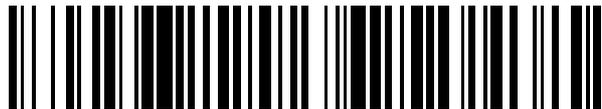


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 754**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2007 PCT/IB2007/004172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2008 WO08047242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2007 E 07859236 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2076540**

54 Título: **Nuevos anticuerpos anti-CD38 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

19.10.2006 EP 06291628

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

09.10.2019

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**PARK, PETER U.;
BARTLE, LAURA M.;
SKALETSKAYA, ANNA;
GOLMAKHER, VIKTOR S.;
TAVARES, DANIEL;
DECKERT, JUTTA;
MIKOL, VINCENT y
BLANC, VÉRONIQUE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 726 754 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

Nuevos anticuerpos anti-CD38 para el tratamiento del cáncer

Antecedentes de la invención

5 CD38 es una glucoproteína de 45 kD de tipo transmembrana II con un dominio extracelular C-terminal largo y un dominio citoplásmico N-terminal corto. La proteína CD38 es una ectoenzima bifuncional que puede catalizar la conversión de NAD⁺ en ADP-ribosa cíclico (cADPR) y también hidrolizar cADPR en ADP-ribosa. Durante la ontogenia, CD38 aparece en células madre comprometidas CD34⁺ y en progenitoras comprometidas por linaje de células linfoides, eritroides y mieloides. La expresión de CD38 persiste principalmente en el linaje linfóide con niveles de expresión variables en distintas etapas del desarrollo de células T y B.

10 CD38 aumenta en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas, como linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células vellosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otra parte, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38⁻. La expresión de CD38 en malignidades hematopoyéticas y su correlación con la progresión de la enfermedad hace que CD38 sea una diana atractiva para la terapia de anticuerpos.

15 Se ha descrito que CD38 está implicada en la movilización de Ca²⁺ (M. Morra et al., 1998, FASEB J., 12: 581-592; M. T. Zilber et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 2840-2845) y en la transducción de señales a través de la fosforilación de tirosina de numerosas moléculas de señalización, incluidas fosfolipasa C-γ, ZAP-70, syk y c-cbl, en células o líneas celulares linfoides y mieloides (A. Funaro et al., 1993, Eur J Immunol, 23: 2407-2411; M. Morra et al., 1998, FASEB J., 12: 581-592; A. Funaro et al., 1990, J Immunol, 145: 2390-2396; M. Zubiaur et al., 1997, J Immunol, 159: 193-205; S. Deaglio et al., 2003, Blood 102: 2146-2155; E. Todisco et al., 2000, Blood, 95: 535-542; M. Konopleva et al., 1998, J Immunol, 161: 4702-4708; M. T. Zilber et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA, 97: 2840-2845; A. Kitanaka et al., 1997, J Immunol, 159: 184-192; A. Kitanaka et al., 1999, J Immunol, 162: 1952-1958; R. Mallone et al., 2001, Int Immunol, 13: 397-409). En base a estas observaciones, se propuso CD38 como una importante molécula de señalización en la maduración y activación de células linfoides y mieloides durante su desarrollo normal.

20 La función exacta de CD38 en la transducción de señales y la hematopoyesis aún no está clara, especialmente dado que la mayoría de estos estudios de transducción de señales han usado líneas celulares que expresan en forma excesiva y ectópica CD38 y anticuerpos monoclonales anti-CD38, que son ligandos no fisiológicos. Puesto que la proteína CD38 posee una actividad enzimática que produce cADPR, una molécula que puede inducir movilización de Ca²⁺ (H. C. Lee et al., 1989, J Biol Chem, 264: 1608-1615; H. C. Lee y R. Aarhus, 1991, Cell Regul, 2: 203-209), se ha propuesto que la ligadura de CD38 por anticuerpos monoclonales desencadena la movilización de Ca²⁺ y la transducción de señales en linfocitos, aumentando la producción de cADPR (H. C. Lee et al., 1997, Adv Exp Med Biol, 419: 411-419). En oposición a esta hipótesis, el análisis de truncación y mutación puntual de la proteína CD38 demostró que ni su extremo citoplásmico ni su actividad enzimática son necesarias para la señalización mediada por anticuerpos anti-CD38 (A. Kitanaka et al., 1999, J Immunol, 162: 1952-1958; F. E. Lund et al., 1999, J Immunol, 162: 2693-2702; S. Hoshino et al., 1997, J Immunol, 158, 741-747).

