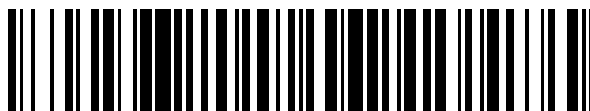


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 433**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08865838 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2242772**

54 Título: **Inmunoconjugados dirigidos a CD138 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**26.12.2007 US 16620 P**

**08.08.2008 US 87466 P**

**08.08.2008 US 87590 P**

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

**12.01.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 526 433 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****Inmunoconjugados dirigidos a CD138 y usos de los mismos****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a productos inmunoconjugados capaces de dirigirse a células que expresan CD138, composiciones que comprenden los productos inmunoconjugados y métodos que los emplean.

**10 Antecedentes**

CD138, que actúa como un receptor para la matriz extracelular, es expresado en exceso en células de mieloma múltiple (MM) y se ha demostrado que influyen en el desarrollo y/o la proliferación de células de MM. CD138 también se expresa en células de carcinoma de ovario, carcinoma de riñón, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, células de carcinoma de colon y células de linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL), por nombrar solo algunos.

Tassone et al. (2004) han informado de la excelente unión del anticuerpo IgG1 murino B-B4 al antígeno CD138 expresado sobre la superficie de las células de MM. Tassone también informó de una alta actividad citotóxica del producto inmunoconjugado B-B4-DM1, que comprende maitansinoide DM1 como molécula efectora, contra células de mieloma múltiple (véase también la Publ. de Patente de los Estados Unidos 20070183971).

Si bien Tassone et al. han contribuido a proporcionar un tratamiento eficaz del MM y una composición de materia que se puede emplear en tal tratamiento, sigue habiendo una serie de necesidades en la técnica.

Sigue habiendo una necesidad de productos inmunoconjugados basados en B-B4 que carezcan de ciertas propiedades y/o funciones asociadas con B-B4. Existe, en particular, una necesidad de un anticuerpo quimerizados basados en B-B4 que se unan a CD138 tan eficazmente como B-B4 pero se puedan administrar a los seres humanos sin efectos secundarios significativos. También existe una necesidad de tal producto inmunoconjugado basado en B-B4 que muestre una o más propiedades ventajosas con respecto a su contraparte murina. Estas propiedades incluyen la mejora de la unión al antígeno, la mejora de la muerte de las células tumorales que comprenden, en particular, células tumorales que expresan CD138 y células accesorias a estas o unión más homogénea a la diana.

**35 Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un producto inmunoconjugado capaz de dirigirse a células que expresan CD138 que comprende:

- 40 1. (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 que comprende:
  - 40 1. (i) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende los residuos de aminoácido 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) del SEQ ID NO: 1, y
  - 40 2. (ii) una cadena ligera que comprende una región variable que comprende los residuos de aminoácido 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) del SEQ ID NO: 2, y
- 45 2. (b) una molécula efectora para inducir muerte celular,

en donde una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de isotipo IgG4.

50 La presente invención también proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un sujeto.

Además, la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del carcinoma de vejiga de células transicionales en un sujeto.

55 La presente invención proporciona adicionalmente un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.

60 También adicionalmente la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células tumorales en tal tumor en un paciente.

Por otra parte, la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de

las reivindicaciones 1 a 7, para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor y/o la propagación de las células tumorales malignas que comprenden células que expresan CD138 en un paciente, en donde el paciente ha sido tratado con uno o más agentes citotóxicos y/o radiación en una cantidad para reducir la carga tumoral.

5 La presente invención también proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una afección que se podría beneficiar de la supresión de la supervivencia de las células de mieloma, en donde el producto inmunoconjugado es capaz de disminuir selectivamente la supervivencia o el crecimiento de dichas células de mieloma de dicho sujeto.

10 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el producto inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición es adecuada para la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales.

15 Adicionalmente la presente invención proporciona un kit que comprende, en recipientes separados, composiciones farmacéuticas para su uso combinado para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, en donde un recipiente comprende una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 16, y en donde, un recipiente separado comprende una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente adicional, preferiblemente un agente citotóxico, para la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables,  
 20 preferiblemente en donde dicho agente en dicha segunda composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en melfalán, vincristina, doxorubicina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, talidomida, prednisona, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina y combinaciones de los mismos o está basado en anticuerpos.  
 25

También adicionalmente, la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de células tumorales de tal tumor en un paciente.  
 30

El anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente de la presente invención puede

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

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

La ABR de la descripción puede comprender:

45 (a) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos 99-111 del SEQ ID NO: 1, y  
 (b) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende los residuos de aminoácidos 89 a 97 del SEQ ID NO: 2, respectivamente.

La ABR puede comprender adicionalmente:

50 (a) las CDR1 y CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprenden los residuos de aminoácidos 31 a 35 y el 51 a 68 del SEQ ID NO: 1, y/o  
 (b) las CDR1 y CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprenden los residuos de aminoácidos 24 a 34 y 50 a 56 del SEQ ID NO: 2, respectivamente.  
 55

La región de anticuerpo adicional puede comprender:

60 (a) los residuos de aminoácidos 123 a 448 del SEQ ID NO: 1, y/o  
 (b) los residuos de aminoácidos 108 a 214 del SEQ ID NO: 2, respectivamente y las mutaciones de los mismos que  
 (i) mantienen o reducen la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento del anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente y/o  
 (ii) estabilizan el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente.

- 5 La molécula efectora puede estar anclada a dicho anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente a través de un conector. El conector puede comprender un enlace disulfuro. La molécula efectora (p. ej., DM4) puede proporcionar impedimento estérico entre el anticuerpo de direccionamiento y la molécula efectora. La molécula efectora puede ser al menos un maitansinoide (p. ej., DM1, DM3, o DM4) taxano o un CC1065, o un análogo del mismo.
- El producto inmunoconjugado puede unirse a CD138 con una variación de la orientación de menos de 150%, 140%, 130%, 120%, 110%, 100%, 90%, 80%, 70%, 60% o 50%.
- 10 La presente invención también está dirigida a un producto inmunoconjugado que comprende:  
un agente de dirección de direccionamiento CD138 que comprende  
un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una  
15 porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1. Una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o dicha porción de la misma puede ser una región constante de isotipo IgG4.
- La presente descripción invención también se dirige a un método de tratamiento de MM en un sujeto, que comprende:  
20 proporcionar uno o más de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria, y administrar a dicho sujeto dicho producto inmunoconjugado en una cantidad eficaz para tratar el mieloma múltiple.
- El agente de direccionamiento del producto inmunoconjugado de la descripción puede comprender una secuencia de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 2. El agente de direccionamiento del producto inmunoconjugado de la descripción puede comprender también una secuencia de la cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1.
- 30 La presente invención también está dirigida a un método para la administración de fármacos mediada por productos inmunoconjugados que comprende:  
proporcionar uno o más de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria, y  
administrar dicho producto inmunoconjugado en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde dicho  
35 isotipo IgG4 alivia la ADCC, la citotoxicidad dependiente del complemento y/o el direccionamiento mediado por Fc del FcR hepático.
- La presente invención también está dirigida a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de células tumorales en un cultivo celular que comprende  
40 administrar a dicho cultivo celular una cantidad eficaz para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de células tumorales de uno o más de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria. La cantidad eficaz puede inducir la muerte celular o detención del ciclo celular continuo en células tumorales que expresan CD138 y, opcionalmente, células auxiliares que no expresan CD138, en particular, las células del estroma del tumor. Las células en dicho cultivo celular se pueden obtener de un paciente de cáncer y, después de la administración de dicha cantidad eficaz de dicho producto inmunoconjugado, las células de dicho cultivo celular pueden ser  
45 reimplantadas en dicho paciente de cáncer.
- La presente descripción también está dirigida a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células tumorales de tal tumor en un paciente que lo necesite, que comprende  
50 administrar a dicho paciente al menos uno o más de los productos inmunoconjugados especificados anteriormente en una cantidad para inhibir o reducir el crecimiento de dicho tumor y/o la propagación de dichas células tumorales, en donde dicho producto inmunoconjugado inhibe, retrasa o previene el crecimiento y/o la propagación de dichas células tumorales.
- 55 La molécula efectora de dicho producto o dichos productos inmunoconjugados puede ser una toxina, una enzima citotóxica, un fármaco citotóxico bajo peso molecular, un agente formador de poros, un modificador de la respuesta biológica, enzima activadora de profármacos, un anticuerpo, una citoquina o un radionúclido.
- 60 Los productos inmunoconjugados de la presente invención pueden administrarse en una dosis única de 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, opcionalmente intervalos horarios, diarios, semanales o combinaciones de los mismos.
- Los regímenes de dosis múltiples que incluyen, regímenes horarios, diarios y semanales son parte de la presente invención e incluyen, en particular, la administración a intervalos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas.

La presente invención también está dirigida a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor y/o la propagación de células tumorales malignas en un paciente que lo necesite, que comprende

(a) administrar a dicho paciente una o más agentes y/o la radiación citotóxicos en una cantidad eficaz para reducir la carga tumoral; y

(b) administrar a dicho paciente al menos uno de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria en una cantidad para inhibir, retrasar o reducir el crecimiento de un tumor y/o la propagación de células tumorales,

en donde dicho producto inmunoconjugado inhibe, retrasa o previene el crecimiento y/o la propagación de las células tumorales que comprenden células que expresan CD138.

El agente citotóxico puede, en particular, ser mefalán, doxorubicina, vincristina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, la talidomida, prednisona, talidomida, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina o combinaciones de los mismos, o puede estar basado en anticuerpos.

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

(a) proporcionar al menos uno de cualquiera de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria, y

(b) administrar el producto inmunoconjugado al sujeto para disminuir selectivamente la supervivencia o el crecimiento de dichas células de mieloma de dicho sujeto.

La presente invención también está dirigida a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los productos inmunoconjugados especificados en la presente memoria para la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o propagación de células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica puede incluir agentes citotóxicos como los especificados en la presente memoria.

La presente invención también está dirigida a un kit que comprende, en recipientes separados, composiciones farmacéuticas para su uso combinado para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, en donde un recipiente comprende una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior, y en donde un recipiente separado comprende una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente, preferiblemente un agente citotóxico, para la inhibición, retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también está dirigida a un método para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células tumorales de tal tumor en un sujeto que lo necesite, que comprende

(a) proporcionar un producto inmunoconjugado que comprende:

un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 anclado a una molécula efectora a través de un conector escindible, en donde dicha molécula efectora experimenta impedimento estérico, y

(b) administrar a dicho sujeto el producto inmunoconjugado de (a) en una cantidad para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de dicho tumor y/o la propagación de dichas células tumorales, en donde dicho producto inmunoconjugado de (a) proporciona una actividad inhibidora del crecimiento tumoral que excede a la de su contraparte sin impedimento en aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40% o más.

La actividad inhibidora del crecimiento tumoral de una contraparte sin impedimento que comprende un conector no escindible puede exceder la actividad inhibidora del crecimiento tumoral de su contraparte sin impedimento que comprende un conector escindible, tal como en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, hasta aproximadamente 15%.

Dicho anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 puede consistir esencialmente en la región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano o puede comprender una región de unión a

antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano y una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de dicha región adicional de anticuerpo es de un anticuerpo humano.

5 Dicho conector escindible puede comprender un enlace disulfuro. La molécula efectora puede ser DM4. El producto inmunoconjugado puede ser parte de una composición farmacéutica y se puede administrar al sujeto en al menos una dosis en una cantidad de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>.

10 La presente invención proporciona un producto inmunoconjugado para su uso como medicamento en donde el producto inmunoconjugado comprende:

- 10 (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente
  - (i) que consiste esencialmente en la región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
  - 15 (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano, una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano, y
- (b) una molécula efectora,

20 en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

La presente invención proporciona un producto inmunoconjugado adicional para su uso como medicamento que comprende:

- 25 un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1.

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

35 La presente invención proporciona adicionalmente un producto inmunoconjugado para su uso en la liberación de fármacos mediada por productos inmunoconjugados a un paciente, en particular para el alivio de la ADCC, la citotoxicidad dependiente del complemento y/o el direccionamiento mediado por Fc de FcR hepático, en donde el producto inmunoconjugado comprende un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1, y en donde una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma es una región constante de isotipo IgG4.

40 La presente descripción también proporciona células tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente en donde las células tumorales han sido tratadas en cultivo celular con un producto inmunoconjugado que comprende:

- 45 (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente
  - (i) que consiste esencialmente de una región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
  - 50 (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano, una región de anticuerpo adicional, en donde al menos parte de dicha región de anticuerpo adicional es de un anticuerpo humano, y
- (b) una molécula efectora,

en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

55 La presente invención también proporciona células tumorales para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente en donde las células tumorales han sido tratadas en cultivo celular con un producto inmunoconjugado que comprende:

- 60 un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1.

La presente descripción proporciona un producto inmunoconjugado para su uso en la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células

tumorales de tal tumor en un paciente, en donde el producto inmunoconjugado comprende:

- (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente
  - (i) que consiste esencialmente en la región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
  - (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano,

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

- (b) una molécula efectora,

en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

Alternativamente, la presente descripción proporciona un producto inmunoconjugado para su uso en la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células tumorales de tal tumor en un paciente, en donde el producto inmunoconjugado comprende:

un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1.

También adicionalmente, la presente invención proporciona un medicamento que comprende un producto inmunoconjugado y uno o más medicamentos contra el cáncer en forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de células tumorales que comprende células que expresan CD138, en donde el producto inmunoconjugado comprende:

- (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente
  - (i) que consiste esencialmente de una región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
  - (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano,

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

- (b) una molécula efectora,

en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138, y en donde el uno o más medicamentos contra el cáncer son capaces de reducir la carga tumoral.

Alternativamente, la presente descripción proporciona un medicamento que comprende un producto inmunoconjugado y uno o más medicamentos contra el cáncer en forma de una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de células tumorales que comprende células que expresan CD138, en donde el producto inmunoconjugado comprende:

un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1,

y en donde uno o más medicamentos para el cáncer son capaces de la reducción de la carga tumoral.

En un aspecto adicional del uso de los dos párrafos anteriores la preparación combinada es para ser administrada a un paciente que ha sido tratado con radiación.

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

- (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente
  - (i) que consiste esencialmente de una región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o
  - (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano,

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

5 (b) una molécula efectora,  
 en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138,  
 y en donde el medicamento es para ser administrada a un paciente tratado con radiación para reducir la carga tumoral.

10 También adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un producto inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para tratar células tumorales en un paciente que comprende células que expresan CD 138, en donde el producto inmunoconjugado comprende:

15 un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1,  
 y en donde el medicamento se va a administrar a un paciente tratado con radiación para reducir la carga tumoral.

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

Adicionalmente la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado para la supresión de la supervivencia de células de mieloma en un individuo en el que el producto inmunoconjugado comprende:

25 (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente  
 (i) que consiste esencialmente de una región de unión a antígeno contra CD138 de un anticuerpo no humano, o  
 (ii) que comprende una región de unión a antígeno contra CD138, en donde dicha región de unión a antígeno es de un anticuerpo no humano,

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

(b) una molécula efectora, en donde dicho producto inmunoconjugado se une homogéneamente a CD138.

35 También adicionalmente, la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado para la supresión de la supervivencia de células de mieloma en un individuo en donde el producto inmunoconjugado comprende:

40 un agente de direccionamiento que se dirige a CD138 que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1.

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

45 Adicionalmente, la presente invención proporciona un producto inmunoconjugado para su uso en la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de las células tumorales de tal tumor en un sujeto en donde el producto inmunoconjugado comprende un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 anclado a una molécula efectora a través de un conector escindible, en donde dicha molécula efectora experimenta impedimento estérico.

50 En el párrafo anterior, el producto inmunoconjugado es, en particular, capaz de proporcionar una actividad inhibidora del crecimiento tumoral que supera a la de su contraparte sin impedimento en aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40% o más.

55 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 proporciona una representación esquemática de nBT062 que tiene ancladas moléculas efectoras.

La FIG. 2 es una representación química de BT062.

60 La FIG. 3 muestra la conversión de ansamitocina P-3 en maitansinol (la estereoquímica se omite por razones de simplicidad).

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

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

La FIG. 6 muestra un análisis de la unión de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 y anticuerpo nBT062 a células OPM-2. Se proporcionaron a las células diferentes concentraciones de nBT062 y



conjugados y la fluorescencia media se midió mediante análisis FACS.

Las FIG. 7 (A) - (D) representan la citotoxicidad *in vitro* de productos conjugados de nBT062-DMX hacia células MOLP-8 (CD138<sup>+</sup>) y BJAB (CD 138<sup>+</sup>). Las células se cultivaron en placas de fondo plano y se incubaron con las concentraciones indicadas de productos inmunoconjugados durante 5 días. Se añadió reactivo WST durante 3 horas adicionales para evaluar la viabilidad celular. En (D) la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 se analizó en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo (nBT062 1  $\mu$ M).

La FIG. 8 muestra los volúmenes tumorales de los ratones individuales tratados con (A) PBS, (B) anticuerpo nBT062, (C) DM4 libre o (D) sin producto conjugado de direccionamiento huC242-DM4 a lo largo del tiempo (días) después de la inoculación con células tumorales MOLP-8.

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

La FIG. 10 representa el volumen medio tumoral (+/- SD) de xenoinjertos de mieloma múltiples humano MOLP-8 en ratones CB.17 SCID a largo del tiempo (días) después de la inoculación.

Las FIGS. 11A y B muestran la actividad anti-tumoral de nBT062-DMX contra células tumorales MOLP-8 CD138<sup>+</sup> en un modelo de tumor MOLP-8 voluminoso en ratones SCID. El volumen del tumor se expresa como media (+/- DT) para cada grupo.

La FIG. 12 es un gráfico que refleja la eficacia anti-tumoral de productos conjugados de nBT062 que contienen DMx en el modelo SCIDhu/INA-6 hacia células de mieloma múltiple en el entorno de la médula ósea humana. El receptor de IL-6 soluble humana producido por células de mieloma múltiple (shuIL-6R) se utilizó como un indicador de la carga tumoral. Triángulo: nBT062- SPP-DM1, Cuadrado: nBT062-SPDB-DM4; Diamante: control de vehículo.

La FIG. 13 muestra la destrucción por vecindad mediada por nBT062-SPDB-DM4 *in vitro*. Se cultivaron células OPM2 positivas para CD138 y células Namawla negativas para CD138 con nBT062-SPDB-DM4 a diferentes concentraciones y se midió la viabilidad celular. Los valores de DO<sub>450</sub> representan una medida para la viabilidad celular.

#### Descripción detallada de realizaciones diversas y preferidas de la invención

La presente invención se refiere a productos inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos a CD138 y la liberación de la molécula o las moléculas efectoras de los productos inmunoconjugados en los sitios diana y la liberación específica del sitio de la molécula o las moléculas efectoras en, en o cerca de las células, los tejidos y los órganos diana. Más concretamente, la presente invención se refiere a productos inmunoconjugados que comprenden agentes dirigidos a CD138 y moléculas efectoras potentes que se unen al agente de direccionamiento. Las moléculas efectoras pueden activarse por escisión/disociación de la porción de agente de direccionamiento del producto inmunoconjugado en el sitio diana.

Los productos inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un sujeto que necesite tratamiento terapéutico. La molécula o moléculas efectoras pueden ser liberadas desde el producto inmunoconjugado por escisión/disociación dentro, en o cerca de la célula diana, tejido u órgano.

En un ejemplo, el producto inmunoconjugado comprende el anticuerpo nBT062, que se dirige a células que expresan CD138, y se administra al menos un fármaco o una toxina altamente citotóxicos como molécula efectora a un paciente con cáncer. En este ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del producto inmunoconjugado vía intravenosa a un paciente de modo que se concentra en las células cancerosas. La molécula o moléculas efectoras se liberan a continuación a partir del anticuerpo por medios naturales. Después o durante la escisión la molécula efectora se puede estabilizar mediante alquilación y puede difundirse a las células auxiliares circundantes tales como las células del estroma que no expresan CD138.

En un segundo ejemplo, el producto inmunoconjugado comprende el anticuerpo nBT062, que se dirige a las células que expresan CD138, y se administran al menos un fármaco o una toxina altamente citotóxicos como molécula efectora, y un agente citotóxico adicional a un paciente con cáncer. En este ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz del producto inmunoconjugado y el agente citotóxico son co-administrados por vía intravenosa a un paciente de manera que se concentra en las células cancerosas. El agente citotóxico destruye más de 50% de las células cancerosas que expresan CD138, pero el producto inmunoconjugado se ancla de manera eficaz a células cancerosas que expresan CD138 adicionales. La molécula o moléculas efectoras se liberan a partir del anticuerpo por medios naturales. Después o durante la escisión, la molécula efectora se puede estabilizar mediante alquilación y puede difundirse a las células auxiliares circundantes, tales como las células del estroma que no expresan CD138.

