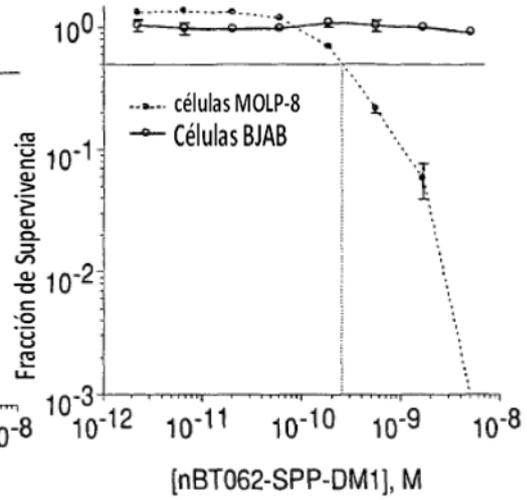


FIG. 7B

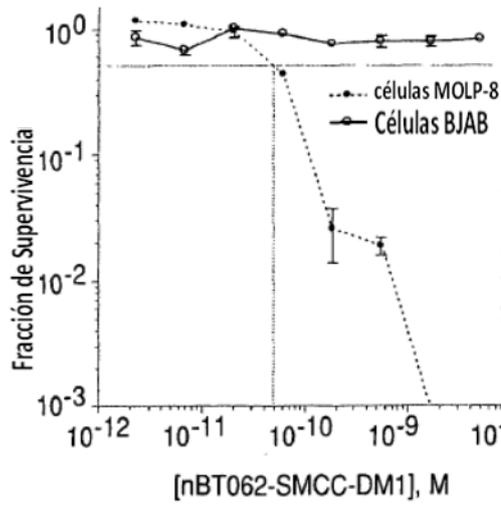


FIG. 7C

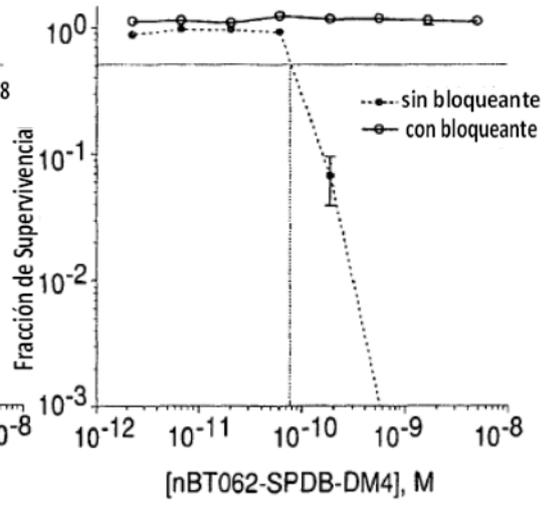


FIG. 7D

PBS, 200 μ L/ratón, embolada única iv

Anticuerpo nBT062, 13,8 mg/kg, embolada única iv

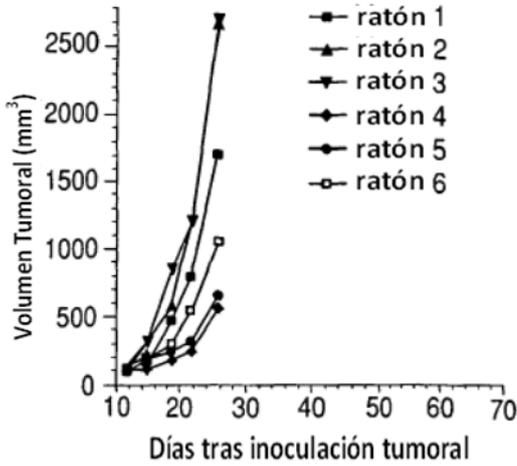


FIG. 8A

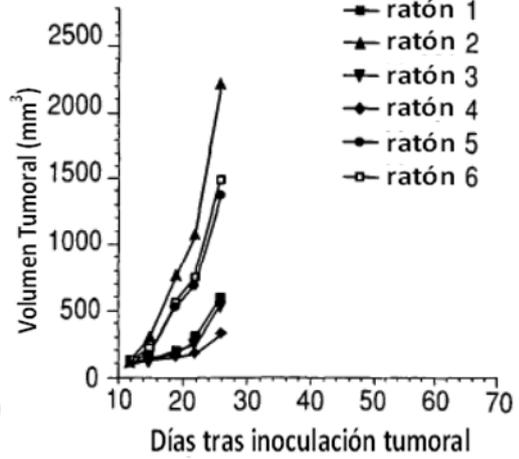


FIG. 8B

DM4, 250 μ g/kg, embolada única iv

huC242-DM4, 250 μ g/kg, embolada única iv

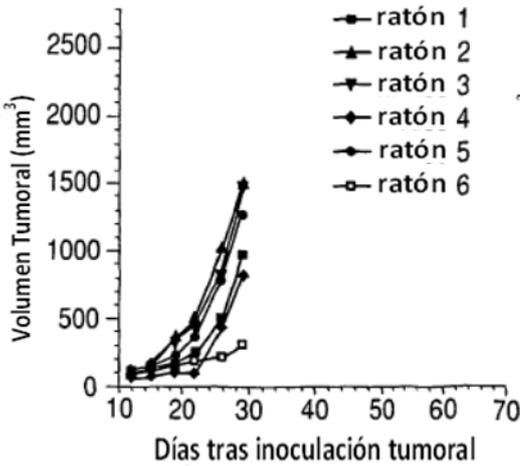


FIG. 8C