25 La mejor evidencia para la función de CD38 proviene de ratones con genes inactivados de CD38⁷, que tienen un defecto en su inmunidad innata y una reducción de la respuesta humoral dependiente de las células T debido a un defecto en la migración de células dendríticas (S. Partida-Sanchez et al., 2004, Immunity, 20: 279-291; S. Partida-Sanchez et al., 2001, Nat Med, 7: 1209-1216). No obstante, no está claro si la función de CD38 en ratones es idéntica a aquella en seres humanos, ya que el patrón de expresión de CD38 durante la hematopoyesis difiere en gran medida entre seres humanos y ratones: a) a diferencia de las células madre progenitoras inmaduras en seres humanos, las células madre progenitoras similares en ratones expresan un alto nivel de CD38 (T. D. Randall et al., 1996, Blood, 87: 4057-4067; R. N. Dagher et al., 1998, Biol Blood Marrow Transplant, 4: 69-74), b) mientras que durante el desarrollo de células B humanas, se hallan altos niveles de expresión de CD38 en células B del centro germinal y en células plasmáticas (F. M. Uckun, 1990, Blood, 76: 1908-1923; M. Kumagai et al., 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110), en el ratón, los niveles de expresión de CD38 en las células correspondientes son bajos (A. M. Oliver et al., 1997, J Immunol, 158: 1108-1115; A. Ridderstad and D. M. Tarlinton 1998, J Immunol, 160: 4688-4695).

30 Se han descrito en la bibliografía distintos anticuerpos CD38 anti-humanos con diferentes propiedades proliferativas en distintas células tumorales y líneas celulares. Por ejemplo, un anticuerpo OKT10 quimérico con Fab de ratón y IgG1 Fc humano media la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de manera muy eficiente contra células de linfoma en presencia de células efectoras mononucleares de sangre periférica o bien de pacientes con MM o de sujetos normales (F. K. Stevenson et al. 1991, Blood, 77: 1071-1079). Una versión humanizada injertada con CDR del anticuerpo anti-CD38 AT13/5 demostró tener una potente actividad ADCC contra líneas de células CD38-positivas (US 09/797.941 A1). Se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD38

monoclonales humanos median la inactivación *in vitro* de líneas celulares CD38-positivas por ADCC y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (WO2005/103083, WO2006/099875), y demoran el crecimiento de los tumores en ratones SCID que portan la línea celular de MM, RPMI-8226 (WO2005/103083 A2). Por otra parte, varios anticuerpos anti-CD38, IB4, SUN-4B7 y OKT10, pero no IB6, AT1 o AT2, indujeron la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos normales (C. M. Ausiello et al. 2000, Tissue Antigens, 56: 539-547).

Se ha demostrado que algunos de los anticuerpos de la técnica anterior son capaces de desencadenar apoptosis en células CD38⁺ B. No obstante, solamente pueden hacerlo en presencia de células estromales o citocinas derivadas de estromas. Se ha descrito que un anticuerpo anti-CD38 agonista (IB4) previene la apoptosis de células B del centro germinal humano (GC) (S. Zupo et al. 1994, Eur J Immunol, 24: 1218-1222), e induce la proliferación de células KG-1 y HL-60 AML (M. Konopleva et al. 1998, J Immunol, 161: 4702-4708), pero induce apoptosis en células linfoblásticas T Jurkat (M. Morra et al. 1998, FASEB J, 12: 581-592). Otro anticuerpo anti-CD38, T16 indujo apoptosis de células linfoides inmaduras y de células de linfoblastos leucémicas de un paciente con ALL (M. Kumagai et al. 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110), y de células de mieloblastos leucémicas de pacientes con AML (E. Todisco et al. 2000, Blood, 95: 535-542), pero T16 indujo apoptosis solamente en presencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma (IL-7, IL-3, factor de células madre).

Por otra parte, algunos anticuerpos de la técnica anterior inducen apoptosis después de la reticulación, pero están totalmente desprovistos de cualquier actividad apoptótica cuando se incuban solos (WO 2006/099875).

Dado que CD38 es una diana atractiva para la terapia de anticuerpos para diversas malignidades hematopoyéticas, generamos y estudiamos un gran número de anticuerpos anti-CD38 humanos para alta potencia en las siguientes tres actividades citotóxicas contra células hematopoyéticas malignas CD38-positivas: inducción de apoptosis, ADCC y CDC. La presente invención describe nuevos anticuerpos anti-CD38 capaces de inactivar las células CD38⁺ con tres mecanismos citotóxicos diferentes: inducción de apoptosis, ADCC y CDC. Cabe destacar que la presente invención describe los primeros anticuerpos anti-CD38 capaces de inducir directamente apoptosis de células CD38⁺, incluso sin la presencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma.