En un tercer ejemplo, el producto inmunoconjugado comprende el anticuerpo nBT062 y al menos un fármaco o una toxina altamente citotóxicos y se administra a una población celular aislada de un paciente con cáncer. En este ejemplo, se administra una cantidad inductora de muerte celular o de detención del ciclo celular continua del producto inmunoconjugado a la población de células de forma que se concentra en las células cancerosas. La molécula o moléculas efectoras se liberan del anticuerpo dirigido por medios naturales o medios externos para inducir la muerte celular o la detención del ciclo celular continua en las células cancerosas.

En un cuarto ejemplo, el producto inmunoconjugado comprende el anticuerpo nBT062 y al menos un fármaco o una toxina altamente citotóxicos como molécula efectora y se administra a un paciente con cáncer. En este ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del producto inmunoconjugado vía intravenosa a un paciente de modo que se concentra en las células cancerosas. La molécula o moléculas efectoras se liberan de la diana de anticuerpo por medios externos para inducir la muerte celular o la detención del ciclo celular continua en las células cancerosas.

CD138 o sindecano 1 (también descrito como SYND1; SINDECANO; SDC; SCD1; ANTÍGENO CD138, número de acceso SwissProt: P18827 humano) es una glicoproteína de membrana que originalmente se describió que estaba presente en células de origen epitelial, y posteriormente se encontró en células hematopoyéticas (Sanderson, 1989). CD138 tiene un dominio extracelular largo que se une a moléculas solubles (p. ej., los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF) y a moléculas insolubles (p. ej., a los componentes de la matriz extracelular colágeno y fibronectina) a través de cadenas de heparán sulfato (Langford, 1998; Yang, 2007) y actúa como un receptor para la matriz extracelular. CD138 también media la adherencia célula a célula a través de moléculas de unión a heparina expresadas por células adherentes. Se ha demostrado que CD138 tiene un papel como co-receptor para factores de crecimiento de células de mieloma (Bisping, 2006). Estudios de diferenciación de células plasmáticas mostraron que CD138 también debe ser considerado como un antígeno de diferenciación (Bataille, 2006).

En la hematopoyesis maligna, CD138 es altamente expresado en la mayoría de las células de MM, carcinoma de ovario, carcinoma de riñón, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, células de carcinoma de colon y células de linfomas Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (LLC) (Horvathova, 1995), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA) (Seftalioglu, 2003 (a); Seftalioglu, 2003 (b)), sarcomas de tejidos sólidos, carcinomas de colon, así como otros cánceres hematológicos y tumores sólidos que expresan CD138 (Carbone et al., 1999; Sebestyen et al., 1999; Han et al., 2004; Charnaux et al., 2004; O'Connell et al., 2004; Orosz y Kopper, 2001).

Otros cánceres que se han demostrado que son positivos para la expresión de CD138 son muchos adenocarcinomas de ovario, carcinomas de vejiga de células transicionales, carcinomas de células claras renales, carcinomas de pulmón de células escamosas; carcinomas de mama y cánceres uterinos (véanse, por ejemplo, Davies et al., 2004; Barbareschi et al., 2003; Mennerich et al., 2004; Anttonen et al., 2001; Wijdenes, 2002).

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

Se ha informado de 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, B-B4 son específicos de CD138. De estos B-B4, 1 D4 y MI15 reconocían la molécula intacta y la proteína núcleo de CD138 y se demostró que reconocían los mismos epítomos o epítomos estrechamente relacionados (Gattei, 1999). Estudios anteriores indicaron que B-B4 no reconocía CD138 soluble, sino solo CD138 en la forma unida a membrana (Wijdenes, 2002).

B-B4, un mAb IgG1 murino, se une a un epítipo lineal entre los residuos 90-95 de la proteína núcleo en sindecano 1 humano (CD138) (Wijdenes, 1996; Dore, 1998). En consonancia con el patrón de expresión de CD138, se demostró que B-B4 reaccionaba fuertemente con línea celular de plasma RPMI8226, pero no reaccionaba con las células endoteliales. También en consonancia con el patrón de expresión de CD138, B-B4 también reaccionó con las líneas de células epiteliales A431 (derivada de queratinocitos) y HepG2 (derivada de hepatocitos). Una inmunotoxina B-B4-saporina también era altamente tóxica para la línea de célula de plasma RPMI8226, de hecho considerablemente más tóxica que la saporina libre. Sin embargo, a partir de las dos líneas de células epiteliales sometidas a ensayo, B-B4-saporina solo mostró toxicidad para la línea celular A431, aunque en un análisis clonogénico B-B4 saporina no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el desarrollo de células A431 (Vooijs, 1996). Otros investigadores informaron de la falta de especificidad de los antígenos asociados a MM contra tumores (Couturier, 1999).

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

La presente invención utiliza el término "célula tumoral" para incluir las células cancerosas, así como células pre-cancerosas que pueden formar o no de un tumor sólido.

- Un "agente de direccionamiento" de acuerdo con la presente invención es capaz de asociarse a una molécula expresada por una célula diana e incluye péptidos y no péptidos. En particular, los agentes de direccionamiento de acuerdo con la presente invención incluyen anticuerpos de direccionamiento y moléculas de direccionamiento no inmunoglobulinas, que pueden estar basadas en proteínas que no son inmunoglobulinas, incluyendo, pero no limitado a, moléculas AFFILIN®, ANTICALINS® y AFFIBODIES®. Las moléculas de direccionamiento que no son inmunoglobulinas también incluyen moléculas de direccionamiento no peptídicas, tales como oligonucleótidos de direccionamiento de ADN y ARN (aptámeros), pero también ligandos fisiológicos, en particular ligandos del antígeno en cuestión, tales como CD138.
- Un "anticuerpo de direccionamiento", de acuerdo con la presente invención es o se basa en un anticuerpo natural o se produce sintéticamente o por ingeniería genética y se une a un antígeno en una o varias células (célula o células diana) de interés. Un anticuerpo de direccionamiento de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multiespecífico (p. ej., un anticuerpo biespecífico), o un fragmento de anticuerpo. El anticuerpo de direccionamiento puede ser modificado genéticamente para, por ejemplo, mejorar su afinidad por las células diana (Ross, 2003) o disminuir su inmunogenicidad. El anticuerpo de direccionamiento puede estar anclado a una formulación liposomal que incluya moléculas efectoras (Carter, 2003). Un fragmento de anticuerpo comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, pero también anticuerpos bivalentes; anticuerpos de dominio (dAb) (Ward, 1989; Patente de Estados Unidos Núm. 6.005.079); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento variable de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) las cadenas pesadas y ligeras (VH y VL) pueden estar unidos por un conector corto de aminoácidos que tiene, por ejemplo, la secuencia (glicina<sub>4</sub>serina)<sub>n</sub>, que tiene suficiente flexibilidad para permitir que dos dominios ensamblen un bolsillo de unión a antígeno funcional. La adición de diversas secuencias señal puede permitir un direccionamiento más preciso del anticuerpo de direccionamiento. La adición de la región constante de cadena ligera (CL) puede permitir la dimerización a través de enlaces disulfuro, proporcionando mayor estabilidad y avidez. Las regiones variables para la construcción del scFv pueden, si está disponible un mA b contra una diana de interés, ser obtenidas mediante RT-PCR que clona las regiones variables partir de ARNm extraído del hibridoma parental. Alternativamente, el scFv puede ser generado de novo mediante tecnología de presentación en fagos (Smith, 2001). Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "fragmento funcional", cuando se utiliza en referencia a un anticuerpo de direccionamiento, se refiera a una porción del anticuerpo de direccionamiento que es capaz de unir específicamente un antígeno que está unido específicamente mediante el anticuerpo de referencia para el que está elaborado. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, tener al menos un brazo que es reactivo contra un tejido diana y un brazo que es reactivo contra un radical conector (Publicación de Patente de Estados Unidos 20020006379). Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente descripción también puede unirse a más de un antígeno en una célula diana (Carter, 2003). Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser modificado mediante, por ejemplo, la introducción de residuos de cisteína para introducir grupos tiol (Olafsen, 2004).
- De acuerdo con la presente descripción, el anticuerpo de direccionamiento puede estar derivado de cualquier fuente y puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo de camello, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico humano/ratón o un anticuerpo quimérico humano/mono, en particular, un anticuerpo quimérico humano/ratón como nBT062.
- Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias derivadas de un anticuerpo humano y de un anticuerpo no humano y también están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos adecuados para la humanización de anticuerpos incluyen el injerto de CDR (injerto de región determinante complementariedad) (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos Núms. 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o acondicionamiento (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 199; Studnicka et al., 1994; Roguska et al, 1994), mezcla aleatoria de cadenas (Patente de Estados Unidos 5.565.332) y Delmmunosation™ (Biovation, LTD). En el injerto de CDR, las regiones determinantes de la complementariedad de ratón (CDR) de, por ejemplo, mA b B-B4 se injertan en marcos variables humanos, que se unen a continuación a las regiones constantes humanas, para crear un anticuerpo B-B4 humano (HB B4). Varios anticuerpos humanizados mediante injerto de CDR están ahora en uso clínico, incluyendo MYLOTARG (Sievers et al., 2001) y HECEPTIN (Pegram et al, 1998).
- La tecnología acondicionamiento utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies que no son CDR de las regiones variables de anticuerpos para que se asemejen a las superficies de anticuerpos conocidos del anfitrión diana. Las estrategias y métodos para el acondicionamiento de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un anfitrión diferente, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.639.641. Los anticuerpos humanos se pueden elaborar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos. Véanse también las Patentes de Estado Unidos Núms. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitud 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 de direccionamiento que han experimentado cualquier modificación no natural tales como los anticuerpos quiméricos humano/ratón o los anticuerpos quiméricos humano/mono, los anticuerpos humanizados o los anticuerpos que fueron modificados genéticamente para, por ejemplo, mejorar su afinidad hacia las células diana o disminuir su inmunogenicidad pero también los fragmentos de anticuerpos, en particular los fragmentos funcionales de tales anticuerpos de direccionamiento que han experimentado cualquier modificación no natural; los anticuerpos bivalentes; los anticuerpos de dominio; los anticuerpos lineales; las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y los anticuerpos multispecíficos se denominan en la presente memoria **anticuerpos de direccionamiento modificados genéticamente**.

Los anticuerpos quimerizados, mantienen la región de unión del anticuerpo (ABR o región Fab) del anticuerpo no humano, p. ej., el anticuerpo murino en el que están basados, mientras que las regiones constantes pueden ser proporcionadas, por ejemplo, por un anticuerpo humano. Generalmente, la quimerización y/o el intercambio de las regiones constantes de un anticuerpo no afectarán a la afinidad de un anticuerpo debido a que las regiones del anticuerpo que contribuyen a la unión al antígeno no resultan afectadas por este intercambio. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo modificado genéticamente, en particular quimerizado, de la presente invención, puede tener una mayor afinidad de unión (tal como se expresa por valores de  $K_D$ ) que el respectivo anticuerpo no humano en el que está basado. En particular, el anticuerpo nBT062 y los anticuerpos basados en el mismo pueden tener mayor afinidad que el anticuerpo B-B4 murino. En otra realización preferida de la presente invención, los productos inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos modificados genéticamente/quimerizados también muestran esta afinidad de anticuerpo superior. Estos productos inmunoconjugados también pueden presentar en ciertas realizaciones otras propiedades ventajosas, tales como una mayor reducción de la carga tumoral que sus contrapartes que contienen B-B4. En una realización preferida, los anticuerpos de direccionamiento modificados genéticamente, en particular 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 contrapartes murinas se caracterizan por constantes de disociación  $K_D$  (nM) de aproximadamente o más de 1,6. Se prefieren productos inmunoconjugados que comprenden agentes de direccionamiento tales como anticuerpos de direccionamiento pueden estar caracterizados por constantes de disociación  $K_D$  (nM) de menos de 2,6, menos de 2,5, menos de 2,4, menos de 2,3, menos de 2,2, menos de 2,1, menos de 2,0, menos de o aproximadamente 1,9, mientras que los productos inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos de la contraparte murina pueden estar caracterizados por constantes de disociación  $K_D$  (nM) de aproximadamente o más de 2,6 (compárese la Tabla 3, Materiales y Métodos).

También se pueden utilizar anticuerpos completamente humanos. Esos anticuerpos pueden ser seleccionados por el enfoque de presentación de fagos, donde se utiliza CD138 o un determinante antigénico del mismo para unirse selectivamente al fago que expresa, por ejemplo, regiones variables de B-B4 (véase, Krebs, 2001). Este enfoque se acopla ventajosamente a una técnica de maduración de la afinidad para mejorar la afinidad del anticuerpo. Todos los anticuerpos referidos en la presente memoria son anticuerpos aislados.

En una realización, el anticuerpo de direccionamiento es, en su forma no conjugada, moderadamente o mal internalizado. La internalización moderada constituye aproximadamente 30% a aproximadamente 75% de la internalización de anticuerpo, mala internalización constituye aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 30% de internalización después de 3 horas de incubación a 37°C. En otra realización preferida, el anticuerpo de direccionamiento se une a CD138, por ejemplo, los anticuerpos B-B4, BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2, en particular, B-B4. Las células de hibridoma, que se generaron mediante la hibridación de células de mieloma SP02/0 con células de bazo de ratones Balb/c se han depositado en el DSMZ-Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig el 11 de Diciembre de 2007. El número de identificación de estas células de hibridoma que expresan B-B4 es DSM ACC2874. En otra realización, el anticuerpo de direccionamiento no se une sustancialmente a CD138 no expresado en la superficie celular. Cuando, en el contexto de la presente invención, el nombre de un anticuerpo específico se combina con el término "anticuerpo de direccionamiento" tal como "anticuerpo de direccionamiento nBT062", esto significa que este anticuerpo de direccionamiento tiene la especificidad de unión del anticuerpo nBT062. Si se dice que un anticuerpo de direccionamiento está "basado en" un anticuerpo específico, esto significa que este anticuerpo de direccionamiento tiene la especificidad de unión de este anticuerpo, pero podría adoptar cualquier forma en consonancia con la descripción anterior de un anticuerpo de direccionamiento. Cuando, en el contexto de la presente invención, el nombre de un antígeno específico se combina con el término "anticuerpo de direccionamiento" tal como "anticuerpo de direccionamiento a CD138", esto significa que este anticuerpo de direccionamiento tiene la especificidad de unión para CD138. Si, en el contexto de la presente descripción, por ejemplo, se dice que un anticuerpo de direccionamiento hace algo "selectivamente" tal como "dirigirse selectivamente a CD138 expresado en la superficie celular" o, es "selectivo" para algo, esto significa que hay una selectividad significativa (es decir, una mayor afinidad hacia las células positivas para CD138, en comparación con las células negativas para CD138) para, en el caso del ejemplo proporcionado, CD138 expresado en la superficie celular, en comparación con otros antígenos cualesquiera. Los efectos secundarios adversos en un entorno determinado se reducen sustancialmente o incluso se evitan debido a esta selectividad.

"Las moléculas de direccionamiento que no son inmunoglobulinas" de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas diana derivadas de proteínas que no son inmunoglobulinas, así como moléculas de direccionamiento no peptídicas. Las proteínas que no son inmunoglobulinas pequeñas que están incluidos en esta definición están diseñadas para tener afinidades específicas, en particular, por CD138 expresado en la superficie. Estas proteínas pequeñas que no son inmunoglobulinas incluyen moléculas de modificadas genéticamente de armazón tales como moléculas Affilin<sup>®</sup> que tienen un peso molecular relativamente bajo, tal como entre 10 kDa y 20 kDa. Los armazones apropiados incluyen, por ejemplo, gamma-cristalina. Esas moléculas no tienen, en su estado natural, actividad de unión específica hacia las moléculas diana. Modificando genéticamente las superficies de las proteínas a través de asignación al azar definida localmente de aminoácidos expuestos a disolventes, se crean sitios de unión completamente nuevos. Estas primeras proteínas que no presentan unión son por lo tanto transformadas en proteínas de unión específicas. Tales moléculas pueden ser diseñadas específicamente para unirse a una diana, tal como CD138, y permitir la liberación específica de una o más moléculas efectoras (véase, Scil Proteínas GmbH en www.scilproteins.com, 2004). Otro tipo de moléculas de direccionamiento que no son inmunoglobulinas derivan de lipocalinas, e incluyen, por ejemplo ANTICALINS<sup>®</sup>, cuya estructura se asemejan algo a las inmunoglobulinas. Sin embargo, las lipocalinas se componen de una única cadena de polipéptido con 160 a 180 residuos de aminoácidos. El bolsillo de unión de las lipocalinas puede ser reconfigurado para reconocer una molécula de interés con alta afinidad y especificidad (véase, por ejemplo, Beste et al., 1999). Los receptores bacterianos artificiales tales como los comercializados bajo la marca registrada Affibody<sup>®</sup> (Affibody AB) también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Estas moléculas receptoras bacterianas artificiales son proteínas pequeñas, simples y pueden estar compuestas de un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A (*Staphylococcus aureus*). Estas moléculas tienen propiedades de unión similares a muchas inmunoglobulinas, pero son sustancialmente más pequeñas, que tiene un peso molecular a menudo no superior a 10 kDa y también son comparativamente estables. Las moléculas de receptores bacterianos artificiales adecuados se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núms. 5.831.012; 6.534.628 y 6.740.734.

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

Una "molécula efectora" de acuerdo con la presente invención es una molécula o un derivado, o uno de sus análogos que se une a un agente de direccionamiento modificado genéticamente, que ejerce un efecto deseado, por ejemplo, apoptosis, u otro tipo de muerte celular, o una detención continua del ciclo celular en la célula o células diana. Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas que pueden ejercer los efectos deseados en una célula diana e incluyen, pero no se limitan a, toxinas, fármacos, en particular fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, radionúclidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes formadores de poros, ribonucleasas, proteínas de cascadas de señalización de apoptosis con actividades inductoras de apoptosis, enzimas citotóxicas, enzimas de activación de profármacos, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos o citoquinas, así como derivados funcionales o análogos/fragmentos de los mismos. Las toxinas pueden incluir toxinas bacterianas, tales como, pero no limitadas a, toxina de la Difteria o Exotoxina A, toxinas de plantas, tales como, pero no limitadas a, Ricina. Las proteínas de las cascadas de señalización apoptótica con actividades inductoras de apoptosis, incluyen, pero no se limitan a, Granzima B, Granzima A, Caspasa-3, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Bid truncada (tBid), Bax y Bak.

En una realización preferida, el efector aumenta la liberación del efector interno del producto inmunoconjugado, en particular cuando la forma natural del anticuerpo en el que se basa el anticuerpo de direccionamiento del producto inmunoconjugado es escasamente internalizable. En otra realización preferida el efector es, en su forma nativa, no selectivo. En ciertas realizaciones, el efector tiene una toxicidad no selectiva alta, incluyendo la toxicidad sistémica, cuando está en su forma nativa. La "forma nativa" de una molécula efectora de la presente invención es una molécula efectora antes de unirse al agente de direccionamiento para formar un producto inmunoconjugado. En otra realización preferida, la toxicidad no selectiva de la molécula efectora se elimina sustancialmente después de la conjugación al agente de direccionamiento. En otra realización preferida, la molécula efectora causa, al llegar a la célula diana, la muerte o la detención continua del ciclo celular en la célula diana. Una molécula efectora de fármaco de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, un fármaco que incluye, por ejemplo, pequeños fármacos altamente citotóxicos que actúan como inhibidores de la polimerización de tubulina, tales como maitansinoides, dolastatinas, auristatina y critoficina; agentes alquilantes de ADN tales como análogos de CC-1065 o derivados (Patentes de Estados Unidos Núms. 5.475.092; 5.585.499; 6.716.821) y duocarmicina; antibióticos de enedina tales como calicheamicina y esperamicina; y fármacos taxoides potentes (taxano) (Payne, 2003). Los maitansinoides y las calicheamicinas son particularmente preferidos. Un maitansinoide efector incluye maitansinoides de cualquier origen, incluyendo, pero no limitados a maitansinol sintético y análogo de maitansinol y derivados. La doxorubicina, la daunomicina, el metotrexato, la vinblastina, la neocarzinostatina, la macromicina, el

trenimón y la  $\alpha$ -amanitina son algunas otras moléculas efectoras dentro del alcance de la presente invención. También dentro del alcance de la presente invención se encuentran las moléculas de ADN antisentido como moléculas efectoras. Cuando el nombre, por ejemplo, de un fármaco específico o clase de fármacos se combina en la presente memoria con el término "efector" o "molécula efectora", se hace referencia a un efector de un producto inmuoconjugado de acuerdo con la presente invención que se basa en el fármaco o clase de fármacos especificados.