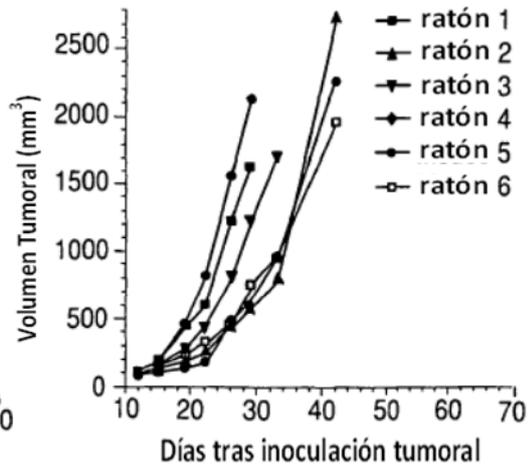


FIG. 8D

PBS, 200 $\mu\text{L}/\text{mouse}$, embolada única iv nBT062-SPDB-DM4, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, embolada única iv

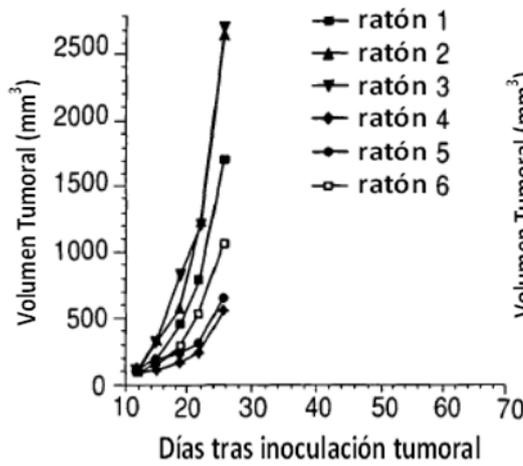


FIG. 9A

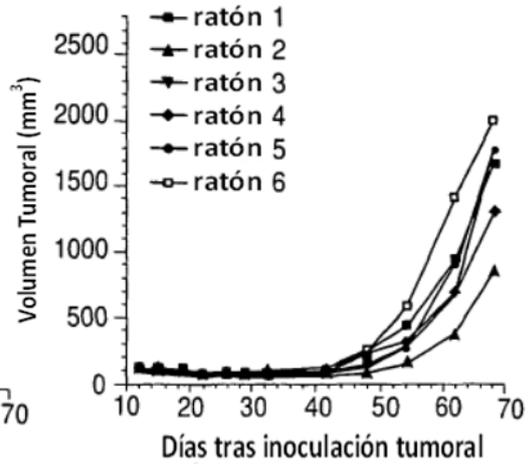


FIG. 9B

B-B4-SPP-DM1, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, embolada única iv nBT062-SPP-DM1, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, embolada única iv