Compendio de la invención

Es un objeto de la invención dar a conocer anticuerpos que se unen específicamente a CD38, y que son capaces de inactivar las células CD38⁺ por apoptosis. Si bien algunos anticuerpos de la técnica anterior son capaces de desencadenar apoptosis solamente cuando se reticulan pero están desprovistos de cualquier actividad apoptótica, los anticuerpos de la invención son capaces de inducir muerte celular apoptótica de las células CD38⁺ incluso cuando se incuban solas. Cabe destacar que los anticuerpos de la invención son los primeros anticuerpos anti-CD38 que demostraron inactivar las células CD38⁺ B por tres mecanismos diferentes: apoptosis, ADCC y CDC. En otra realización de la invención, dichos anticuerpos son capaces de inactivar las células CD38⁺ B por apoptosis incluso en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma.

Los anticuerpos de la invención son capaces, en particular, de inactivar células CD38⁺ B malignas, incluidas células de linfoma, células de leucemia y células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula CD38⁺ B es una célula NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL o CML.

En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la invención son capaces de inactivar por lo menos 24% de células de linfoma Daudi y/o por lo menos 7% de células de linfoma de Ramos y/u 11 % de células de mieloma múltiple MOLP-8 y/o 36 % de células de linfoma SU-DHL-8 y/o 62% de células de leucemia DND-41 y/o 27 % de células de linfoma NU-DUL-1 y/o 9 % de células de leucemia JVM-13 y/o 4 % de células de leucemia HC-1 por apoptosis en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma.

Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Se prefieren los anticuerpos anti-CD38 monoclonales. La presente descripción da a conocer anticuerpos murinos seleccionados entre 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, que se caracterizan totalmente en la presente invención con respecto a las secuencias de aminoácidos tanto de sus regiones variables de cadena ligera como pesada, las secuencias de ADNc de los genes para sus regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de sus CDR (regiones determinantes de complementaridad), la identificación de sus aminoácidos superficiales y medios para su expresión en forma recombinante.

La presente descripción incluye versiones quiméricas del anticuerpo monoclonal anti-CD38 murino seleccionadas entre 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39. También se describen versiones con superficie acondicionada o humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 en donde los residuos expuestos a la superficie de los marcos de la región variable de los anticuerpos, o sus fragmentos de unión al epítipo se reemplazan tanto en las cadenas ligeras como pesadas para asemejarse más a superficies de anticuerpos humanos conocidos. Los anticuerpos humanizados y sus fragmentos de unión al epítipo descritos en este documento poseen propiedades mejoradas en el sentido que son menos inmunogénicos (o completamente no

inmunogénicos) que las versiones murinas en sujetos humanos a los que se administran. Por lo tanto, las distintas versiones de anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 humanizados y sus fragmentos de unión al epítipo reconocen específicamente CD38 a la vez que no son inmunogénicos para un humano.

5 Las versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 se caracterizan totalmente en este documento con respecto a sus respectivas secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, la identificación de las regiones determinantes de complementaridad (CDR), la identificación de sus residuos de aminoácidos superficiales de marco de la región variable y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante.

10 Esta descripción también contempla el uso de conjugados entre conjugados citotóxicos que comprenden (1) un agente que se une a una células que reconoce y se une a CD38, y (2) un agente citotóxico. En los conjugados citotóxicos, el agente de unión a la célula tiene gran afinidad hacia CD38 y el agente citotóxico tiene un alto grado de citotoxicidad para células que expresan CD38, de modo tal que los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes de inactivación eficaces.

15 Preferiblemente, el agente de unión a la célula es un anticuerpo anti-CD38 (p. ej., 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39) o su fragmento de unión al epítipo, más preferiblemente un anticuerpo humanizado anti-CD38 (p. ej., 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39) o su fragmento de unión al epítipo, en donde un agente citotóxico se conecta en forma covalente, directamente o mediante un enlazador escindible o no escindible, al anticuerpo o su fragmento de unión al epítipo. En realizaciones más preferidas, el agente de unión a la
 20 célula es el anticuerpo humanizado 38SB19 y el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, CC-1065 o un análogo de CC-1065.

Más preferiblemente, el agente de unión a la célula es el anticuerpo humanizado anti-CD38, 38SB19, y el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4.

25 La presente descripción también abarca el uso de fragmentos de anticuerpos anti-CD38 que retienen la capacidad de unirse a CD38. En otro aspecto de la descripción, se contempla el uso de equivalentes funcionales de anticuerpos anti-CD38.

La presente descripción también incluye un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD38. En realizaciones preferidas, el método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa CD38 tiene lugar *in vivo* y resulta en la muerte de la célula, aunque también se incluyen aplicaciones *in vitro* y *ex vivo*.