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 tubulina, lo que da como resultado el bloqueo mitótico y la muerte celular (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). La citotoxicidad de la maitansina es 200-1000 veces mayor que la de los fármacos contra el cáncer en uso clínico que afectan a la polimerización de 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 maitansinoides son altamente citotóxicos pero su uso clínico en la terapia del cáncer se ha limitado en gran medida por sus graves efectos secundarios sistémicos atribuidos principalmente a su escasa selectividad para los tumores. Los ensayos clínicos con maitansina mostraron efectos adversos graves en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal.

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

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

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

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

La DM-1 ( $N^2$ -desacetil- $N^2$ -(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) es una molécula efectora preferida en el contexto de la presente invención. La DM1 es de 3 a 10 veces más citotóxica que la maitansina, y se ha convertido en un profármaco mediante su conexión a través de uno o varios enlaces disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un antígeno asociado con tumores. Algunos de estos productos conjugados (a veces denominados "profármacos activados por tumores" ("TAP" en sus siglas inglesas)) no son citotóxicos en el compartimento de la sangre, ya que son activados después de la asociación con las células diana e internalizados, liberando así el fármaco (Blattler, 2001). Se han desarrollado varios productos conjugados de anticuerpo-DM1 (Payne, 2003), y se han evaluado en ensayos clínicos. Por ejemplo, el tratamiento con huC242-DM1 en pacientes con cáncer colorrectal fue bien tolerado, no indujo una respuesta inmunitaria detectable, y tuvo un tiempo de circulación prolongado (Tolcher, 2003).

Otros maitansinoides particularmente preferidos comprenden una cadena lateral que contiene un enlace tiol con impedimento estérico tales como, pero no limitados a, los maitansinoides  $N^2$ -desacetil- $N^2$ -(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también referido como "DM3", y  $N^2$ -desacetil- $N^2$ -(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, también referido como "DM4". La síntesis de DM4 se muestra en las Figs. 3 y 4 y se describe en la presente memoria. DM4 difiere de DM1 y DM3 en que porta grupos metilo en su  $C\alpha$ . Esto da como resultado un impedimento estérico cuando DM4 está unido a través de un conector en particular, pero no limitado a, un conector que comprende un enlace disulfuro, a un agente de direccionamiento tal como nBT062. Una amplia variedad de maitansinoides que portan un grupo tiol con impedimento estérico (que poseen uno o dos sustituyentes, en particular sustituyentes alquilo, tales como los sustituyentes metilo de DM4) se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2004/0235840, publicada el 25 de Noviembre del 2004. El impedimento estérico conferido por grupos alquilo tales como los grupos metilo en el carbono adyacente al átomo de azufre de DM3 y DM4 puede afectar a la velocidad de escisión intracelular del producto inmuoconjugado. Por consiguiente, la unidad alquílica variable puede afectar a la potencia, la eficacia y la seguridad/toxicidad *in vitro* e *in vivo*.

Según lo informado por Goldmahker et al. en la Publicación de Patente de los Estados Unidos US 2006/0233814, tal impedimento induce alquilación (p. ej., metilación) del fármaco libre, una vez que el fármaco se libera a su diana. La alquilación puede aumentar la estabilidad del fármaco permitiendo el llamado efecto de vecindad. Sin embargo, apreciará el experto en la técnica, otras moléculas efectoras que comprenden sustituyentes tales como grupos alquilo en las posiciones que dan como resultado un impedimento estérico cuando el efector está unido a un agente de direccionamiento a través de un conector son parte de la presente invención (Publicación de Patente de Estados

Unidos Núm. 2004/0235840). Preferiblemente, este impedimento induce una modificación química tal como la alquilación del fármaco libre aumentando su estabilidad general, lo que permite que el fármaco no solo induzca la muerte celular o la detención continua del ciclo celular en las células tumorales que expresan CD138, sino, opcionalmente, también afecte a las células auxiliares que, por ejemplo, apoyan o protegen el tumor de los fármacos, en particular células del estroma tumoral y la vasculatura del tumor y que generalmente no expresan CD138 disminuyendo o perdiendo su función de soporte o protección.

Los agentes alquilantes de ADN también se prefieren particularmente como moléculas efectoras e incluyen, pero no se limitan a, análogos o derivados de CC-1065. CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado a partir de cultivos de *Streptomyces zelensis* y se ha demostrado que es excepcionalmente citotóxico in vitro (Patente de Estados Unidos Núm. 4.169.888). Dentro del alcance de la presente invención son, 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 apreciará fácilmente el experto en la técnica, los análogos o derivados modificados de CC-1065 como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.846.545 y los profármacos de análogos o derivados de CC-1065 como se describe, por ejemplo, en las Patente de Estados Unidos Núm. 6.756.397 también están dentro del alcance de la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención, los análogos o derivados de CC-1065 pueden, por ejemplo, ser sintetizados como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.534.660.

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

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

Un producto inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención comprende al menos un agente de direccionamiento, en particular anticuerpo de direccionamiento y una molécula efectora. El producto inmunoconjugado puede comprender moléculas adicionales, por ejemplo, para la estabilización. Para los productos inmunoconjugados, el término "conjugado" se utiliza generalmente para definir la asociación operativa del agente de direccionamiento con una o más moléculas efectoras y no se pretende que haga referencia exclusivamente a cualquier tipo de asociación operativa, y no se limita particularmente a "conjugación" química. En tanto que el agente de direccionamiento sea capaz de unirse al sitio diana y el efector anclado funcione suficientemente como se pretende, en particular cuando se libera al sitio diana, cualquier modo de unión será adecuado. Los métodos de conjugación según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la unión directa de la molécula efectora con el anticuerpo de direccionamiento, con o sin modificación previa de la molécula efectora y/o el anticuerpo de direccionamiento o el anclaje a través de conectores. Los conectores se pueden clasificar funcionalmente, por ejemplo, en lábil en medio ácido, conectores fotolábiles, conectores escindibles por enzimas, tales como los conectores que pueden ser escindidos por peptidasas. Los conectores escindibles son preferidos en muchas realizaciones de la invención. Tales conectores escindibles pueden escindirse bajo las condiciones presentes en el entorno celular, en particular, un entorno intracelular y que no tengan ningún efecto perjudicial sobre el fármaco liberado tras la escisión. Los pH bajos tales como el pH de 4 a 5, tales como los que existen en ciertos departamentos intracelulares escindirán ácido conectores lábiles, mientras que los conectores fotolábiles pueden ser escindidos, p. ej., mediante luz infrarroja. Sin embargo, se prefieren los conectores que se escinden por/en las condiciones fisiológicas presentes en la mayoría de las células y se denominan aquí **conectores escindibles fisiológicamente**. En consecuencia, se prefieren conectores disulfuro en muchas realizaciones de la invención. Estos conectores son escindibles mediante intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Los conectores disulfuro heterobifuncionales preferidos incluyen, pero no se limitan a, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, p. ej., Carlsson et al. (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.563.304), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (véase, p. ej., Número de registro CAS 341498-08-6), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) (véase, p. ej., Yoshitake et al., (1979)), y 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio]pentanoato de N-succinimidilo (SMNP) (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.563.304). Las moléculas conectoras más

preferidos para uso en la composición de la invención son SPP, SMCC y SPDB.

Otros conectores adecuados pueden incluir enlaces "no escindibles", tales como, pero no limitados a Maleimidometil ciclohexano carboxilato de sulfosuccinimidilo (SMCC), que es un conector heterobifuncional capaz de unir compuestos con compuestos que contienen SH. Las moléculas conectoras bifuncionales y heterobifuncionales, tales como las moléculas conectoras heterobifuncionales dirigidas a hidratos de carbono, tales como la hidrazida de S-(2-tiopiridil)-L-cisteína (TPCH), también se encuentran dentro del alcance de la presente invención (Vogel, 2004). La molécula efectora, tal como un maitansinoide, puede conjugarse con el anticuerpo de direccionamiento a través de un proceso de dos etapas de reacción, incluyendo como una primera etapa la modificación del anticuerpo de direccionamiento con un reactivo de entrecruzamiento tal como piridilditiopropionato de N-succinimidilo (SPDP) para introducir grupos ditiopiridilo en el anticuerpo de direccionamiento. En una segunda etapa, un maitansinoide reactivo que tiene un grupo tiol, tal como DM1, se pueden añadir al anticuerpo modificado, lo que da como resultado el desplazamiento de los grupos tiopiridilo en el anticuerpo modificado, y la producción de producto conjugado de maitansinoide citotóxico/anticuerpo conectado por disulfuro (Patente de Estados Unidos Núm. 5.208.020). Sin embargo, los procesos de conjugación de una sola etapa, como los descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20030055226 de Chari et al también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. En una realización de la presente invención múltiples moléculas efectoras del mismo tipo o de tipo diferente se unen a un anticuerpo de direccionamiento. Como se comentó en otra parte en la presente memoria, la naturaleza de los conectores empleados puede influir en la destrucción por vecindad (Kovtun et al., 2006). Véase también la discusión de la Fig. 13.

Los análogos o derivados de CC-1065 se pueden conjugar con el agente de direccionamiento a través de por ejemplo grupos conectores PEG como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.716.821.

Las calicheamicinas se pueden conjugar con los anticuerpos de direccionamiento a través de conectores (Patente de Estados Unidos Núm. 5.877.296 y Patente de Estados Unidos Núm. 5.773.001) o de acuerdo con los métodos de conjugación descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.712.374 y Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.586. Otro método preferido para la preparación de productos conjugados de calicheamicina se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20040082764. Los productos inmunoconjugados de la presente descripción puede adoptar la forma de proteínas de fusión recombinantes.

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

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

VELCADE es un inhibidor del proteosoma que se utiliza para tratar el mieloma múltiple. Se cree que VELCADE actúa sobre las células de mieloma causando la muerte celular, y/o actúa indirectamente inhibiendo el crecimiento de células de mieloma y la supervivencia actuando sobre el microentorno de la médula. Sin limitarse a una teoría o modo de acción específicos, VELCADE por lo tanto altera los procesos celulares normales, dando como resultado la inhibición del proteosoma que promueve la apoptosis.

REVLIMID es un agente inmunomodulador. Se cree que REVLIMID afecta a múltiples vías en las células de mieloma, induciendo de ese modo la apoptosis, inhibiendo el crecimiento de células de mieloma, inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) inhibiendo de este modo la angiogénesis, y reduciendo la adherencia de células de mieloma a las células estromales de médula ósea.

La dexametasona es una hormona esteroide de glucocorticoide sintético que actúa como anti-inflamatorio e inmunosupresor. Cuando se administra a pacientes con cáncer, la dexametasona puede contrarrestar los efectos secundarios de la terapia del cáncer. La dexametasona también se puede administrar sola o junto con otros agentes anticancerosos, incluyendo talidomida, adriamicina o vincristina.

El término "combinado con" no se limita a la administración exactamente al mismo tiempo. En lugar de ello, el



término abarca la administración del producto inmunoconjugado de la presente invención y el otro régimen (p. ej., radioterapia) o agente, en particular los agentes citotóxicos antes mencionados en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera que puedan actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio que se incrementa en comparación con el tratamiento con el producto inmunoconjugado de la presente invención solo o, por ejemplo, el otro o los otros agentes. Se prefiere que el producto inmunoconjugado y el otro o los otros agentes actúen de forma aditiva, y se prefiere especialmente que actúen sinérgicamente. Tales moléculas se proporcionan adecuadamente en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. El médico experto puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como los tiempos y métodos de administración apropiados. Tal como se utiliza en el contexto de la presente descripción "co-administración" se refiere a la administración al mismo tiempo que el producto inmunoconjugado, a menudo en una forma de dosificación combinada.

El término "identidad de secuencia" se refiere a una medida de la identidad de las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de modo que se obtiene el mayor orden de coincidencia. "Identidad", per se, tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque existen 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. y Lipton, D., SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)).

El que cualquier molécula de ácido nucleico concreta sea al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de nBT062, o una parte de la misma, se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos como soporte lógico DNAsis (Hitachi Software, San Bruno, Calif.) para un alineamiento de secuencia inicial seguido de soporte lógico de secuencia de ADN/proteína ESEE versión 3,0 (cabot@trog.mbb.sfu.ca) para múltiples alineamientos de secuencias.

El que la secuencia de aminoácidos sea al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo al SEQ ID NO: 1 o al SEQ ID NO: 2, o una parte de los mismos, se puede determinar utilizando programas informáticos conocidos como el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT 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.

Cuando se utiliza DNASIS, ESEE, BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, idéntica en 95% a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud total del ácido nucleico de referencia o la secuencia de aminoácidos y que se permiten huecos en la homología de hasta 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

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

La molécula de anticuerpo básica es una estructura bifuncional en donde las regiones variables se unen al antígeno mientras que las regiones constantes restantes pueden provocar respuestas independientes de antígenos. Las principales clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, están determinadas por las regiones constantes. Estas clases se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos). Por ejemplo, la clase IgG tiene cuatro isotipos, a saber, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 que están determinadas por las regiones constantes. De las diversas clases de anticuerpos humanos, se sabe que solo IgG1 humana, IgG2, IgG3 e IgM activan eficazmente el sistema del complemento. Si bien las regiones constantes no forman sitios de unión al antígeno, la disposición de las regiones constantes y la región bisagra puede conferir flexibilidad segmentaria a la molécula lo que le permite unirse al antígeno.

Diferentes isotipos de IgG pueden unirse a los receptores Fc sobre células tales como monocitos, células B y células NK, activando de este modo las células para liberar citoquinas. Diferentes isotipos también pueden activar el complemento, lo que da como resultado inflamación local o sistémica. En particular, los diferentes isotipos de IgG pueden unirse a FcγR en diferentes grados. Las FcγRs son un grupo de glicoproteínas de la superficie que pertenecen a la superfamilia de Ig y se expresan principalmente en los leucocitos. Las glicoproteínas FcγR se dividen en tres clases designadas FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Si bien IgG1, IgG2 e IgG3 se unen fuertemente a una variedad de estas clases de glicoproteínas FcγR, IgG4 presenta una unión mucho más débil. En particular, IgG4 es un ligador intermedio de FcγRI, lo que da como resultado una ADCC (citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpo) relativamente baja o incluso nula, y no se une a FcγRIIIa o FcγRIIA. IgG4 es también un ligador débil de FcγRIIB, que es un receptor inhibitor. Además, IgG4 media una fijación del complemento débil o nula y una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) débil o nula. En el contexto de la presente invención, IgG4 puede emplearse específicamente para prevenir el direccionamiento mediado por Fc de FcR hepático ya que no muestra ninguna interacción con FcRγII en LSEC (células endoteliales sinusoidales del hígado), ninguna o débil interacción con FcRγI-111 en células de Kupffer (macrófagos) y ninguna interacción con FcRγIII en células NK hepáticas. Ciertas mutaciones que reducen adicionalmente cualquier CDC son también parte de la presente invención. Por ejemplo se encontró que residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducían la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y la CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Una o más mutaciones que estabilizan el anticuerpo son también parte de la presente invención (también denominadas en la presente memoria "mutaciones estabilizadoras"). Estas mutaciones incluyen, en particular, mutaciones de leucina a ácido glutámico en la región CH2 de IgG4 e intercambios de serina a prolina en el núcleo de la bisagra de IgG4. Estas mutaciones disminuyen, en ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de semi-moléculas a menos de 10%, menos de 5% y preferiblemente menos de 2% o 1%. Además, la media vida in vivo de los anticuerpos estabilizados de este modo puede aumentarse varios días, incluyendo 1, 2, 3, 4 o más de 5 días (Schuurman, 1999).

Los agentes de direccionamiento, incluyendo los anticuerpos de direccionamiento descritos en la presente memoria también pueden ser descritos o especificados en términos de su **afinidad de unión** al antígeno, en particular para CD138. Las afinidades de unión preferidas de los agentes de direccionamiento tales como los anticuerpos dirigidos 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. Para los productos inmunoconjugados que comprenden dichos agentes de direccionamiento tales como los anticuerpos dirigidos se prefieren constantes de disociación  $K_D$  (nM) de menos de 1,6, menos de 1,5 o menos de 2,5, menos de 2,4, menos de 2,3, menos de 2,2, menos de 2,1, menos de 2,0, menos de o aproximadamente 1,9.

Una **región de unión a antígeno** (ABR) de acuerdo con la presente invención puede variar en función del tipo de anticuerpo direccionamiento o anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente empleado. En un anticuerpo de origen natural y en la mayoría de los anticuerpos quiméricos y humanizados, la región de unión a antígeno se compone de una cadena ligera y los dos primeros dominios de una cadena pesada. Sin embargo, en un anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras, la región de unión a antígeno se compondrá, p. ej., solo de los dos primeros dominios de la cadena pesada, mientras que en anticuerpos de cadena sencilla (scFv), que combinan en una única cadena polipeptídica los dominios variables de de cadena ligera y pesada de una molécula de anticuerpo, la ABR es proporcionada por una sola molécula de polipéptido. Los fragmentos Fab se obtienen generalmente por digestión con papaína y tienen una cadena ligera y parte de una cadena pesada y por lo tanto comprenden un ABR con solo un sitio de combinación con el antígeno. Por otro lado, los anticuerpos bivalentes son pequeños fragmentos de anticuerpos con dos regiones de unión a antígeno. En el contexto de la presente invención, sin embargo, una región de unión a antígeno de un anticuerpo de direccionamiento o anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente es cualquier región que determina principalmente la **especificidad de unión** del anticuerpo de direccionamiento o del anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente.

Si se dice que una ABR u otra región del anticuerpo de direccionamiento es "**de un determinado anticuerpo**", p. ej., un anticuerpo humano o no humano, esto significa en el contexto de la presente invención que la ABR es o bien idéntica a una ABR correspondiente de origen natural o se basa en ella. Una ABR está basada en una ABR de origen natural si tiene la especificidad de unión de la ABR de origen natural. Sin embargo, tal ABR puede comprender, por ejemplo, mutaciones puntuales, adiciones, supresiones o modificaciones postraduccionales tales como glicosilación. Tal ABR en particular podrá tener una identidad de secuencia de más de 70%, más del 80%, más del 90%, preferiblemente más de 95%, más del 98% o más de 99% con la secuencia de la ABR de origen natural.

El direccionamiento homogéneo de un agente de direccionamiento tal como un anticuerpo de direccionamiento, pero en particular un producto inmunoconjugado que lo comprende, en el contexto de la presente invención, es una medida de la varianza asociada con la obtención del resultado deseado de dicho direccionamiento con el agente de direccionamiento. En ciertas realizaciones de la invención, el resultado deseado se obtiene mediante una simple unión a la diana. Este es, por ejemplo, el caso en realizaciones en las que un determinado agente de direccionamiento proporciona protección contra la posterior unión. Sin embargo, la homogeneidad de un agente de direccionamiento se puede evaluar fácilmente, por ejemplo, a través de la eficacia de un producto inmunoconjugado que comprende dicho agente de direccionamiento. Por ejemplo, la eficacia de dicho producto inmunoconjugado contra un antígeno tumoral como CD138 que comprende un efector destinado a destruir las células tumorales y/o detener el crecimiento de un tumor puede ser determinada por el grado de supresión del crecimiento de un tumor que comprende células que expresan el antígeno CD138. Tal producto inmunoconjugado puede mostrar una alta variación en su eficacia. Puede, por ejemplo, detener el crecimiento del tumor a veces con una alta eficacia, pero otras veces con una eficacia que apenas supera la eficacia del control. Una baja varianza en la eficacia de un producto inmunoconjugado, por otro lado, muestra que el producto inmunoconjugado y/o el agente de direccionamiento, respectivamente, proporcionan el resultado deseado de forma coherente. Una forma de cuantificar la homogeneidad del direccionamiento es calcular la **variación del direccionamiento**. En el contexto del

crecimiento tumoral detenido por un producto inmunoconjugado que comprende un cierto agente de direccionamiento, la variación del direccionamiento se puede calcular determinando en primer lugar el tiempo para que un tumor alcance un volumen predeterminado, por ejemplo de 300 mm<sup>3</sup>. Preferiblemente, se elige el volumen predeterminado de modo que cualquier crecimiento del tumor antes y después de alcanzar dicho volumen predeterminado esté aumentando constantemente a aproximadamente la misma tasa. Después de determinar tal momento para un grupo de sujetos se calcula la media de estos tiempos (T<sub>m</sub>) en el grupo de sujetos (p. ej., ratones SCID u otro modelo adecuado que presente crecimiento del tumor homogénea). El T<sub>m</sub> se correlaciona a continuación con las observaciones realizadas en el sujeto del grupo que muestra la menor eficacia en el direccionamiento y que por lo tanto está asociado con tumores que necesitan el menor tiempo (T<sub>f</sub>) para alcanzar dicho volumen predeterminado, y, por otro lado, el sujeto del grupo con mayor eficacia en el direccionamiento y que por lo tanto está asociado con tumores que necesitan más tiempo (T<sub>s</sub>) para llegar a dicho volumen predeterminado mediante el cálculo de la variación del direccionamiento para el volumen predeterminado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$15 \quad \text{Variación del direccionamiento [\%]} = \frac{T_s - T_f}{T_m} \times 100$$

En una realización preferida, la variación del direccionamiento del producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente de la presente invención es menor de 150%, menor de 140%, menor de 130%, menor de 120%, menor de 110%, menor de 100%, menor de 90%, menor de 80%, menor de 70%, menor de 60%, o menor de 50%, y en ciertas realizaciones incluso menor de 45%. Preferiblemente, la variación de direccionamiento se encuentra entre aproximadamente 10% y aproximadamente 150%, preferiblemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, aproximadamente 10% y aproximadamente 70%, aproximadamente 10% y aproximadamente 60%, aproximadamente 10% y aproximadamente 50%.