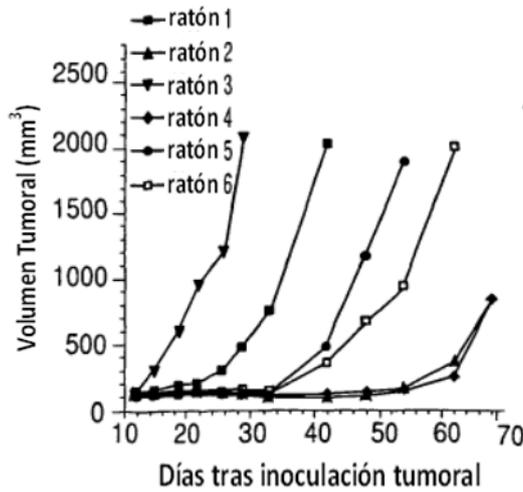


FIG. 9C

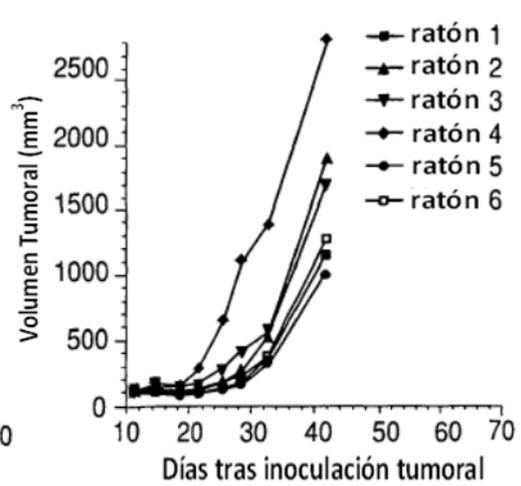


FIG. 9D

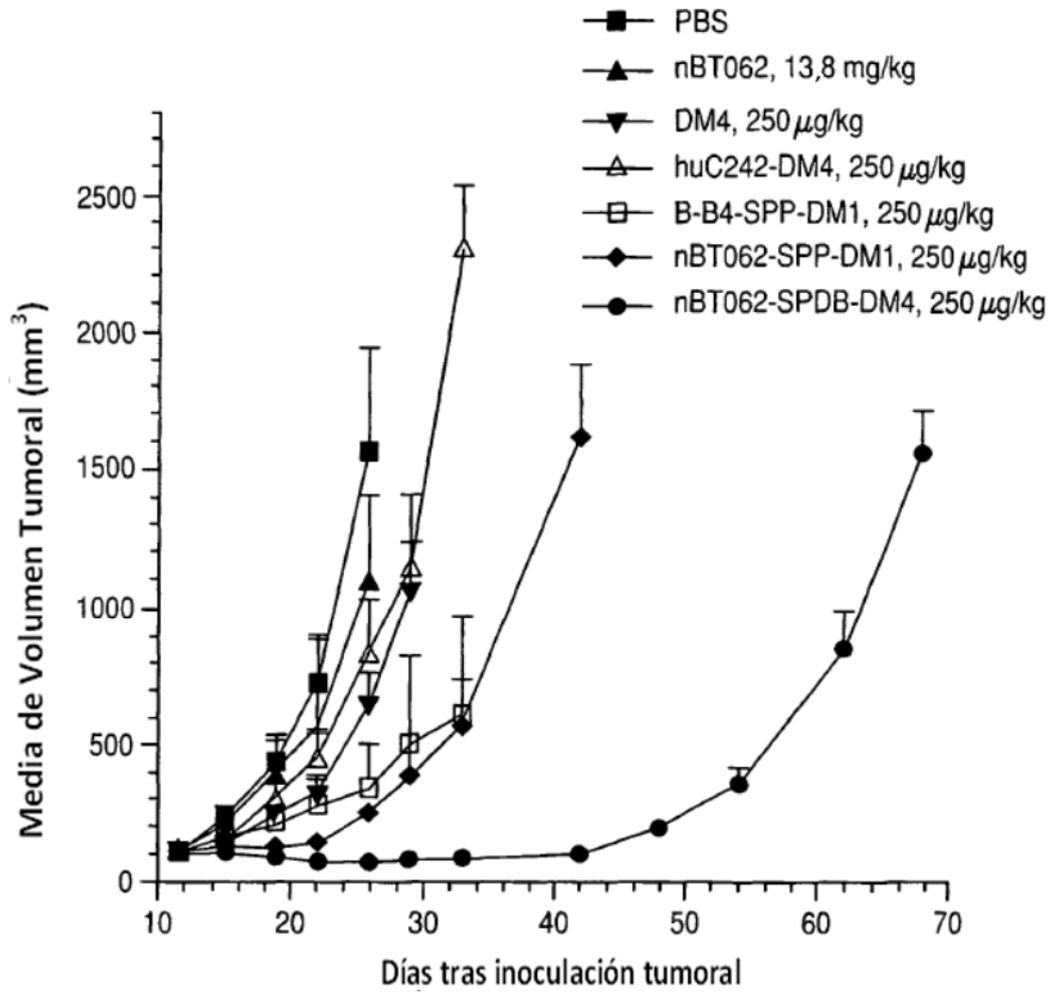