30 La presente invención también da a conocer una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CD38 o un conjugado de anticuerpo anti-CD38-agente citotóxico, y un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición terapéutica comprende un segundo agente terapéutico. Este segundo agente terapéutico se puede seleccionar del grupo que comprende los antagonistas del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína
 35 estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un antagonista de un receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial
 40 vascular (VEGF), incluido el receptor HER2, receptor HER3, c-MET y otros receptores de tirosina cinasas. Este segundo agente terapéutico puede además seleccionarse del grupo que comprende anticuerpos que se dirigen a grupos de diferenciación de antígenos (CD), incluidos CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138 y CD152. Este
 45 segundo agente terapéutico puede también seleccionarse del grupo de agentes quimioterapéuticos o inmunomoduladores.

La presente invención incluye además el anticuerpo o conjugado de la invención para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer o una enfermedad inflamatoria, incluida una enfermedad autoinmune, usando la composición terapéutica. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL y CML. En otra realización, la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en
 50 lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, gastritis, tiroiditis de Hashimoto, espondilitis anquilosante, vasculitis crioglobulinémica asociada con hepatitis C, encefalitis focal crónica, penfigoide ampolloso, hemofilia A, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Sjogren, dermatomiositis adulta y juvenil, polimiositis adulta, urticaria crónica, cirrosis biliar primaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neuromielitis óptica, enfermedad distroide de Graves, penfigoide ampolloso, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Churg-Strauss y asma. En realizaciones preferidas, el conjugado citotóxico
 55 comprende un anticuerpo anti-CD38 y un agente citotóxico. En realizaciones más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado de anticuerpo humanizado 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 -DM1,

anticuerpo humanizado 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39-DM4 o un conjugado de anticuerpo humanizado 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39-taxano, y el conjugado se administra junto con un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En la presente descripción, los anticuerpos anti-CD38 se usan para detectar la proteína CD38 en una muestra biológica. En una realización preferida, dichos anticuerpos se usan para determinar los niveles de CD38 en tejido tumoral.

10 La presente descripción también incluye un kit que comprende un anticuerpo anti-CD38 o un conjugado de anticuerpo anti-CD38-agente citotóxico e instrucciones para el uso. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-CD38 son los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina o un taxano, y las instrucciones son para usar los conjugados en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer. El kit puede además incluir componentes necesarios para la preparación de una formulación farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente si el conjugado está en estado liofilizado o en forma concentrada, y para la administración de la formulación.

15 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A muestra un análisis FACS de la unión específica de anticuerpos anti-CD38 murinos purificados, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38 a las células 300-19 que expresan células de linfoma Ramos CD38 y CD38-positivas humanas.

20 La Fig. 1B muestra un análisis FACS de la unión específica de anticuerpos anti-CD38 murinos purificados, 38SB30, 38SB31, 38SB39 y el anticuerpo anti-CD38 control AT13/5 a las células 300-19 que expresan células de linfoma de Ramos CD38 y CD38-positivas humanas.

La Fig. 2 muestra las curvas de titulación de unión de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 establecidas con células Ramos.

25 La Fig. 3 muestra gráficos de puntos de FACS (FL4-H; tinción TO-PRO-3; eje y y FL1-H; tinción Anexina V-FITC; eje x) de células Ramos que se someten a apoptosis después de la incubación con 38SB13, 38SB19 o AT13/5 (10 nM) durante 24 h.

La Fig. 4A muestra los porcentajes promedio de células Ramos que se someten a apoptosis después de una incubación de 24 h con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, 38SB39, 38SB7, 38SB23, IB4, AT13/5, OKT10 o SUN-4B7. Se graficó el porcentaje promedio de células Anexina V-positivas (eje y; incluye tanto células TO-PRO-3 positivas como negativas) a partir de muestras por duplicado.

30 La Fig. 4B muestra los porcentajes promedio de células Daudi que se someten a apoptosis después de una incubación de 24 h con el mismo conjunto de anticuerpos que en la Fig. 4A.

La Fig. 4C muestra los porcentajes promedio de células Molp-8 que se someten a apoptosis después de una incubación de 24 h con el mismo conjunto de anticuerpos que en la Fig. 4A.

La Fig. 5A muestra un diagrama del vector de expresión humano utilizado para expresar hu38SB19-LC.

35 La Fig. 5B muestra un diagrama del vector de expresión humano utilizado para expresar hu38SB19-HC.

La Fig. 5C muestra un diagrama del vector de expresión humano utilizado para expresar hu38SB19LC y hu38SB19HC.