La homogeneidad del direccionamiento puede ser cuantificada también por otros medios tales como la determinación del retraso del crecimiento tumoral. Además, como comprenderá el experto en la técnica fácilmente el volumen tumoral de un tamaño determinado es solo un parámetro sobre el que se puede determinar variación de direccionamiento base. Dependiendo del resultado deseado, se pueden emplear otros parámetros incluyendo el tiempo (para, p. ej., medir el retraso del crecimiento del tumor) o el % de la unión. El experto en la técnica puede determinar fácilmente tales otros parámetros.

La FIG. 9 muestra en (C) y (D) las diferencias de homogeneidad de direccionamiento/unión entre productos inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo murino BB4 (BB4-SPP-DM1; FIG. 9C) y el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente nBT062 (nBT062-SPP-DM1; FIG. 9D) basado en el mismo. Como se puede observar a partir de estos gráficos, los resultados obtenidos con el producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente son sustancialmente más homogéneos que los obtenidos con los productos inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo murino. Esto es particularmente notable ya que la región de unión al anticuerpo de BB4 no se modificó en nBT062. Por lo tanto, el producto inmunoconjugado que comprende la región de unión al anticuerpo del anticuerpo murino, pero no otras partes del anticuerpo murino, mostraron propiedades que superaron con creces los resultados que podrían esperar los expertos en la técnica.

nBT062 (véase también la Fig. 1) es un mAb IgG4 quimérico murino-humano, una versión quimerizada de B-B4. Esta versión quimerizada de B-B4 fue creada para reducir la respuesta HAMA (anticuerpo humano anti-ratón por "Human Anti-Mouse Antibody), mientras se mantiene la funcionalidad de la región de unión al anticuerpo de B-B4 por CD138. Sorprendentemente, los resultados obtenidos utilizando un producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente fueron mucho más homogéneos (se redujo la variación en los resultados). A continuación se especifica el protocolo para la producción de nBT062. Las células de ovario de hámster chino que expresan nBT062 se han depositado en el DSMZ-Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig, el 11 de Diciembre de 2007. El número de identificación es DSM ACC2875. Un anticuerpo quimérico específico de CD138 basado en B-B4 se denomina genéricamente en la presente memoria c-B-B4.

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

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos pronosticada para nBT062

secuencia pronosticada de la cadena pesada de -nBT062 (SEQ ID NO: 1):					
1	<b>QVQLQQSGSE</b>	<b>LMPGASVKI</b>	<b>SCKATGYTFS</b>	<b><u>NYWIEWVKQR</u></b>	<b>PHGLEWIGE</b>
51	<b><u>ILPGTGRTIY</u></b>	<b><u>NEKFKGKATF</u></b>	<b>TADISSNTVQ</b>	<b><u>MQLSSLTSED</u></b>	<b><u>SAVYYCARRD</u></b>
101	<b><u>YYGNFYAMD</u></b>	<b><u>YWGQGTSVTV</u></b>	<b>SSASTKGPSV</b>	<b>FPLAPCSRST</b>	<b>SESTAALGCL</b>
151	<b>VKDYFPEPVT</b>	<b>VSWNSGALTS</b>	<b>GVHTFPAVLQ</b>	<b>SSGLYSLSSV</b>	<b>VTVPSSSLGT</b>
201	<b>KTYTCNVDHK</b>	<b>PSNTKVDKRV</b>	<b>ESKYGPPCPS</b>	<b>CPAPEFLGGP</b>	<b>SVFLFPPKPK</b>
251	<b>DTLMISRTPV</b>	<b>VTCVVVDVSQ</b>	<b>EDPEVQFNWY</b>	<b>VDGVEVHNAK</b>	<b>TKPREEQFNS</b>
301	<b>TYRVVSVLTV</b>	<b>LHQDWLNGKE</b>	<b>YKCKVSNKGL</b>	<b>PSSIIEKTISK</b>	<b>AKGQPREPQV</b>
351	<b>YTLPPSQEEM</b>	<b>TKNQVSLTCL</b>	<b>VKGFYPSDIA</b>	<b>VEWESNGQPE</b>	<b>NNYKTTTPVL</b>
401	<b>DSDGSFFLYS</b>	<b>RLTVDKSRWQ</b>	<b>EGNVFSCSVM</b>	<b>HEALHNHYTQKSLSLSLG</b>	<b>(K)</b>
La lisina C-terminal es propensa a la saturación y podría estar presente debido a la saturación incompleta hasta cierto punto. La (K) en paréntesis no es parte del SEQ ID NO 1.					
- secuencia pronosticada de la cadena ligera de nBT062 (SEQ ID NO: 2):					
1	<b>DIQMTQSTSS</b>	<b>LSASLGDRVT</b>	<b><u>ISCSASQGIN</u></b>	<b><u>NYLNWYQKP</u></b>	<b>DGTVELLIYY</b>
51	<b><u>TSTLQSGVPS</u></b>	<b><u>RFGSGSGTD</u></b>	<b><u>YSLTISNLEP</u></b>	<b><u>EDIGTYCQQ</u></b>	<b><u>YSKLPRTFGG</u></b>
101	<b>GTKLEIKRTV</b>	<b>AAPSVFIFPP</b>	<b>SDEQLKSGTA</b>	<b>SVVCLLNNFY</b>	<b>PREAKVQWKV</b>
151	<b>DNALQSGNSQ</b>	<b>ESVTEQDSKD</b>	<b>STYLSLSTLT</b>	<b>LSKADYEKHK</b>	<b>VYACEVTHQG</b>
201	<b>LSSPVTKSFN</b>	<b>RGEC</b>			

Tabla 2. muestra una comparación de las definiciones de CDR generales de Kabat y Chothia y las CDR pronosticadas para BT062

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

BT062 es un producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo quimérico nBT062 dirigido a CD138 que está anclado a través de un conector, aquí SPDB, al derivado citostático maitansinoide DM4. Una representación química de BT062 se proporciona en las FIGS. 1 y 2. Los productos inmunoconjugados que comprenden nBT062 y una molécula efectora maitansinoide se caracterizan a menudo en términos de su conector y el efector maitansinoide, p. ej., nBT062-SMCC-DM1, es un producto inmunoconjugado que comprende nBT062, SMCC (un conector "no escindible" que contiene un enlace tioéster) y DM1 como efector. Más genéricamente, un producto inmunoconjugado que contiene nBT062 y una molécula efectora también se pueden describir como nBT062-conector-efector o simplemente como nBT062-efector (nBT062N, en donde N es cualquier efector descrito en la presente memoria.

Se hace referencia en la presente memoria a una contraparte sin impedimento (**UI**: producto inmunoconjugado sin impedimento) de un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 anclado a una molécula efectora a través de un conector escindible (CL) y se describe en la presente memoria como UICL, que está en contraste con un producto inmunoconjugado en el que dicha molécula efectora experimenta impedimento estérico, y contiene un conector escindible (HICL -producto inmunoconjugado, conector escindible). El UICL es un producto inmunoconjugado equivalente al HICL que comprende un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente en el que la molécula efectora, sin embargo, no experimenta impedimento estérico. Los ejemplos de un par de HICL/UICL son BT062 y nBT062-SPP-DM1. Una contraparte sin impedimento de tal producto inmunoconjugado que comprende un conector no escindible (**UINCL**) se refiere al producto inmunoconjugado equivalente que comprende un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente en el que la molécula efectora no experimenta impedimento estérico y comprende un conector no escindible. Para BT062, nBT062-SMCC-DM1 constituiría un ejemplo de tal contraparte sin impedimento que comprende un conector no escindible (UINCL).

Un crecimiento de una actividad inhibidora de tumor (= actividad inhibidora de crecimiento del tumor) de un producto inmunoconjugado es una medida relativa. Describe la actividad inhibidora del crecimiento del tumor de un producto conjugado con respecto a la actividad del producto inmunoconjugado de rendimiento más alto cuya actividad se establece como 100%. Por ejemplo, si la actividad del producto inmunoconjugado de rendimiento más alto, por ejemplo, BT062, que causa un retraso en el crecimiento del tumor (TGD) de 32 días, se establece como 100%, la actividad de, p. ej., nBT062-DM1, que muestra un retraso del crecimiento tumoral (TGD) de 18 días se calcula de la siguiente manera:

Actividad Inhibidora del Crecimiento Tumoral =

$$100X (TGD_{nBT062-DM1}/TGD_{BT062}),$$

más genéricamente:

Actividad Inhibidora del Crecimiento Tumoral =

$$100X (TGD_{Muestra}/TGD_{Referencia}).$$

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

**Tabla 3:** Retraso del crecimiento del tumor (TGD) y % de Actividad de nBT062-DMx contra xenoinjertos de tumor MOLP-8 en ratones SCID basados en grupos de tratamiento que reciben una dosis de 450 µg/kg.

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

(\*) Retraso del crecimiento del tumor en días (TGD) como tiempo medio en días para el grupo de tratamiento para alcanzar un tamaño predeterminado (160 mm<sup>3</sup>) menos el tiempo medio para que el grupo control alcance este tamaño predeterminado.

(\*\*) Actividad Inhibidora del Crecimiento Tumoral = 100x(TGD<sub>Muestra</sub>/TGD<sub>BT062</sub>). La actividad de BT062 se define como 100%.

En el ejemplo proporcionado en la Tabla 2, BT062 proporciona un crecimiento de una actividad inhibidora de tumor que excede la de su contraparte sin impedimento (nBT062-SPP-DM1) en 60%, y un crecimiento de una actividad inhibidora de tumor que excede la de su producto inmunoconjugado contraparte sin impedimento que comprende un

conector no escindible (nBT062-SMCC-DM1) en 44%.

Se informó previamente que un conector escindible en, p. ej., productos inmunoconjugados de huC242-maitansinoide puede proporcionar el denominado efecto de vecindad. Goldmahker et al. (Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0233814) también describen que el efecto de vecindad es particularmente pronunciado cuando la molécula efectora está sujeta a modificación adicional, en particular, alquilación, después de la escisión del agente de direccionamiento. Goldmahker et al. también mostró que UICL muestra mejor TGD que el respectivo UINCL (véase, p. ej., la Fig. 6 de la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0233814).

Sin embargo, la eficacia global de los productos inmunoconjugados HICL/UICL/UINCL parecen diferir de producto inmunoconjugado a producto inmunoconjugado y/o de diana a diana. Por ejemplo, el HICL trastuzumab-SPP-DM4 fue claramente superado en su capacidad para reducir el tamaño del tumor por el UINCL trastuzumab-SMCC-DM1, mientras que el rendimiento del producto inmunoconjugado UICL trastuzumab-SPP-DM1 se parecía sustancialmente al del correspondiente HICL (véase la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2008/0171040 de Eberts et al.), produciendo de este modo los resultados obtenidos en función del producto inmunoconjugado y la diana.

Aquí, se encontró otra relación. Si bien el HICL superó al UICL y UNICL, también se encontró sorprendentemente que un UICL en un alto régimen de dosificación única (250 µg/kg) en realidad no mostró mejores resultados que el UINCL. De hecho, el TGD en días que se observó en un UICL en dicho régimen fue en realidad inferior al del UINCL. Esta observación se hizo más pronunciada con un aumento de la dosis (450 µg/kg). En suma, como se muestra en la Fig. 11A, el HICL superó al UICL en experimentos de dosis individuales, así como en experimentos de múltiples dosis (no mostrado), hasta un grado inesperado. Además, el UICL fue superado inesperadamente por el UINCL con dosis más altas.

Los agentes de direccionamiento, en particular, los anticuerpos de direccionamiento, y/o los productos inmunoconjugados descritos en la presente memoria pueden administrarse por cualquier vía, incluyendo la vía intravenosa, parenteral, oral, intramuscular, intratecal o en forma de aerosol. El modo de liberación dependerá del efecto deseado. Un experto en la técnica sabrá fácilmente la mejor vía de administración para un tratamiento concreto de acuerdo con la presente invención. La dosificación apropiada dependerá de la vía de administración y el tratamiento indicado, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica en vista de los protocolos de tratamiento actuales.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un agente de direccionamiento no conjugado, el producto inmunoconjugado de la presente invención y/o cualquier agente citotóxico más como ingredientes activos se pueden preparar de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> Ed. (1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Típicamente, las cantidades eficaces de ingredientes activos se pueden mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, intravenosa, oral, parenteral, intratecal, transdérmica, o mediante aerosol.

Para la administración oral, el agente de direccionamiento y/o el producto inmunoconjugado y/o el agente citotóxico se pueden formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, grageas, masas fundibles, polvos, suspensiones o emulsiones. En la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes de suspensión y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos). Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar o con revestimiento entérico por medio de técnicas convencionales. El agente activo debe ser estable en el paso por el tracto gastrointestinal. Si fuera necesario, se pueden utilizar agentes adecuados para el paso estable, y pueden incluir fosfolípidos o derivados de lecitina descritos en la bibliografía, así como liposomas, micropartículas (incluyendo microesferas y macroesferas).

Para la administración parenteral, el agente de direccionamiento y/o el producto inmunoconjugado y/o el agente citotóxico se pueden disolver en un vehículo farmacéutico y administrarse en forma de una solución o una suspensión. Son ilustrativos de los vehículos adecuados agua, solución salina, solución de 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 de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y similares. Cuando están siendo administrados el agente de direccionamiento no conjugado y/o el producto inmunoconjugado y/o un agente citotóxico intracerebroventricularmente o intratecalmente, también pueden disolverse en líquido cefalorraquídeo.

Las dosis administradas a un sujeto pueden especificarse como cantidad, por área de superficie del sujeto (que incluye seres humanos así como animales no humanos). La dosis se puede administrar a tal sujeto en cantidades, preferiblemente, pero no exclusivamente, de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, incluyendo aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup> y aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>. Los agentes de direccionamiento/productos inuncojugados se administran adecuadamente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. En un régimen de dosis múltiple estas cantidades se pueden administrar una vez al día, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada seis semanas. Las dosis de carga con una alta dosis única o, alternativamente, dosis menores que se administran poco después otra seguidas por dosis cronometradas a intervalos más largos constituyen una realización preferida de la presente invención. En una realización preferida, la temporización de las dosis se ajusta para un sujeto de manera que haya pasado suficiente tiempo antes de una segunda y/o cualquier tratamiento posterior de manera que la dosis anterior haya sido metabolizada sustancialmente, pero la cantidad de producto inuncojugado presente en el sistema del sujeto todavía inhiba, retrase y/o prevenga el crecimiento de un tumor. Un régimen de "dosis única repetida" ilustrativo comprende administrar una dosis inicial de producto inuncojugado de aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup> una vez cada tres semanas. Alternativamente, una dosis inicial alta puede estar seguida de una dosis de mantenimiento bisemanal de aproximadamente 150 µg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y análisis conocidos. La dosificación puede variar dependiendo de si se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, el curso de cualquier terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente de direccionamiento/producto inuncojugado, y la discreción del médico a cargo.

En una realización, el producto inuncojugado se administra junto con uno o más agentes citotóxicos tales como un anticuerpo relevante o un fragmento del mismo, que es eficaz en el tratamiento de la misma enfermedad o una co-morbilidad adicional; por ejemplo, se puede administrar un producto inuncojugado específico de CD138 combinado con un anticuerpo que reconoce a otro antígeno que se expresa en exceso en el tipo diana de cáncer. Un ejemplo de un anticuerpo que puede ser administrado combinado con un producto inuncojugado específico de CD138 es un anticuerpo anti-CD40 (Tai et al., 2006).

Otros anticuerpos anti-cáncerosos y productos inuncojugados que se pueden co-administrar con los productos inuncojugados descritos en la presente memoria, incluyen, pero no están limitados a, p. ej., AVASTIN (bevacizumab) o MYELOMACIDE (milatuzumab).

El producto inuncojugado de la presente invención puede también ser administrado en particular en los regímenes de tratamiento con quimioterapia de dosis alta (preferiblemente, melfalán, melfalán/prednisona (MP), vincristina/doxorubicina/dexametasona (VAD), doxorubicina liposomal/vincristina, dexametasona (DVD), ciclofosfamida, etopósido/dexametasona/citarabina, cisplatino (EDAP)), trasplantes de células madre (p. ej., trasplante autólogo de células madre o el trasplante alogénico de células madre, y/o trasplante de células madre minialogénico (no mieloablativo)), esteroides (p. ej., corticosteroides, dexametasona, talidomida/dexametasona, prednisona, melfalán/prednisona), terapia de apoyo (p. ej., bifosfonatos, factores de crecimiento, antibióticos, inmunoglobulina intravenosa, radioterapia en dosis bajas y/o intervenciones ortopédicas), THALOMID (talidomida, Celgene), VELCADE (bortezomib, Millennium), y/o REVLIMID (lenalidomida) (Celgene Corporation) y/u otros tratamientos de mieloma múltiple incluyendo radioterapia.

Si un producto inuncojugado de la presente invención se administra combinado con agentes citotóxicos, se mantienen a menudo las dosis y los regímenes anteriores. Sin embargo, si se co-administran el producto inuncojugado y el agente citotóxico, se prefieren, en ciertas realizaciones, dosis bajas de cada uno de estos componentes terapéuticos. En tal situación, el producto inuncojugado se puede administrar a dosis de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>, incluyendo aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>, mientras que el agente citotóxico se administra a dosis que están por debajo de la recomendación cuando se administra solo, tal como a aproximadamente 80% a 20% de la dosis recomendada.

Los datos experimentales obtenidos en experimentos basados en cultivos celulares (Fig. 7) y con ratones (Fig. 8 a 11), se confirmó adicionalmente con experimentos que apoyaron adicionalmente estos hallazgos.

La patogénesis del mieloma múltiple implica la unión de células de mieloma, a través de moléculas de adherencia a la superficie celular, a células del estroma de la médula ósea (BMSC), así como a la matriz extracelular (ECM). Esta unión desencadena, y por lo tanto se puede hacer responsable en última instancia, del crecimiento de las células de mieloma múltiple, la resistencia a fármacos, y la migración de las células de MM en el medio de la médula ósea (Munshi et al. 2008). En particular, la adherencia de células de mieloma múltiple a ECM a través de sindecano-1 (CD138) a colágeno de tipo I, induce la expresión de la metaloproteínasa de matriz 1, promoviendo de este modo la resorción ósea y la invasión tumoral (Hideshima et al. 2007). Las interacciones entre las células de mieloma múltiple y el microentorno de la médula ósea da como resultado una activación de una cascada proliferativa pleiotrópica y anti-

apoptótica.

Después de la búsqueda de células de mieloma múltiple en el compartimiento del estroma de la médula ósea, la adherencia entre las células de mieloma múltiple y las BMSC regula al alza muchas citoquinas como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1), que tienen actividades promotoras del crecimiento angiogénico y tumoral (Hideshima et al. 2007). Las cascadas de señalización iniciadas por estas citoquinas dan como resultado en última instancia a resistencia de las células de MM a los agentes terapéuticos convencionales (Anderson et al. 2000; Hideshima et al., 2006).

La eficacia in vivo de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 contra las células tumorales positivas para CD138 en presencia de médula ósea humana se analizó en un modelo de ratón y los resultados de este análisis se muestran en la Fig. 12. La Figura muestra que tanto H1CL como U1CL funcionan bien en este entorno. El aumento en el nivel de shull-6R que se puede utilizar en este modelo como un parámetro del crecimiento celular del MM, fue suprimido por estos productos inmunoconjugados.

De acuerdo con la presente invención, el MM se trata como sigue, con el uso de BT062 como ejemplo. Este ejemplo no pretende limitar la presente invención en modo alguno, y un experto en la técnica podría determinar fácilmente otros sistemas basados en producto inmunoconjugado o nBT062 que están dentro del alcance de la presente invención y otros regímenes de tratamiento que podrían ser utilizados para el tratamiento de enfermedades tales como el MM.