FIG. 10

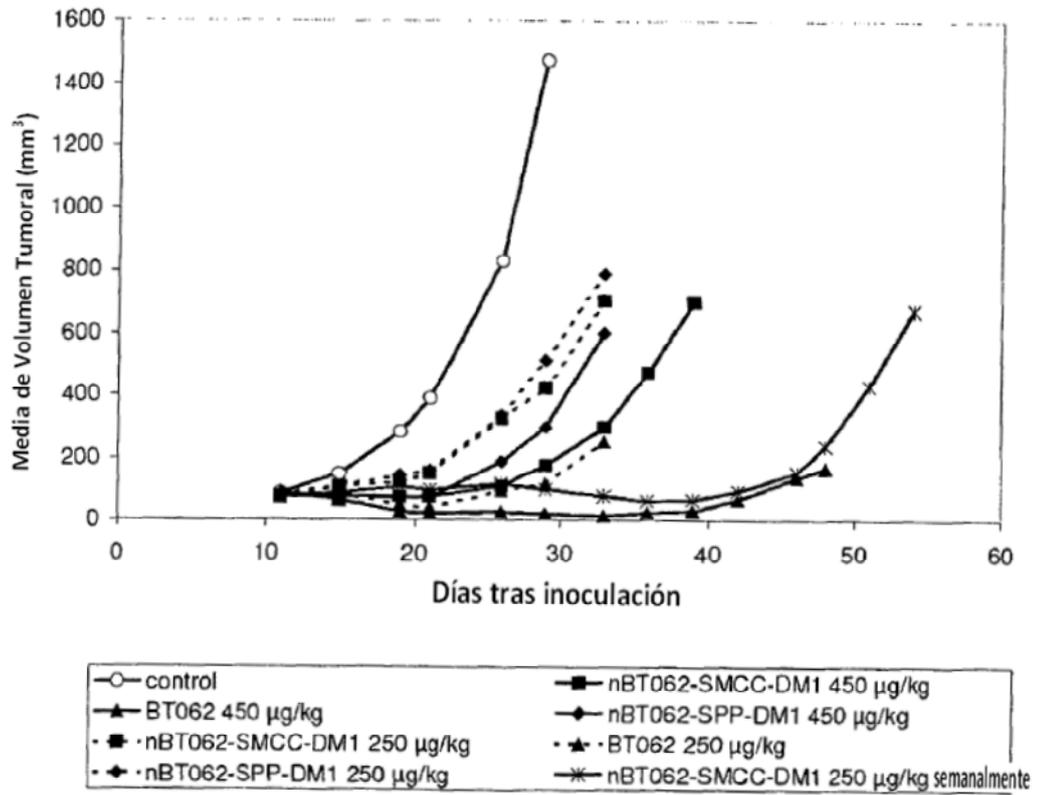


FIG. 11A

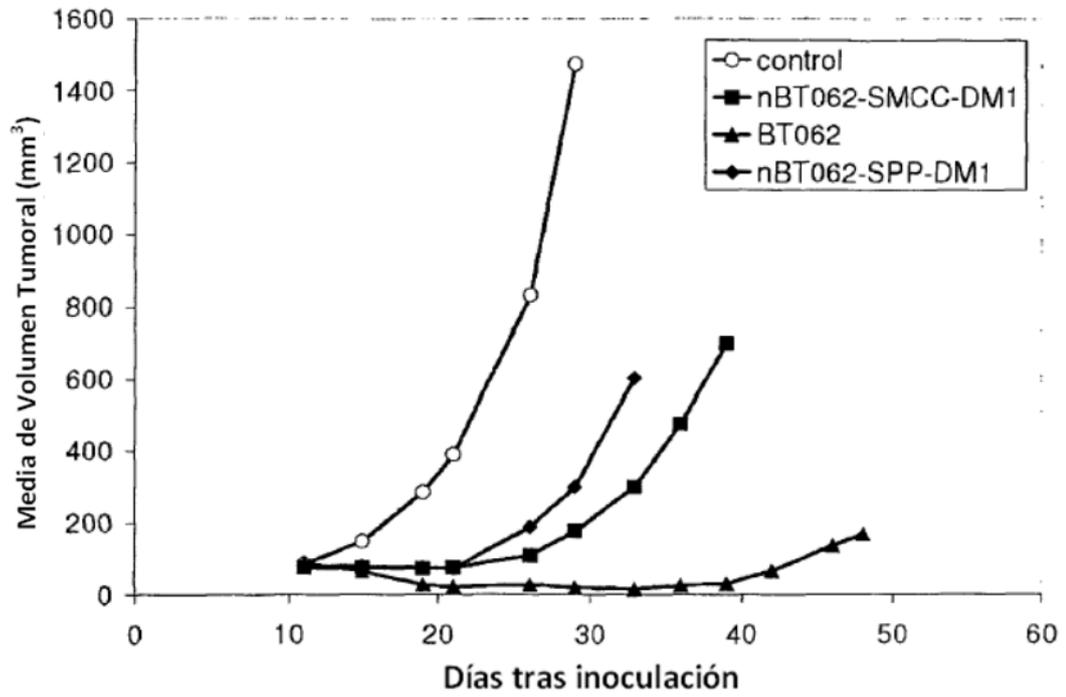


FIG. 11B