Debido a la expresión selectiva de CD138 en las células de MM de pacientes sobre las células accesibles del torrente sanguíneo, la especificidad de nBT062 y la estabilidad de BT062 en el torrente sanguíneo, BT062 elimina la toxicidad sistémica de DM4 y proporciona la oportunidad de dirigir la administración de la molécula o moléculas efectoras de DM4 de forma homogénea. Los productos inmunoconjugados de esta invención proporcionan un medio para la administración eficaz de las moléculas efectoras a los sitios celulares donde las moléculas efectoras pueden ser liberadas de los productos inmunoconjugados. Esta entrega y liberación dirigidas proporcionan un avance significativo en el tratamiento del mieloma múltiple, para el que los métodos actuales de quimioterapia proporcionan a veces una remisión incompleta.

De acuerdo con la presente invención el mieloma múltiple también se trata como sigue: Uno o más agentes citotóxicos se administran a las dosis y formas de dosificación y de acuerdo con protocolos de tratamiento establecidos para estos agentes citotóxicos a un individuo que también se trata con un producto inmunoconjugado de la presente invención.

En particular, un paciente se somete a un régimen de tratamiento utilizando una dosificación oral de melfalán de acuerdo con las instrucciones del fabricante (p. ej., una píldora comercializada bajo la marca registrada ALKERAN) y una dosificación apropiada de BT062, por ejemplo, 100 mg/m<sup>2</sup> de acuerdo con la presente invención a ciertos intervalos, por ejemplo, al principio o al final de una sesión de tratamiento con melfalán, para complementar el efecto del tratamiento con melfalán.

De acuerdo con la presente invención, en particular los tumores sólidos también pueden ser tratados como sigue usando BT062 como ejemplo. Este ejemplo no pretende limitar la presente invención en modo alguno, y un experto en la técnica podría determinar fácilmente otros productos inmunoconjugados de la presente invención y otros regímenes de tratamiento que podrían ser utilizados para el tratamiento de tumores sólidos. El tumor se trata en primer lugar para reducir el tamaño del tumor, por ejemplo quimioterapéuticamente, p. ej., utilizando doxorubicina liposomal, o radiativamente. La administración posterior de BT062 de esta invención proporciona un medio muy eficaz para eliminar las células cancerosas residuales. La administración del producto inmunoconjugado permite la localización específica de estas células residuales y la liberación de las moléculas efectoras en el sitio diana. La alta eficacia del producto inmunoconjugado permite, en realizaciones preferidas, un solo régimen de dosificación. Esta liberación y entrega dirigidas proporcionan un avance significativo en el tratamiento de las células cancerosas residuales de tumores sólidos, para los que los métodos actuales de quimioterapia proporcionan a veces una remisión incompleta.

La presente invención se describe adicionalmente mediante la referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración. Se utilizan mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica o los mecanismos descritos específicamente a continuación.

## **Materiales y Métodos**

Construcción de anticuerpos quiméricos (cB-B4: nBT062)

*B-B4*



En estos experimentos se utilizó el anticuerpo B-B4 murino previamente caracterizado (Wijdenes et al., Br J Haematol., 94 (1996), 318).

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

Se realizaron técnicas de ADN recombinante convencionales como se describe con detalle en los libros de texto, por ejemplo en J. Sambrook; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 2ª Ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, o como recomiendan las instrucciones de los fabricantes en los casos en los que se utilizaron kits. La clonación mediante PCR y la modificación de las regiones variables de ratón se llevaron a cabo utilizando la metodología de PCR convencional. Se han utilizado los cebadores indicados en la respectiva sección de resultados.

#### Expresión de cB-B4/nBT062

Se cosecharon mediante tripsinización y centrifugación células COS que crecían exponencialmente, cultivadas en DMEM con un suplemento de FCS al 10%, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin y se lavaron en PBS. Las células se resuspendieron en PBS a una concentración final de  $1 \times 10^7$  células/ml. Se transfirieron 700 µl de suspensión de células COS a una cubeta Gene Pulser y se mezclaron con ADN del vector de expresión de las cadenas pesada y ligera kappa (10 µg de cada una o 13 µg de Suprvector). Las células se sometieron a electroporación a 1900 V, 25 µF utilizando un Bio-Rad Gene Pulser. Las células transformadas se cultivaron en DMEM con un suplemento de FBS libre de gamma-globulina al 10%, 580 µg/ml de L-glutamina, 50 Unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin durante 72 horas antes de cosechar los sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo.

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

#### Purificación de cB-B4/nBT062 a partir de sobrenadantes de cultivo celular

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

#### Unión a cB-B4 y análisis competitivo

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

#### Preparación de ARN y síntesis de ADNc

Se hicieron crecer células de hibridoma B-B4 utilizando el kit Qiagen Midi (Hilden, Alemania) para aislar ARN siguiendo el protocolo del fabricante. Se sometieron aproximadamente 5 µg de ARN de B-B4 a transcripción inversa para producir ADNc de B-B4 utilizando el kit de síntesis de la 1ª hebra de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### Clonación de ADNc de inmunoglobulina B-B4

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

Se seleccionaron bacterias *E. coli* TOP10 (Invitrogen) transformadas con los constructos del vector pCR2.1 ligado

sobre placas de agar LB-ampicilina-Xgal. Se inocularon cultivos a pequeña escala con colonias de color blanco individuales, desarrolladas durante la noche y los plásmidos se aislaron utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 5 *Determinación de la secuencia de ADNc*

Los plásmidos se secuenciaron utilizando BigDye Termination v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI, Foster City, CA). Cada plásmido seleccionado se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores 1210 y 1233 ciclados sobre una máquina de PCR GeneAmp9600. El análisis electrfórico de la secuencia se realizó sobre un secuenciador capilar ABI.

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

#### 15 *Secuencia de ADN Vk de B-B4*

Se realizó la síntesis de la 1ª hebra en tres reacciones independientes. Los productos de la PCR generados utilizando los cebadores MKC y MKV2 (secuencias proporcionadas más arriba) se ligaron en vectores pCR2.1-TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones de cada grupo independiente de reacciones de RT-PCR se secuenciaron en ambas direcciones. La secuencia del producto cebado con MKV2 fue muy similar a los transcritos kappa estériles que se originaban a partir del compañero de fusión de mieloma tal como MOPC-21, SP2 y Ag8 (Carroll et al., Mol Immunol., 25 (1988), 991; Cabilly et al., Gene, 40 (1985); 157) y por lo tanto se ignoraron.

Los productos de la PCR que utilizaban MKC con los cebadores MKV4 y MKV9 fueron similares entre sí y diferían solamente en las posiciones de bamboleo dentro del cebador de la secuencia líder.

#### *Secuencia de ADN VH de B-B4*

Se llevó a cabo la síntesis de la 1ª hebra en tres reacciones independientes y los productos de la PCR se clonaron y se secuenciaron a partir del producto de cada 1ª hebra. Se secuenciaron cinco clones a partir de cada 1ª hebra.

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

La construcción de los vectores de expresión quiméricos implica añadir una secuencia líder apropiada a VH y Vk, precedida por un sitio de restricción *Bam*HI y una secuencia de Kozak. La secuencia consenso Kozak es crucial para la traducción eficaz de una secuencia de la región variable. Define el codón AUG correcto a partir del cual un ribosoma puede comenzar la traducción, y la base individual más crítica es la adenina (o menos preferiblemente, una guanina) en posición -3, aguas arriba del inicio AUG. La secuencia líder se selecciona como la secuencia más similar de la base de datos de Kabat (Kabat *et al.*, NIH National Technical Information Service, 1991). Estas adiciones se codifican dentro de los cebadores directos (For) (ambos tienen la secuencia 5'-AGAGAAGCTTGCCGCCACCATGATT-GCCTCTGCTCAGTTCCTGGTCTCC-3' [SEQ ID NO: 9]; el sitio de restricción está subrayado; la secuencia de Kozak está en negrita). Además, la construcción de los vectores de expresión quiméricos implica la introducción de un fragmento 5' de la región constante gamma1 humana, hasta un sitio de restricción *Ap*al natural, contiguo al extremo 3' de la región J de B-B4 y, para la cadena ligera, la adición de un sitio donador de empalme y un sitio *Hind*III. La secuencia donadora de empalme es importante para el correcto anclaje en marco de la región variable a su región constante apropiada, empalmado de ese modo el intrón V:C. El intrón kappa + CK está codificado en el constructo de expresión aguas abajo de la secuencia B-B4 Vk. De un modo similar, gamma-4 CH es codificado en el constructo de expresión aguas abajo de la secuencia B-B4 VH.

Los genes B-B4 VH y Vk fueron analizados primero cuidadosamente para identificar cualquier sitio donador de empalme, sitio aceptor de empalme, secuencias de Kozak adecuadas y para determinar la presencia de cualquier sitio de restricción de subclonación extra que pudiera interferir más tarde en la subclonación y/o expresión del anticuerpo completo funcional. Se encontró un sitio *Hind*III no deseado en la secuencia Vk que se eliminó necesariamente mediante mutagénesis dirigida al sitio a través de PCR sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Para estas reacciones, se utilizaron los cebadores oligonucleotídicos BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEQ ID NO: 10] y BT04 (5'-CCACCGAACGTTCCGAGGGAGCTTACTACTGTTG-3') [SEQ ID NO: 11] y la mutagénesis se realizó de acuerdo con el protocolo del kit de Mutagénesis Quickchange de Stratagene (La Jolla, CA).

#### 60 *Cebadores de quimerización de la cadena kappa*

La secuencia líder de B-B4 Vk no ambigua, independiente de la secuencia del cebador de la PCR, se alineó con secuencias líder murinas en la base de datos de Kabat. El emparejamiento más próximo para el líder de B-B4 VH fue VK-10 ARS-A (Sanz *et al.*, PNAS, 84 (1987), 1085). Se prevé que esta secuencia líder se corte correctamente

por medio del algoritmo SignalP (Nielsen *et al.*, Protein Eng, 10 (1997); 1). Se diseñaron los cebadores CBB4Kfor (véase más arriba) y g2258 (5'-CGCGGGATCCACTCACGTTTGGATTCCAGCTTGCTGCCTCC-3' [SEQ ID NO: 12]; el Sitio de restricción está subrayado) para generar un producto de PCR que contuviera este líder completo, la región B-B4 V<sub>k</sub>, y los sitios de restricción terminales *Hind*III y *Bam*HI, para la clonación en el vector de expresión pKN100. El cebador directo, CBB4K introduce un sitio de restricción *Hind*III, un sitio de inicio de la traducción de Kozak y la secuencia líder VK-10 ARS-A. El cebador inverso g2258 introduce un sitio donador de empalme y un sitio de restricción *Bam*HI. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *Hind*III/*Bam*HI de pKN 100.

#### Cebadores de quimerización de la cadena pesada

La secuencia líder B-B4 VH no ambigua, independiente de la secuencia del cebador de la PCR, se alineó con secuencias líder murinas de la base de datos de Kabat. El emparejamiento más próximo para el líder B-B4 VK fue VH17-1A (Sun *et al.*, PNAS, 84 (1987), 214). Se prevé que esta secuencia líder se corte correctamente por medio del algoritmo SignalP. Los cebadores cBB4Hfor (véase más arriba) y g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGA-GACGGTGACTGAGTTCC-3' [SEQ ID NO: 13]; el Sitio de restricción está subrayado) se diseñaron para generar un producto de PCR que contuviera el líder VH17-1A, la región B-B4 VH, y los sitios de restricción *Hind*III y *Apal* terminales, para la clonación en el vector de expresión pG4D200. El cebador directo cBBHfor introduce un sitio de restricción *Hind*III, un sitio de inicio de la traducción de Kozak y la secuencia líder VH17-1A. El cebador inverso g22949 introduce el extremo 5' de la región gamma4 C y un sitio de restricción *Apal* natural. El fragmento resultante se clonó en los sitios de restricción *Hind*III/*Apal* de pG4D200, dando como resultado el vector pG4D200cBB4.

#### Producción de anticuerpo cBB4

Se descongeló un vial de células COS 7 y se hizo crecer en DMEM con un suplemento suero de clon I Fetal al 10% con antibióticos. Una semana más tarde, las células (0,7 ml a 10<sup>7</sup> células/ml) se sometieron a electroporación con pG4D200cBB4 mas pKN100cBB4 (10 µg de cada ADN) o sin ADN. Las células se cultivaron en placa en 8 ml de medio de crecimiento durante 4 días. La electroporación se repitió siete veces.

#### Detección de anticuerpo quimérico

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

#### Actividad de unión de cB-B4

Para analizar la actividad de unión de cB-B4 en los sobrenadantes de cultivo de COS 7, se utilizó el kit Diaclone sCD138, un ELISA sándwich en fase sólida. Un anticuerpo monoclonal específico para sCD138 se había aplicado como recubrimiento sobre los pocillos de las tiras de microtitulación proporcionadas. Durante la primera incubación, se incubaron simultáneamente sCD138 y el anticuerpo B-B4 biotinilado (bio-B-B4) con una serie de diluciones de anticuerpo de ensayo no marcado (B-B4 o cB-B4).

Las concentraciones de bio-B-B4 en este análisis se han reducido con el fin de obtener la competición con bajas concentraciones de anticuerpo no marcado (las concentraciones de cB-B4 en los sobrenadantes de cultivo de células COS 7 fueron por otra parte demasiado bajas para obtener suficiente competición). Los resultados de este análisis revelan que ambos anticuerpos tienen la misma especificidad para CD138 (datos no mostrados).

#### Purificación de cB-B4

Se purificó B-B4 quimérico a partir de los sobrenadantes de células COS 7 utilizando el kit Protein A ImmunoPure Plus (Pierce), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (datos no mostrados).

Determinación de K<sub>D</sub>: Comparación nBT062/BB4

#### Purificación de CD138 soluble

Se purificó el antígeno CD138 soluble del sobrenadante de cultivo celular U-266 mediante FPLC utilizando una columna de 1 mL "HiTrap NHS-activated HP" acoplada a B-B4. El sobrenadante de cultivo celular se cargó en tampón PBS pH 7,4 sobre la columna y más tarde sobre antígeno CD138 se hizo eluir con trietilamina 50 mM pH 11 en fracciones de 2 mL. El CD138 eluido se neutralizó inmediatamente con 375 µL de Tris-HCl 1M, pH 3 para prevenir daños estructurales y/o funcionales.

#### Biotinilación de CD138

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

5 Para la biotilación de CD138, se sometieron a eliminación de las sales 50 µl de CD138 utilizando columnas de centrifugación para la eliminación de las sales de las proteínas (Pierce). El reactivo de biotilación (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) se disolvió en H<sub>2</sub>O desionizada enfriada con hielo a una concentración final de 0,5 mg/mL. Se mezclaron el reactivo de biotilación y la solución con reactivo de captura, habiendo un exceso molar de 12 veces de reactivo de biotilación en comparación con el reactivo de captura (50 pmoles de CD138 con respecto a 600 pmoles de reactivo de biotilación) y se incubaron durante 1 h a la temperatura ambiente mientras se sacudía el vial suavemente. El reactivo de biotilación no unido se eliminó utilizando columnas para la eliminación de las sales de las proteínas.

15 *Inmovilización de bCD138*

El chip sensor (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) utilizado en el análisis BIACORE se diseña ara para unir moléculas biotiladas para el análisis de interacción en sistemas BIACORE. La superficie consiste en una matriz de dextrano carboximetilado pre-inmovilizada con estreptavidina y lista para la captura de alta afinidad de ligandos biotilados. La inmovilización de bCD138 se realizó sobre SENSOR CHIP SA utilizando una velocidad de flujo de 10 µL/min mediante inyección manual. La superficie del chip se acondicionó con tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1 M en NaOH 50 mM. A continuación se inyectó CD138 biotilado durante 1 minuto.

20 *Determinación de la K<sub>D</sub> de diferentes anticuerpos utilizando BIACORE*

25 El soporte lógico de BIACORE C utiliza marcas pre-definidas, denominadas "Wizards" para diferentes experimentos en los que solamente se pueden cambiar ciertos ajustes. Puesto que BIACORE C se desarrolló originalmente para medir concentraciones, no hay ningún asistente diseñado para llevar a cabo mediciones de afinidad. Sin embargo, con los ajustes adecuados, se podría utilizar el asistente para la "unión no específica" para medir las constantes de la tasa de afinidad y por lo tanto se utilizó para la determinación de K<sub>D</sub>. Con este asistente, se midieron dos células de flujo y la fase de disociación se ajustó a 90 s realizando la "Regeneración 1" con tampón de migración de BIACORE. La "Regeneración 2" que es equivalente a la regeneración real se llevó a cabo con Glicina-HCl 10 mM pH 2,5. Después de esta etapa, el ligando CD138 estaba en su estado competente de nuevo. Durante todo el procedimiento se utilizó HBS-EP como tampón de migración y dilución. Para determinar la unión de los diferentes anticuerpos (-150 kDa) a CD138, se analizaron la asociación y disociación a diferentes concentraciones (100, 50, 25 30 12,5, 6,25 y 3,13 nM). Las constantes de disociación en equilibrio se determinaron calculando las constantes de velocidad ka y kd. Después de eso, se calcularon los valores K<sub>D</sub> de los analitos por medio del cociente de kd y ka con el soporte lógico BIAevaluation. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

35 40 Tabla 4: Análisis comparativo de valores de K<sub>D</sub> de nBT062 y B-B4. Las desviaciones típicas se proporcionan para los valores de K<sub>D</sub> medios.

Anticuerpo	Afinidad	
	K <sub>D</sub> (nM)	media K <sub>D</sub> (nM)
nBT062	1,4	<b>1,4 +/- 0,06</b>
	1,4	
	1,5	
B-B4	1,7	<b>1,6 +/- 0,06</b>
	1,7	
	1,6	
nBT062-SPDB-DM4	1,9	<b>1,9 +/- 0,00</b>
	1,9	
	1,9	
B-B4-SPP-DM1	2,6	<b>2,6 +/- 0,06</b>
	2,7	
	2,6	

se calcularon los valores de  $K_D$  medios a partir de tres experimentos independientes. Los resultados demuestran que en todas las mediciones nBT062 muestra valores de  $K_D$  ligeramente menores en comparación con B-B4 (los valores de  $K_D$  medios fueron 1,4 y 1,6 nM, respectivamente).

## 5 Preparación de Productos Inmunoconjugados

### *nBT062-DM1 y huC242-DM1*

10 Se sintetizó el maitansinoide que contiene tiol DM1 a partir del producto de la fermentación microbiana ansamitocina P-3, como ha descrito previamente Chari (Chari et al., Cancer Res. 1 (1992), 127). la preparación de C242 humanizado (huC242) (Roguska et al., PNAS, 91 (1994), 969) ha sido descrita previamente. Se prepararon productos conjugados de anticuerpo-fármaco como se ha descrito previamente (Liu et al., PNAS, 93 (1996), 8618). Se conectaron una media de 3,5 moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo.

### 15 *nBT062-DM4*

BT062 es un producto conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el fármaco maitansinoide citotóxico, DM4, conectado a través de enlaces disulfuro por medio de un conector al anticuerpo monoclonal quimerizado nBT062. Los maitansinoides son anti-mitóticos que inhiben la polimerización de tubulina y el ensamblaje de microtúbulos (Remillard et al., Science 189 (1977), 1002). En las FIGS. 1 y 2 se muestran representaciones químicas y esquemáticas de BT062 (nBT062-DM4).

### *Síntesis de DM4*

25 El DM4 se prepara a partir del derivado bien conocido maitansinol (Kupchan et al., J. Med. Chem., 21 (1978), 31). El maitansinol se prepara mediante escisión reductiva del radical éster del producto de fermentación microbiana, ansamitocina P3, con hidruro de litio-trimetoxialuminio (véase la FIG. 3).

30 El DM4 se sintetiza mediante acilación del maitansinol con N-metil-N-(4-metildiopentanoil)-L-alanina (cadena lateral DM4) en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de cinc para dar el maitansinoide que contiene disulfuro DM4-SMe. El DM4-SMe se reduce con ditiotreitól (DTT) para dar el maitansinoide que contiene tiol deseado DM4 (véase la FIG. 4 para el diagrama de flujo del procedimiento de DM4).

### *Producto inmunoconjugado BT062*

35 El procedimiento para la preparación de nBT062-DM4 se esboza en la FIG. 5. El anticuerpo nBT062 se modifica con 4-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo (conector SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El DM4 se mezcla con el anticuerpo modificado a una concentración en exceso de los equivalentes de grupos ditiopiridilo. El producto conjugado de BT062 se forma por medio de una reacción de intercambio de disulfuro entre el grupo tiol de DM4 y los grupos ditiopiridilo introducidos en el anticuerpo a través del conector. La purificación mediante cromatografía y diafiltración elimina los reaccionantes de bajo peso molecular (DM4) y los productos de reacción (tiopiridina), así como los productos agregados de anticuerpo conjugado, para producir la sustancia farmacológica a granel.

## 45 Análisis FACS y análisis de citotoxicidad WST

### *Análisis FACS*

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

### *Análisis de viabilidad celular*

55 Las células MOLP-8 CD138<sup>+</sup> se sembraron en placas de fondo plano a 3000 células/pocillo. Se sembraron células de control CD138-BJAB a 1000 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 5 días. Se añadió reactivo WST (sal de tetrazolio soluble en agua, ROCHE) con el fin de medir la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). El reactivo se incubó durante 7,5 h sobre células MOLP-8 y durante 2 h sobre células BJAB. La fracción de células supervivientes se calculó basándose en las densidades ópticas medidas en un lector de microplaca utilizando procedimientos convencionales.

### *Discusión*

La unión de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 o nBT062 se analizó mediante FACS. Se incubaron OPM-2 CD138<sup>+</sup> como células diana con nBT062 o productos inmunoconjugados y se detectaron las moléculas unidas a las células utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. En la FIG. 6, se traza la fluorescencia media como medida de la cantidad de anticuerpo unido a la célula frente a diferentes concentraciones de anticuerpo o de producto conjugado. Los resultados demuestran, que nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 muestran características de unión muy similares. Además, los resultados sugieren con fuerza que las características de unión del anticuerpo no conjugado no se ven afectadas por las toxinas conjugadas.

En los análisis de viabilidad celular, se analizó la actividad citotóxica del anticuerpo contra células diana MOLP-8 CD138<sup>+</sup> y contra células de control de linfoblastoma B BJAB CD138<sup>-</sup>. Ambas líneas celulares se sembraron en placas de fondo plano y se incubaron con concentraciones crecientes de los productos inmunoconjugados. Se utilizó anticuerpo no conjugado como control. La actividad citotóxica se analizó cinco días después de la adición de los productos inmunoconjugados utilizando reactivo WST con el fin de medir la viabilidad celular. En la FIG. 7 (A)-(C), se traza la fracción de células supervivientes con respecto a células de control tratadas con vehículo de control frente a concentraciones crecientes de producto inmunoconjugado. Los resultados demuestran que la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SMCC-DM1 contra las células MOLP-8 es muy similar. Como se esperaba, las células de control BJAB CD138<sup>-</sup> no fueron destruidas por los productos inmunoconjugados, indicando que todos los productos inmunoconjugados actúan a través de la unión específica a CD138. En los experimentos de competición, las células MOLP-8 fueron pre-incubadas con un exceso molar de nBT062 no conjugado. La preincubación bloqueó sustancialmente la citotoxicidad de nBT062-SPDB-DM4, proporcionando una evidencia adicional de que los productos inmunoconjugados destruyen las células a través de la unión específica a CD138 sobre la superficie celular (FIG. 7 (D)).

Experimentos de ratón con xenoinjerto

Para evaluar la importancia del direccionamiento a CD138 sobre la actividad anti-tumoral de los productos conjugados anticuerpo-maitansinoide de una versión química humana del anticuerpo B-B4, nBT062, se realizaron experimentos en ratones con xenoinjertos. Se prepararon dos versiones de productos conjugados de nBT062-maitansinoide que podían diferir en la estabilidad química de sus enlaces disulfuro (nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4). La actividad anti-tumoral de estos productos conjugados de anticuerpo-fármaco se comparó con la actividad del producto conjugado B-B4-SPP-DM1 (que comprende el anticuerpo parental murino), así como maitansinoide libre no conjugado (DM4), anticuerpo nBT062 no modificado nativo, y un producto conjugado de IgG1-maitansinoide no direccionado (irrelevante). Los productos conjugados se evaluaron en un modelo de xenoinjerto CD138-positivo (MOLP-8) de mieloma múltiple humano en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

En estos ratones, se establecieron tumores subcutáneos (ratones SCID CB.17 hembra) mediante inoculación con suspensiones de células MOLP-8. El tratamiento con una única inyección intravenosa en embolada se llevó a cabo cuando los volúmenes tumorales alcanzaron una media de 113 mm<sup>3</sup>. Los cambios en el volumen tumoral y el peso corporal se registraron dos veces por semana. Los experimentos se llevaron a cabo a lo largo de 68 días después de la inoculación de las células tumorales.

*Experimentos con ratones con xenoinjertos A*

*Ratones*

Se obtuvieron ratones SCID CB.17 hembra, cinco semanas de edad, de Charles River Laboratories.

*Líneas de células tumorales humanas*

Se suministró MOLP-8, una línea celular de mieloma múltiple humano de la ATCC. Las células MOLP-8, que expresan el antígeno CD138 sobre su superficie celular y desarrollan tumores por xenoinjerto en ratones SCID, se mantuvieron en medio RPMI-1640 con un suplemento de L-glutamina 4 mM (Biowhittaker, Walkersville, MD), suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Logan, Utah) y estreptomycin al 1%, a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>.

PARTE I

*Crecimiento tumoral en ratones*

A cada ratón se le inocularon subcutáneamente  $1 \times 10^7$  células MOLP-8 en la zona bajo el hombro derecho. El volumen total fue de 0,2 ml por ratón, donde la razón de medio libre de suero con respecto a matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) fue de 1/1 (v/v). Antes del tratamiento, los tumores por xenoinjerto se verificaron diariamente y se permitió que se establecieran. El volumen del tumor alcanzó aproximadamente 113 mm<sup>3</sup> alrededor de 11 días después de la inoculación de las células tumorales. La tasa de aceptación del tumor de los ratones CB.17

SCID fue del 100%.

Once días después de la inoculación de las células tumorales, se seleccionaron 42 ratones basándose en los volúmenes de los tumores y los pesos corporales. El volumen del tumor estuvo en el intervalo de 68,2 a 135,9 mm<sup>3</sup>. Los cuarenta y dos ratones se dividieron al azar en siete grupos (A-G) de seis animales cada uno basándose en el volumen del tumor.

Cada uno de los seis ratones del Grupo A recibió 200 µl de PBS como vehículo de control. Cada ratón del grupo B recibió 13,8 mg/kg de anticuerpo puro nBT062. Esta dosis es equivalente a la cantidad de componente de anticuerpo nBT062 en 250 µg/kg de maitansinoide unido. La razón de pesos moleculares de maitansinoides con respecto a anticuerpo nBT062 en una molécula de producto conjugado es de aproximadamente 1/55. Cada ratón del 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 intravenosamente en forma de una única inyección intravenosa en embolada a través de la vena lateral de la cola con una jeringa de 1 ml equipada con una aguja de calibre 27, ½ pulgada. Antes de la administración, las soluciones de partida de anticuerpo nBT062, nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se diluyeron con PBS estéril a concentraciones de 2 mg/ml, 28,1 µg/ml y 28,1 µg/ml, respectivamente, de manera que el volumen inyectado para cada ratón estuvo entre 120 y 220 µl.

## PARTE II

En un segundo grupo de experimentos, se inyectaron subcutáneamente células MOLP-8 (1.5x10<sup>7</sup> células por ratón), suspendidas en una mezcla 50:50 de medio libre de suero y matrigel en la zona bajo el hombro derecho en 100 µl. Los volúmenes de los tumores alcanzaron aproximadamente 80 mm<sup>3</sup> el día 11 y la media de los controles fue de aproximadamente 750 mm<sup>3</sup> el día 25, después de la inoculación de las células. Se estimó que el tiempo de duplicación del tumor era de 4,58 días. Cada ratón del grupo de control (n=6) recibió 0,2 ml de PBS estéril administrado en la vena lateral de la cola (i.v.) en una inyección intravenosa en embolada. Todas las dosis de tratamiento se basaron en maitansinoide conjugado. Se trataron nueve grupos (n=6) con una única inyección intravenosa de nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4, o nBT062-SPP-DM1, cada uno a dosis de 450, 250 y 100 µg/kg. Un grupo adicional (n=6) recibió 250 µg/kg de nBT062-SMCC-DM1 en una dosificación repetida (semanalmente durante cinco semanas). Los ratones se asignaron al azar a once grupos (n=6) por el volumen tumoral utilizando el LabCat Program. Los volúmenes de los tumores oscilaron entre 40,0 y 152,5 mm<sup>3</sup>. Los ratones recibieron dosis basándose en el peso corporal individual.

El tamaño del tumor se midió dos veces por semana en tres dimensiones utilizando el LabCat System (Tumor Measurement and Tracking, Innovative Programming Associated, Inc., Princeton, NJ). El volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó utilizando la metodología descrita en Tomayko et al., Cancer Chemother. Pharmacol, 24 (1989), 148:

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

El Log<sub>10</sub> de la destrucción celular se calculó con la fórmula descrita por Bissery et al., 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 en días requerido para que los tumores del grupo de tratamiento (T) y el grupo de control (C), alcancen un tamaño predeterminado (600 mm<sup>3</sup>). T<sub>d</sub> es el tiempo de duplicación del tumor, basándose en el volumen tumoral medio de los ratones de control, y 3,32 es el número de duplicaciones celulares por log del crecimiento celular.

### Resultados

El crecimiento tumoral en los ratones individuales se muestra en las FIGS. 8 y 9. El crecimiento tumoral medio (+/- DT) para cada grupo se muestra en la FIG. 10.

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

Los tres productos conjugados que se dirigen a CD138, nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 y nBT062-SPP-DM1, a una dosis de 250 µg/kg causaron un marcado retraso en el crecimiento del tumor. Basándose en los volúmenes tumorales medios medidos en los grupos de tratamiento, el producto conjugado con DM4 nBT062-SPDB-DM4 fue el más activo, mientras el producto conjugado nBT062-SPP-DM1 mostró una actividad ligeramente incrementada en comparación con su contraparte murina B-B4-SPP-DM1 (FIG. 10). Los resultados obtenidos en ratones individuales

mostraron además que la actividad anti-tumoral obtenida con B-B4-SPP-DM1 es más heterogénea y por lo tanto menos predecible que la medida en ratones tratados con nBT062-SPP-DM1. En términos de homogeneidad de la actividad anti-tumoral, el otro producto conjugado que utiliza nBT062 como anticuerpo de direccionamiento nBT062-SPDB-DM4 se comportó de un modo similar a nBT062-SPP-DM1.

No se observó ninguna reducción del peso corporal en ningún grupo de tratamiento sugiriendo que los tratamientos eran bien tolerados.

#### *Discusión*

Los resultados del análisis de los tres productos conjugados dirigidos a CD138 en animales experimentales demuestran la importancia de la liberación dirigida para la actividad anti-tumoral. Si bien los productos conjugados con maitansinoide de los anticuerpos nBT062 quimérico humano y B-B4 murino muestran una actividad significativa medida por el log de la destrucción celular, no hubo un impacto significativo sobre el crecimiento del tumor a partir del tratamiento con DM4 no conjugado, anticuerpo huBT062 nativo no modificado, o producto conjugado de direccionamiento de control (huC242-DM4).

El producto inmunoconjugado preparado a partir del anticuerpo quimérico humano, nBT062-SPP-DM1, proporcionó una actividad anti-tumoral ligeramente superior que el producto conjugado preparado a partir de su contraparte murina, B-B4-SPP-DM1. Además, el tratamiento con nBT062-SPP-DM1 y nBT062-SPDB-DM4 dio como resultado respuestas más homogéneas en ratones individuales en comparación con el tratamiento con B-B4-SPP-DM1. La elevada variación de unión de B-B4-SPP-DM1 explicó que la medición del volumen tumoral medio (+/- DT) de xenoinjertos de mieloma múltiple humano MOLP-8 en ratones SCID CB.17 a lo largo del tiempo (días) después de la inoculación realmente proporcionara resultados relativamente mejores para B-B4-SPP-DM1 que para nBT062-SPP-DM1 (datos no mostrados). Esta característica de los productos inmunoconjugados que utilizan nBT062 como anticuerpo de direccionamiento parece ser especialmente beneficiosa para el uso terapéutico de los productos conjugados.

Por último, el más potente de los productos conjugados de maitansinoides, después de la administración iv única en los modelos de xenoinjerto de MOLP-8 en ratones SCID, fue nBT062-SPDB-DM4.

#### *Destrucción por vecindad (análisis de viabilidad celular)*

Se sembraron células OPM2 CD138<sup>+</sup> y células Namalwa CD138<sup>+</sup> en placas de fondo redondo o bien en pocillos separados o bien en cultivo simultáneo. Las células se trataron con nBT062-SPDB-DM4 a concentraciones que oscilaban  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  M. La fracción de células viables se detectó utilizando reactivo WST (sal de tetrazolio soluble en agua, ROCHE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ROCHE). La fracción de células supervivientes se calculó basándose en las densidades ópticas medidas en un lector de microplaca utilizando procedimientos convencionales.

#### *Discusión*

La destrucción por vecindad de las células no diana en íntima proximidad (presentes en los pocillos de fondo redondo) con las células de mieloma múltiple tras el tratamiento con nBT062-SPDB-DM4 se analizó en un estudio in vitro en el que se cultivaron células OPM2 positivas para CD138 en cultivo simultáneo con células Namalwa negativas para CD138 (FIG. 13). En general, si bien las células positivas para CD138 son destruidas eficazmente por nBT062-SPDB-DM4, las células negativas para CD138 no resultaban afectadas por el producto conjugado. En el cultivo simultáneo en pocillos de fondo redondo, sin embargo, nBT062-SPDB-DM4 también destruyó las células negativas para el antígeno en íntima proximidad con las células positivas para el antígeno (un efecto que a menudo es referido como destrucción por vecindad). Kovtun et al. (2006) comentaron que la destrucción por vecindad mediada por productos conjugados con maitansinoides se produce solamente en íntima proximidad con células positivas para el antígeno. Kovtun et al. (2006), también comentan la importancia del conector del producto inmunoconjugado. In vivo, la destrucción por vecindad puede contribuir a 1) la erradicación de células tumorales que expresan heterogéneamente CD138, 2) la destrucción del microentorno tumoral por medio de la destrucción de células del estroma tumorales, y 3) la prevención de la selección de células resistentes a nBT062-SPDB-DM4 negativas para CD138.

El efecto de vecindad tiene una particular importancia si la actividad de un producto conjugado es deteriorada por un antígeno diana que es expresado en tumores de una manera heterogénea. Si este es el caso, una célula concreta de un tumor expresa, si lo hace, el antígeno en una cantidad que no permitiría el direccionamiento eficaz y la destrucción de dicha célula por el respectivo producto inmunoconjugado. La eficacia anti-tumoral de nBT062-SPDB-DM4 sobre células negativas para CD138 en cultivo simultáneo con células positivas para CD138 aclararía que la presencia de las células diana incluye, en las circunstancias apropiadas, en la actividad citotóxica de nBT062-SPDB-DM4 hacia células no diana.



*Experimentos con ratones con xenoinjertos B*

En este grupo de experimentos, se inocularon en ochenta y cinco ratones células MOLP-8 ( $1,5 \times 10^7$  células/ratón) subcutáneamente en el hombro derecho. La tasa de aceptación del tumor fue del 100%. Sesenta y seis ratones SCID que portaban tumores MOLP-8 voluminosos con un volumen tumoral medio de aproximadamente  $80 \text{ mm}^3$  se asignaron al azar a once grupos de tratamiento ( $n=6$ ). Los ratones se trataron con una única dosis de uno de los tres productos conjugados (nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1). Un grupo adicional recibió cinco dosis semanales de nBT062-SMCC-DM1 y un grupo de control recibió una única dosis de PBS. Los volúmenes tumorales medios se muestran en la FIG. 11A. Se estableció una respuesta a la dosis para cada producto conjugado. Se alcanzó un volumen tumoral medio de  $750 \text{ mm}^3$  en los animales tratados con PBS el día 25. El tiempo de duplicación del tumor determinado mediante el mejor ajuste de la curva de regresión lineal sobre un gráfico log-lineal del crecimiento tumoral de control fue de 4,58 días. Los animales tratados con nBT062-SPDB-DM4 a  $450 \mu\text{g}/\text{kg}$  tuvieron el log de destrucción celular más alto ( $\text{LCK}=2,89$ ), seguido de los animales tratados con nBT062-SMCC-DM1 a una dosificación de  $250 \mu\text{g}/\text{kg}$  semanales ( $\text{LCK}=2,1$ ; véase la Tabla 5). la comparación de las curvas de crecimiento tumoral medio para los grupos de tratamiento mediante mediciones ANOVA repetidas que realizaba el Test de Comparación Múltiple de Dunnett mostró una diferencia significativa entre el grupo de control con PBS y  $450 \mu\text{g}/\text{kg}$  de nBT062-SPDB-DM4 ( $p<0,01$ ),  $250 \mu\text{g}/\text{kg}$  de nBT062-SPDB-DM4 ( $p<0,05$ ) y cinco dosis semanales de  $250 \mu\text{g}/\text{kg}$  nBT062-SMCC-DM1 ( $p<0,05$ ). No se produjo ninguna regresión parcial o completa 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 después de la inoculación.

**Tabla 5.** Valores de Log destrucción celular (LCK) medidos para la actividad anti-tumoral de diferentes productos conjugados con nBT062-DMx en diferentes programas de dosificación. Remitirse a la sección de Materiales y métodos para la información sobre el cálculo de los valores de LCK.

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

*Eficacia In vivo* de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 en el entorno de la médula ósea

*Preparación de ratones SCID que tienen implantes de hueso fetal humano*

Se implantaron huesos largos fetales humanos (pedacitos de hueso fetal humano) en la parte superior del cuerpo de ratones SCID CB17 (SCID-hu) como se ha descrito previamente (Urashima et al., 1997) y de este modo se proporcionó un modelo en ratón de búsqueda de células de MM humanas con respecto a células de BM humanas.

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

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

Los ratones desarrollaron shuLL-6R en suero medible aproximadamente 4 semanas después de la inyección de células INA-6 y a continuación recibieron  $0,176 \text{ mg}$  de producto conjugado o vehículo de control a través de una inyección en la vena de la cola semanalmente durante 7 semanas. Después de cada tratamiento, se recogieron muestras de sangre y se midieron los niveles de shuLL-6R por medio de un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se representan en la Fig. 12.

*Discusión*

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

De este modo, los ratones sCID-hu/INA-6 proporcionan un modelo para células de mieloma múltiple que crecen en su entorno de médula ósea normal. Las células tumorales de este modelo, que interactúan directamente con la médula ósea humana, se parece mucho a la situación en pacientes, en los que el crecimiento de las células tumorales también está promovido por la presencia de células estromales. Puesto que las células INA-6 liberan receptor de interleuquina-6 humana soluble (shuLL-6R), se pueden utilizar las concentraciones en suero de esta proteína como medida de la carga de células tumorales en estos ratones. La potencia *in vivo* de nBT062-SPDB-DM4 y nBT062-SPP-DM1 se sometió a ensayo en este entorno.

El tratamiento de ratones SCIDhu/INA-6 con administraciones i.v. semanales de nBT062-SPDB-DM4 o nBT062-SPP-DM1 durante siete semanas indujo una regresión eficaz del tumor, detectada por un descenso en los niveles de shuLL-6R en suero con respecto al control, indicando una buena eficacia de los productos conjugados incluso en el entorno de médula ósea humana, que refleja la situación relevante en pacientes (Fig. 12).

Se apreciará que los métodos y composiciones de la presente invención se pueden incorporar en forma de una variedad de realizaciones, de las cuales solamente unas pocas se describen en la presente memoria. De este modo, las realizaciones descritas son ilustrativas.

**Bibliografía**

- Akkinä RK, Rosenblatt JD, Campbell AG, Chen IS, Zack JA. Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1994; 84:1393-1398.
- Armour KL, Clark MR, Hadley AG, et al. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*. 1999; 29(8):2613-24.
- Anderson KC, Kyle RA, Dalton WS, Landowski T, Shain K, Jove R, Hazlehurst L, Berenson J. Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. *Hematology 2000*; 147-165.
- Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. Jun 2001; 32(3):297-305.
- Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 1 Aug 2003; 98(3):474-83.
- 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. Revisión.
- 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.
- Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96, 1898-1903.
- Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett*. 1977; 75:159-162.
- 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*. 1 Mar 2006;107(5):2079-89. Publicación electrónica 8 Nov 2005.
- Blättler WA and Chari RVJ. Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs. En: Ojima, I., Vite, G.D. y Altmann, K.-H., Editors, 2001. *Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, págs. 317-338.
- Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:1490-1496.
- Carbone A, Gaidano G, Ghoghini 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.
- 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 and Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res.* 1995; 55: 4079-4084.
- 5 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 [Publicación electrónica antes de impresión]
- 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.
- 10 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.
- Clement C, Vooijs, W.C., Klein, B., y Wijdenes, J. En: al. SFSe, ed. *J. Leukocyte Typing V.* Oxford: Oxford University Press; 1995: 714-715.
- 15 Couturier O, Faivre-Chauvet A; Filippovich IV; Thedrez P, Saï-Maurel C; Bardiés 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 Supl.) (Oct 1999) 3165s-3170s.
- Davies EJ et al. , Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer *Clin Cancer Res.* 2004; 10(15):5178-86.
- 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.
- Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 1998; 426:67-70.
- 25 Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol.* 2001; 41:1206-1214.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia.* 1999; 1:303-310.
- 30 Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol.* 1999; 104:152-162.
- Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upeslakis J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem.* 2002; 13:40-46.
- 35 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.
- Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006; 107(10):4053-62.
- 40 Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8):585-98.
- Horvathova M, Gaillard, J.-P., Liutard, J., Duperray, C., Lavabre-Bertrand, T., Bourquard, P et al. En: al. SFSe, ed. *Leukocyte Typing V.* Oxford: Oxford University Press; 1995: 713-714.
- 45 Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, Xie H, Ruberti MF, Phinney SJ, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Res* 2006; 66 (6):3214-21.
- Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. 2001. *J. Immunol. Methods* 254, págs. 67-84.
- 50 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.
- 55 Kyoizumi S, Murray LJ, Namikawa R. Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse. *Blood.* 1993; 81:1479-1488.
- Langford JK, Stanley MJ, Cao D, Sanderson RD. Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function. *J Biol Chem.* 6 Nov 1998; 273(45):29965-71.
- 60 Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blättler 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.
- 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.
- 5 Munshi NC, Longo DL, Anderson KC. Plasma cell disorders. En: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p. 700-7.
- Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice. *Blood*. 1993; 82:2526-2536.
- 10 O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:254-263.
- Ojima I, Geng X, Wu X, Qu C, Borella CP, Xie H, Wilhelm SD, Leece BA, Bartle LM, Goldmacher VS and Chari RV. Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates. 2002. *J. Med. Chem.* 45, págs. 5620-5623.
- 15 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.
- 20 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, págs. 2659-2671.
- 25 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997; 97:46-55.
- Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science*. 1975; 189:1002-1005.
- 30 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.
- 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 Mayo 2002; 62(9):2546-53.
- 35 Ross JS, Gray K, Gray G, Worland PJ, Rolfe M. *Anticancer Antibodies*, *Am J Clin Path.* (4/17/2003).
- Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989; 1:27-35.
- 40 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.
- 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.
- 45 Schuurman J, Van Ree R, G. J. Perdok GJ, Van Doorn HR, Tan KY, Aalberse RC, Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites, *Immunology* 1999; 97:693-698.
- Sebestyen A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*. 1999; 104(2):412-9.
- 50 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.
- 55 Senter PD, Doronina S, Cerveny C, Chace D, Francisco J, Klussman K, Mendelsohn B, Meyer D, Siegall CB, Thompson J et al. (2002). Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates. Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.), 414.
- 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 RIIL, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001; 276(9):6591-604.
- 60 Sievers EL, Larson R.A., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L. et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. 2001. *J. Clin. Oncol.* 19, págs. 3244-3254.

- Sievers EL and Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. 2001. *Curr. Opin. Oncol.* 13, págs. 522-527.
- Smith R., Single chain antibody variable region fragments; [www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html](http://www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html) (última actualización en Mayo, 2001).
- 5 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.
- Tai YT, Li XF, Catley L, Coffey R, Breikreutz I, Bae J, Song W, Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Treon SP, Grewal IS, Munshi NC, Anderson KC. Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications. *Cancer Res.* 15 Dic 2005; 65(24):11712-20.
- 10 Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shammas 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), págs. 3688-3696.
- 15 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.
- 20 Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dederda DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood.* 1997; 90:754-765.
- Vogel CW. Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties. *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods.* 2004; 283:087-108.
- 25 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.
- Ward, E.S., D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, y G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 1989. 341:544-546.
- 30 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.
- 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.
- 35 Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138, *J Biol Regul Homeost Agents.* Abr-Jun 2002; 16(2):152-5.
- 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.* 40 Mar 2004; 308(3):1073-82.
- 40 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.
- 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.
- 45 Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodaysky 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.* 15 Sep 2007; 110(6):2041-8. Publicación electrónica 29 Mayo 2007.
- 50 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.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biotest AG  
 ImmunoGen, Inc.  
 5 <120> PRODUCTOS INMUNOCONJUGADOS DIRIGIDOS A CD138 Y USOS DE LOS MISMOS  
 <130> 319935.WO/JND/CJS  
 <150> 61/016.620 <151> 2007-12-26  
 10 <150> 61/087.466 <151> 2008-08-08  
 <150> 61/087.590 <151> 2008-08-08  
 <160> 13  
 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de Aminoácidos (pronosticada) de la cadena pesada del anticuerpo humano/ratón quimérico  
 25 <220>  
 <221> CDR1  
 <222> (31)..(35)  
 30 <220>  
 <221> CDR2  
 <222> (51)..(68)  
 <220>  
 35 <221> CDR3  
 <222> (99) .. (111)  
 <220>  
 <221> región IgG4  
 40 <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

ES 2 526 433 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
 210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

# ES 2 526 433 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de Aminoácidos (pronosticada) de la cadena ligera del anticuerpo humano/ratón quimérico

<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 2 526 433 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

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador para IgH MHV7

<400> 3

atgggcatca agatggagtc acagaccag g 31

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador para la región constante de IgG1 MHCG1  
 10 <400> 4  
 cagtggatag acagatgggg g 21  
 <210> 5  
 <211> 30  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador para Ig kappa MKV2  
 <400> 5  
 atggagacag acacactcct gctatgggtg 30  
 25 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador para Ig kappa MKV4  
 <400> 6  
 35 atgagggccc ctgctcagtt ttttgcttc ttg 33  
 <210> 7  
 <211> 25  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Cebador para Ig kappa MKV9  
 <400> 7  
 atggatcca cacctcagtt ccttg 25  
 50 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador MKC  
 <400> 8  
 60 actggatggt gggaagatgg 20  
 <210> 9  
 <211> 50  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>

5 <223> Cebador directo (For)  
 <400> 9  
 agagaagctt gccgccacca tgattgcctc tgctcagttc ctggtctcc 50

10 <210> 10  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico BT03  
 <400> 10  
 20 caacagtata gtaagctccc tcggacgttc ggtgg 35  
 <210> 11  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico BT04  
 30 <400> 11  
 ccaccgaacg tccgaggag ctactatac tgttg 35  
 <210> 12  
 35 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Cebador g2258  
 <400> 12  
 45 cgcgggatcc actcacgtt gattccagc ttggtgcctc c 41  
 <210> 13  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador g22949  
 55 <400> 13  
 cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttcc 45

60

## REIVINDICACIONES

1. Un producto inmunoconjugado capaz de dirigirse a células que expresan CD138 que comprende:
- 5 (a) un anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente contra CD138 que comprende:  
 (i) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende los residuos de aminoácido 31 a 35 (CDR1), 51 a 68 (CDR2) y 99 a 111 (CDR3) del SEQ ID NO: 1, y  
 (ii) una cadena ligera que comprende una región variable que comprende los residuos de aminoácido 24 a 34 (CDR1), 50 a 56 (CDR2) y 89 a 97 (CDR3) del SEQ ID NO: 2; y
- 10 (b) una molécula efectora para inducir la muerte celular,  
 en donde una región constante de dicha cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de isotipo IgG4.
- 15 2. El producto inmunoconjugado de la reivindicación 1, en donde dicha molécula efectora está anclada a dicho anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente a través de un conector, y preferiblemente dicho conector es un conector escindible, muy preferiblemente que comprende un enlace disulfuro.
- 20 3. El producto inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:  
 - dicho producto inmunoconjugado tiene un valor de  $K_D$  de menos de 2,6 nM.
- 25 4. El producto inmunoconjugado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la molécula efectora es al menos un maitansinoide, taxano o CC1065, o un análogo de los mismos, preferiblemente la molécula efectora es al menos un maitansinoide, y muy preferiblemente el al menos un maitansinoide es DM1, DM3, o DM4.
- 30 5. El producto inmunoconjugado de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente comprende adicionalmente:  
 (a) los residuos de aminoácido 123 a 448 del SEQ ID NO: 1, y/o  
 (b) los residuos de aminoácido 108 a 214 del SEQ ID NO: 2, respectivamente y las mutaciones de los mismos que  
 (i) mantienen o disminuyen la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento del anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente y/o  
 (ii) estabilizan el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente.
- 35 6. El producto inmunoconjugado de cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de la cadena ligera tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con el SEQ ID NO: 2.
- 40 7. El producto inmunoconjugado de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo de direccionamiento modificado genéticamente comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende el SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 2.
- 45 8. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un sujeto.
9. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del carcinoma de vejiga de células transicionales en un sujeto.
- 50 10. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.
- 55 11. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la inhibición, retraso y/o prevención del crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de células tumorales de semejante tumor en un paciente.
- 60 12. El producto inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:  
 - dicho paciente padece una neoplasia maligna hematológica y/o un tumor sólido que comprende células que expresan CD138, preferiblemente en donde dicho paciente padece uno de los siguientes: mieloma múltiple, carcinoma de ovario, carcinoma de riñón, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma de colon, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), sarcoma de tejido sólido o carcinoma de colon, y muy preferiblemente en donde el paciente padece mieloma múltiple;  
 - dicha molécula efectora de dicho producto inmunoconjugado es una toxina, una enzima citotóxica, un fármaco citotóxico de bajo peso molecular, un agente formador de poros, un modificador de la respuesta biológica, una enzima activadora de profármacos, un anticuerpo, una citoquina o un radionúclido;

- dicho producto inmunoconjugado se va a administrar a una dosis única de  $5 \text{ mg/m}^2$  a aproximadamente  $300 \text{ mg/m}^2$ ; o
- dicho producto inmunoconjugado se va a administrar en al menos dos dosis de aproximadamente  $5 \text{ mg/m}^2$  a aproximadamente  $300 \text{ mg/m}^2$ , opcionalmente a intervalos de horas, días, semanas o combinaciones de los mismos.

5

13. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor y/o la propagación de células tumorales malignas que comprenden células que expresan CD138 en un paciente, en donde el paciente ha sido tratado con uno o más agentes citotóxicos y/o radiación en una cantidad para reducir la carga tumoral.

10

14. El producto inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente citotóxico es melfalan, vincristina, doxorubicina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, talidomida, prednisona, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina o combinaciones de los mismos, o se basa en anticuerpos.

15

15. Un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una afección que se beneficiaría de la supresión de la supervivencia de células de mieloma, en donde el producto inmunoconjugado es capaz de disminuir selectivamente la supervivencia o el crecimiento de dichas células de mieloma de dicho sujeto.

20

16. Una composición farmacéutica que comprende el producto inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición es adecuada para la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales.

25

17. Un kit que comprende, en recipientes separados, composiciones farmacéuticas para su uso combinado para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, en donde un recipiente comprende una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 16, y en donde, un recipiente separado comprende una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente adicional, preferiblemente un agente citotóxico, para la inhibición, el retraso y/o la prevención del crecimiento de tumores y/o la propagación de células tumorales, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, preferiblemente en donde dicho agente de dicha segunda composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en melfalan, vincristina, doxorubicina, dexametasona, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, cisplatino, talidomida, prednisona, bortezomib, lenalidomida, sorafenib, romidepsina y combinaciones de los mismos o se basa en anticuerpos.

30

35

18. El uso de un producto inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de un medicamento para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento de un tumor que comprende células tumorales CD138 y/o la propagación de células tumorales de semejante tumor en un paciente.

40

FIG. 1

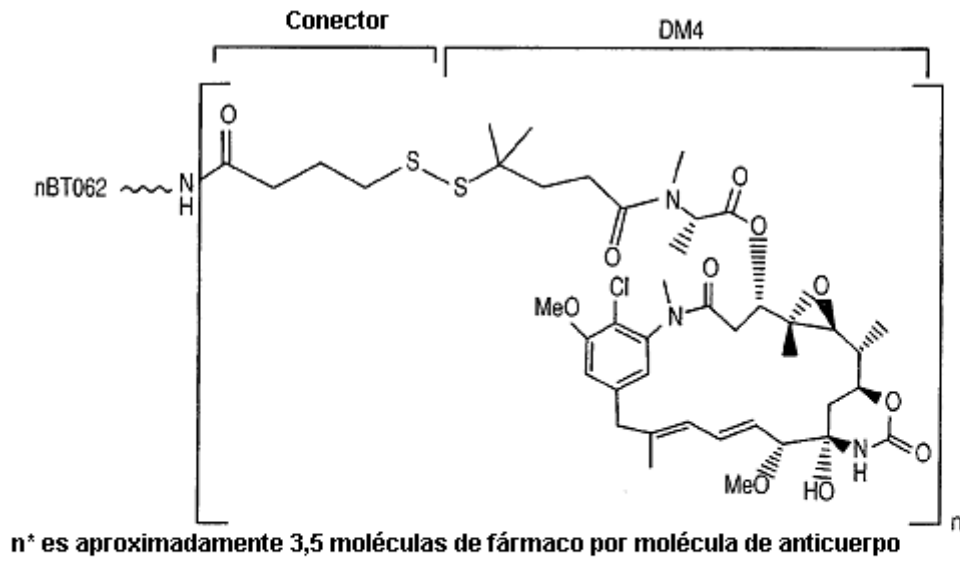
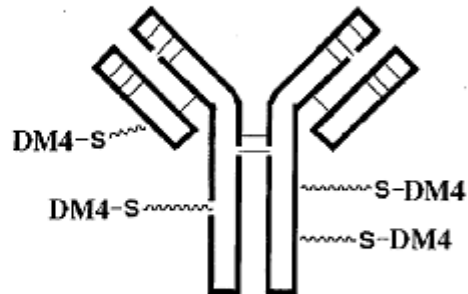


FIG. 2

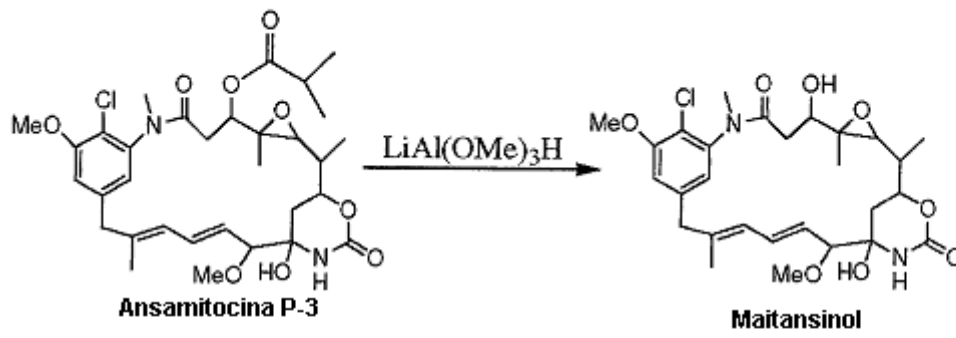


FIG. 3

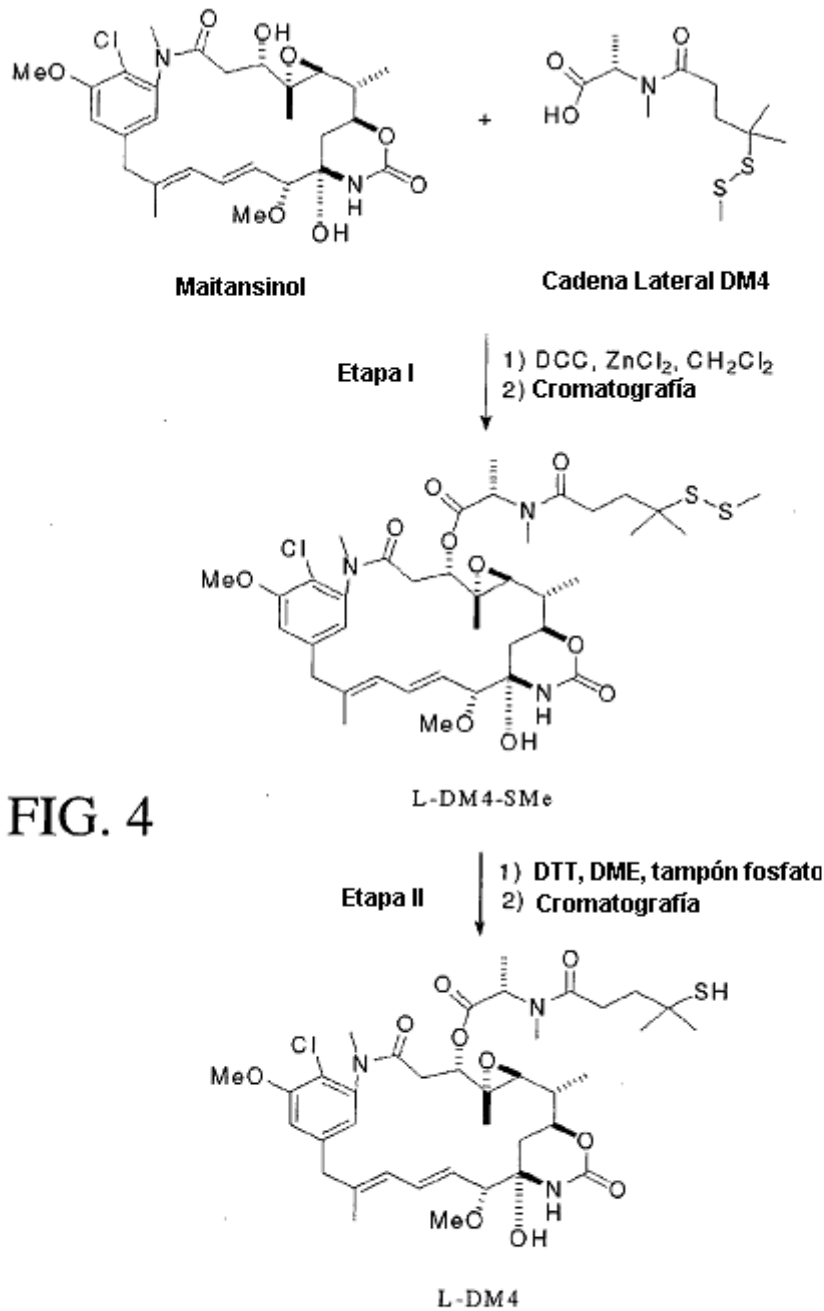


FIG. 4

DCC: 1,3-diciclohexilcarbodimida  
 DTT: Ditiotretol  
 DME: 1,2-Dimetoxietano



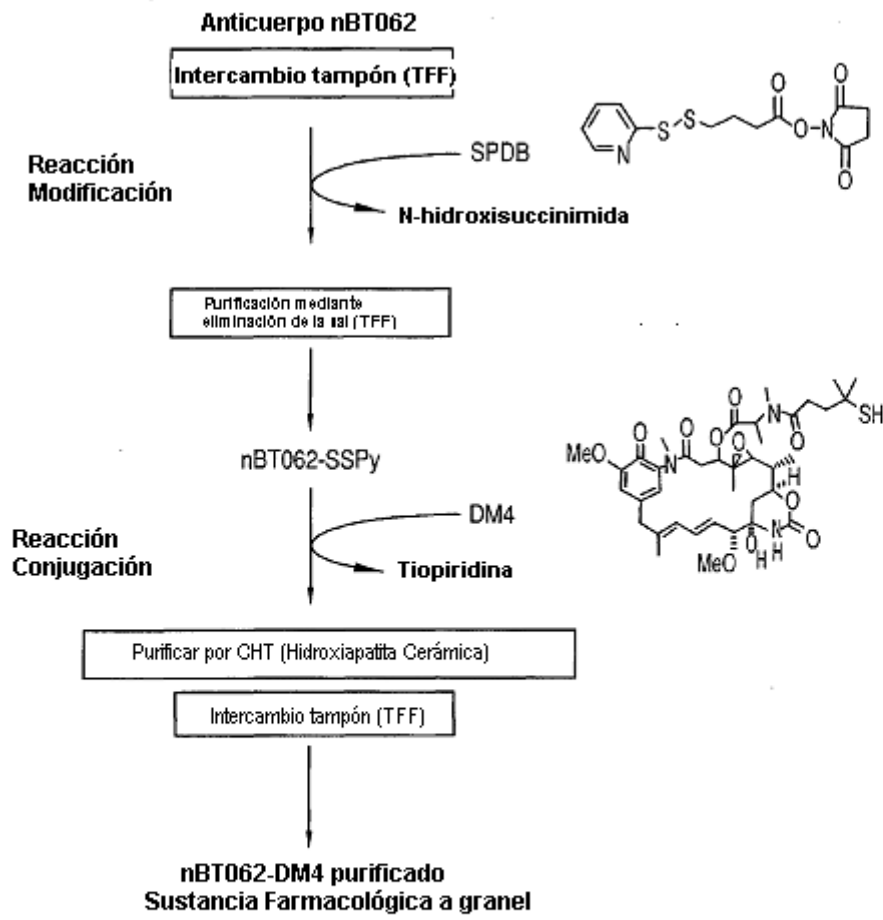


FIG. 5

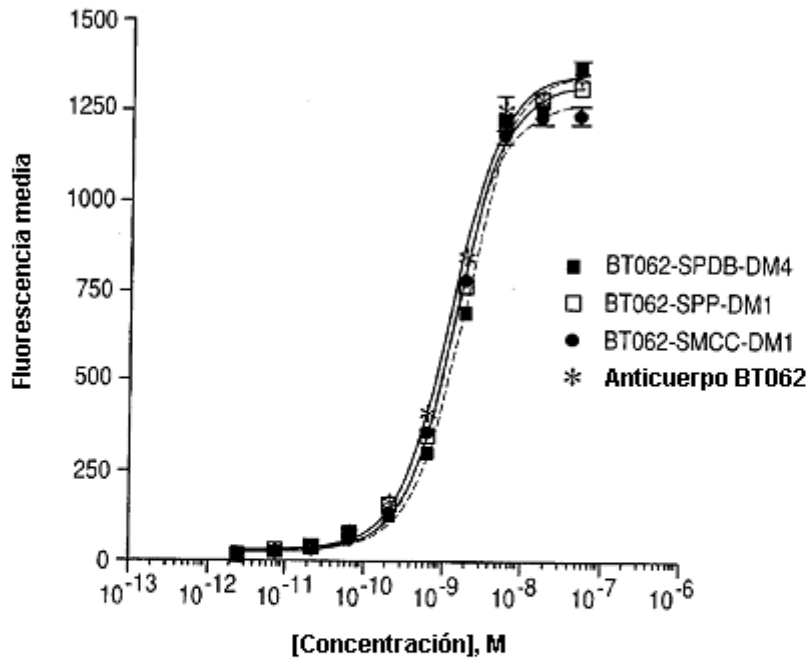


FIG. 6

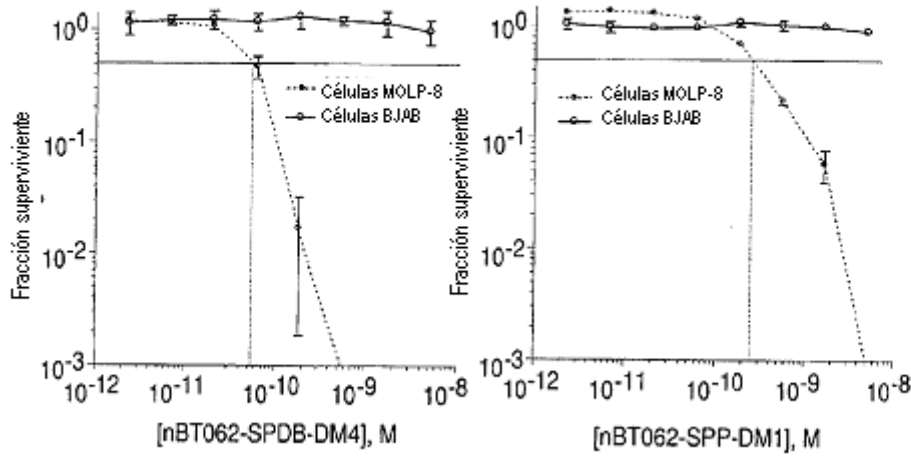


FIG. 7A

FIG. 7B

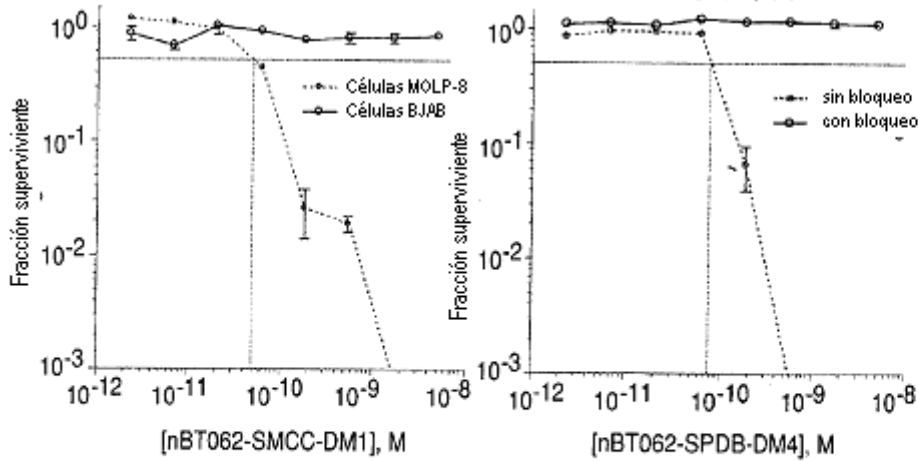


FIG. 7C

FIG. 7D

PBS, 200  $\mu$ L/ raton,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.      Anticuerpo nBT062, 13,8 mg/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.

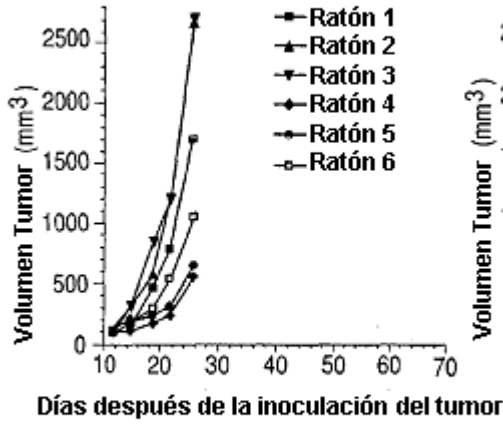


FIG. 8A

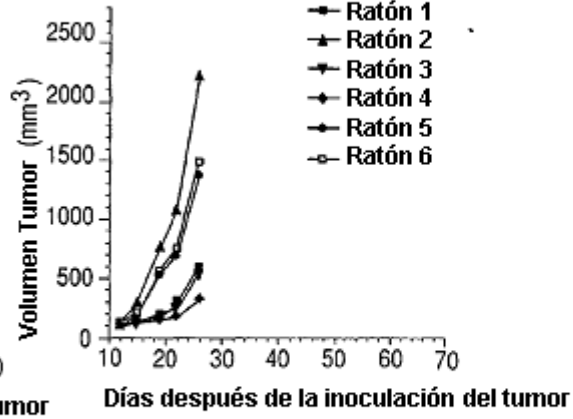


FIG. 8B

DM4, 250  $\mu$ g/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.

huC242-DM4, 250  $\mu$ g/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.

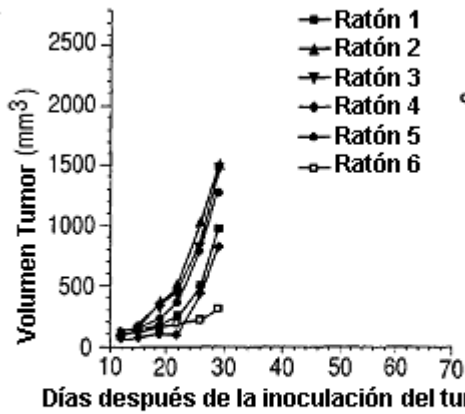


FIG. 8C

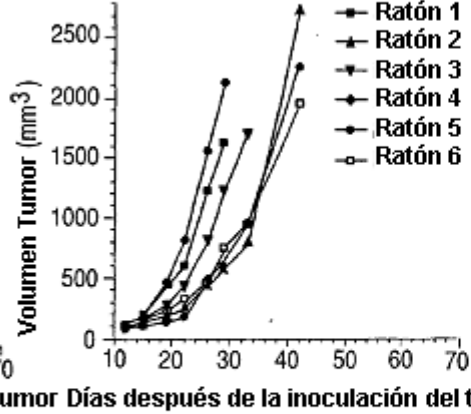


FIG. 8D

PBS, 200  $\mu$ L/iraton,  $\acute{u}$ nica embolada i.v. nBT062-SPDB-DM4, 250  $\mu$ g/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.

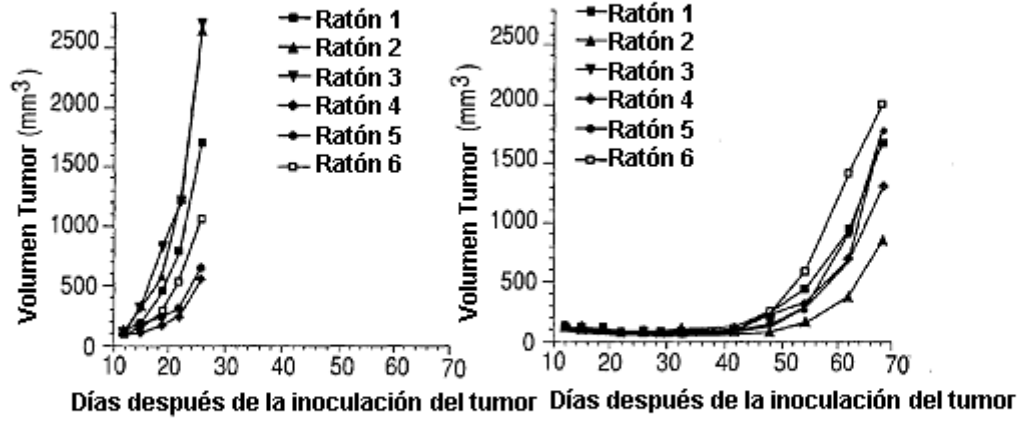


FIG. 9A

FIG. 9B

B-B4-SPP-DM1, 250  $\mu$ g/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v. nBT062-SPP-DM1, 250  $\mu$ g/kg,  $\acute{u}$ nica embolada i.v.

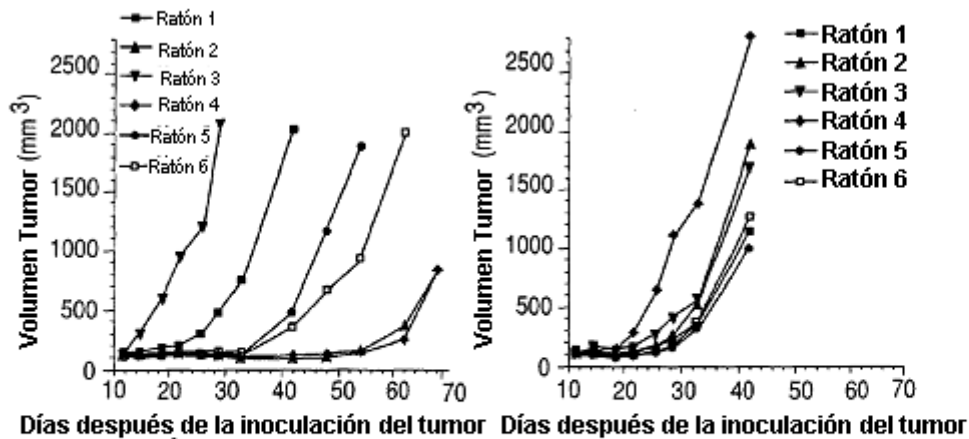


FIG. 9C

FIG. 9D

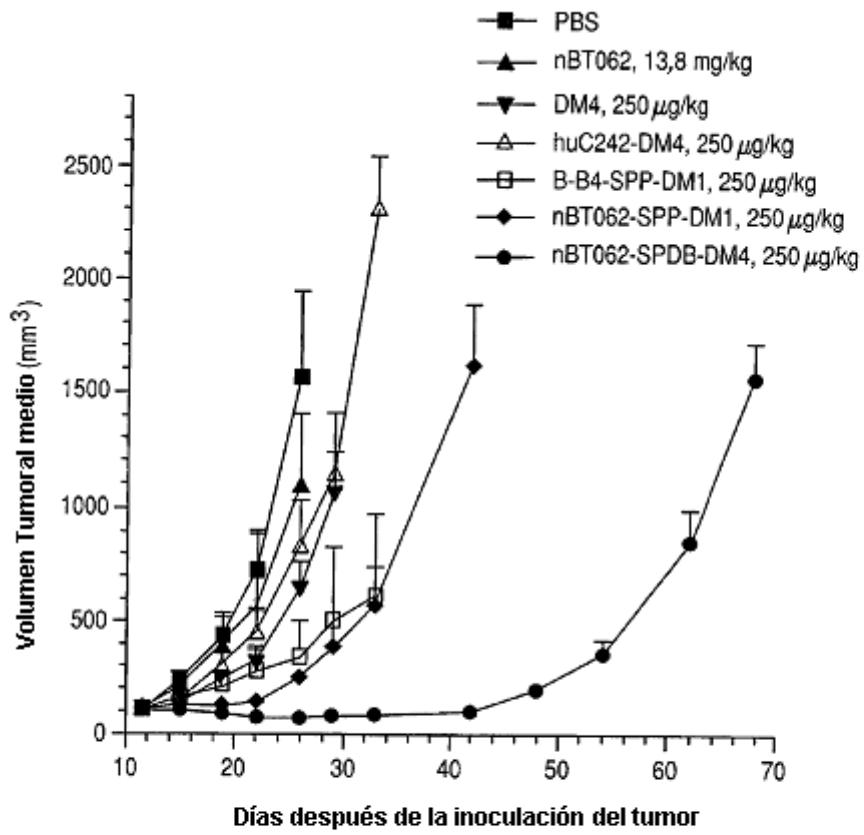


FIG. 10

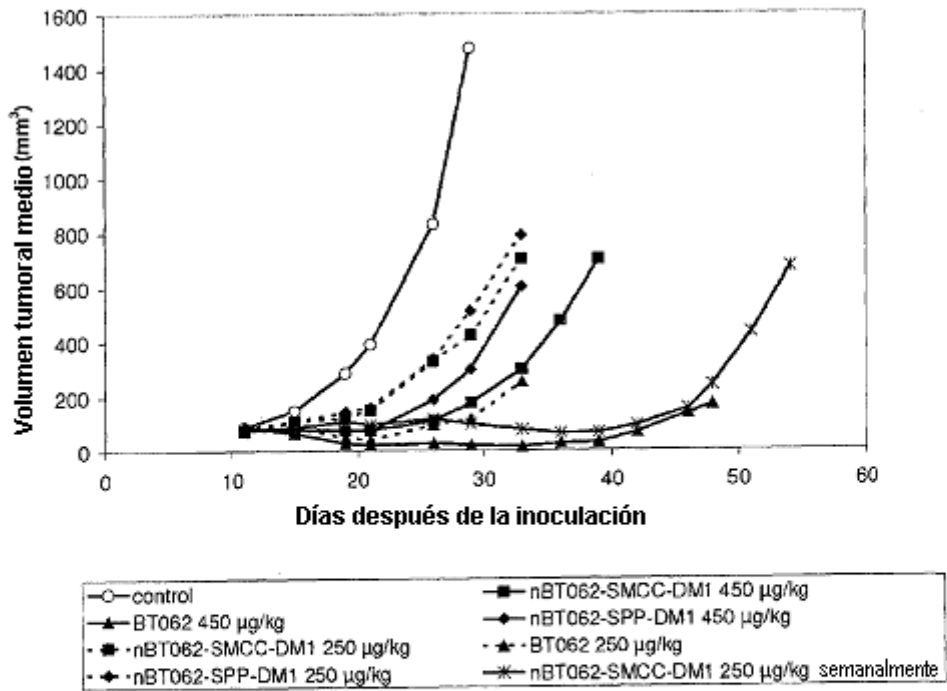


FIG. 11A

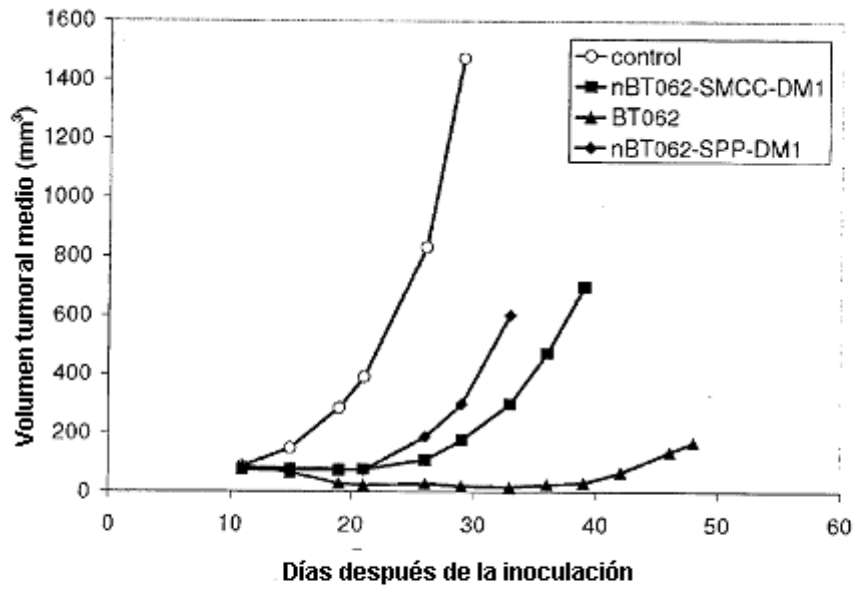


FIG. 11B



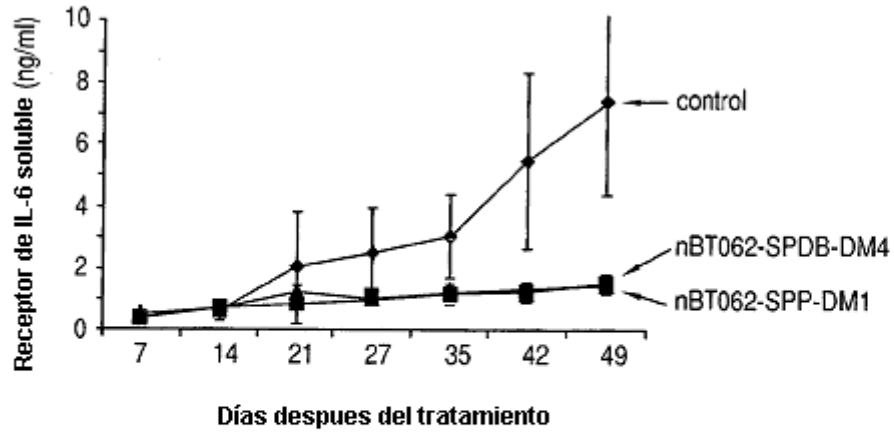


FIG. 12

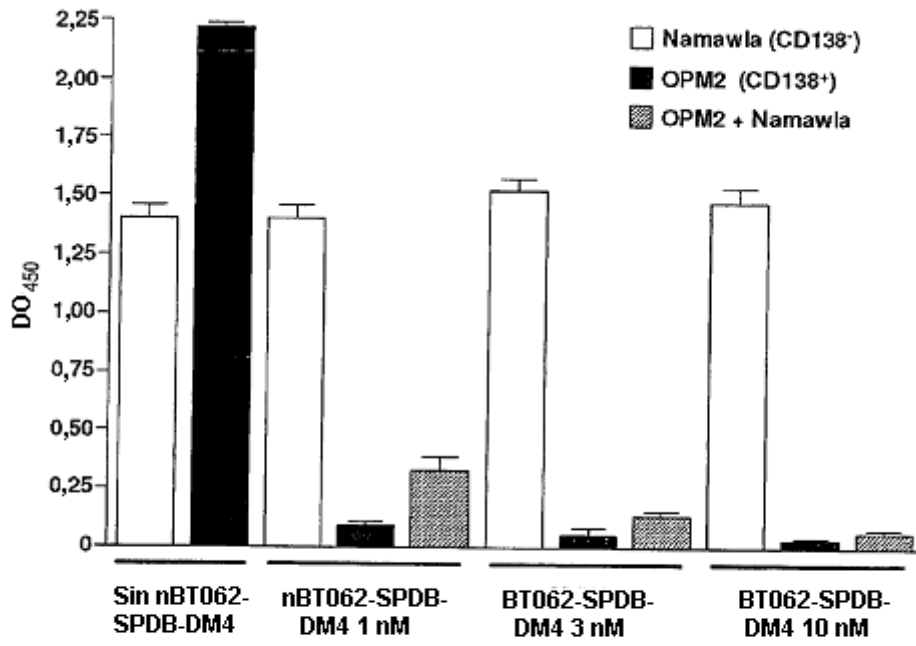


FIG. 13