La Fig. 6A muestra actividades de ADCC mediadas por los anticuerpos, ch38SB13, ch38SB18 y ch38SB19, hacia células Ramos.

40 La Fig. 6B muestra actividades de ADCC mediadas por los anticuerpos, ch38SB30, ch38SB31 y ch38SB39 hacia células Ramos.

La Fig. 7 A) muestra actividades de ADCC mediadas por los anticuerpos ch38SB18, ch38SB19, ch38SB31 y el anticuerpo control humano quimérico no de unión IgG1 hacia células de mieloma múltiple LP-1.

45 La Fig. 7 B) compara actividades de ADCC mediadas por los anticuerpos ch38SB19 y 38SB19 murino hacia células Daudi.

La Fig. 8 A muestra actividades de ADCC mediadas por el anticuerpo ch38SB19 y por el anticuerpo control humano quimérico no de unión IgG1 hacia células NALM-6 B-ALL.

- La Fig. 8 B muestra actividades de ADCC mediadas por el anticuerpo ch38SB19 y por el anticuerpo control humano quimérico no de unión IgG1 hacia células MOLT-4 T-ALL.
- La Fig. 9 A muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30 y ch38SB39 hacia células Raji-IMG.
- 5 La Fig 9 B muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19 y ch38SB31 hacia células Raji-IMG.
- La Fig. 10 muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB18, ch38SB19, ch38SB31, y por el anticuerpo control humano quimérico no de unión IgG1 hacia células de mieloma múltiple LP-1.
- 10 La Fig. 11A muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB13, ch38SB19 y ch38SB39 hacia células Daudi.
- La Fig. 11B muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB18 y ch38SB30 hacia células Daudi.
- La Fig. 11C muestra actividades de CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19 y ch38SB31 hacia células Daudi
- La Fig. 12 A muestra las curvas de titulación de unión de ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 para unión a células Ramos.
- 15 La Fig. 12B muestra las curvas de unión que comparan ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 por su capacidad de competir con la unión del anticuerpo biotinilado murino 38SB19 a células Ramos.
- La Fig. 13 muestra los porcentajes promedio de células Daudi que se someten a apoptosis después de 24 h de incubación con anticuerpo ch38SB19, hu38SB19 v1.00 o hu38SB19 v1.20.
- 20 La Fig. 14 muestra actividades de ADCC mediadas por los anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20, y por el anticuerpo control humano quimérico no de unión IgG1 hacia células de mieloma múltiple LP-1.
- La Fig. 15A muestra actividades de CDC mediadas por anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 hacia células de linfoma Raji-IMG.
- La Fig. 15B muestra actividades de CDC mediadas por anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 hacia células de mieloma múltiple LP-1.
- 25 La Fig. 15C muestra actividades de CDC mediadas por anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 hacia células de leucemia linfoblástica aguda de células T DND-41.
- La Fig. 16 muestra los porcentajes promedio de células Anexina V positivas después de 24 h de incubación con el anticuerpo hu38SB19 v1.00 para células de linfoma de células B grandes difusas SU-DHL-8, células de linfoma de células B NU-DUL-1 B, células de leucemia linfoblástica aguda de células T DND-41, células de leucemia linfocítica crónica de células B JVM-13 y células de leucemia de células vellosas HC-1.
- 30 La Fig. 17 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID que portan tumores Ramos humanos diseminados establecidos. Los ratones se trataron con anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 murino o PBS, como se indica.
- 35 La Fig. 18 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID que portan tumores Daudi humanos diseminados. Los ratones fueron tratados con anticuerpo hu38SB19 o mu38SB19, o PBS, como se indica.
- La Fig. 19 muestra el volumen medio del tumor de ratones SCID que portan tumores de xenoinjerto de mieloma múltiple NCI-H929. Los ratones fueron tratados con hu38SB19, un anticuerpo control no de unión IgG1 o con PBS, como se indica.
- 40 La Fig. 20 muestra el volumen medio del tumor de ratones SCID que portan tumores de xenoinjerto de mieloma múltiple MOLP-8. Los ratones fueron tratados con hu38SB19, mu38SB19, un anticuerpo control no de unión IgG1 o con PBS, como se indica.
- Descripción detallada de la invención
- Se dan a conocer en este documento nuevos anticuerpos que se unen específicamente a CD38. En particular, los presentes inventores han descubierto nuevos anticuerpos que se unen específicamente a CD38 en la superficie de la célula y destruyen las células CD38⁺ por apoptosis, por citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC) y por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La invención da a conocer por lo tanto los primeros anticuerpos anti-CD38 capaces de inactivar una célula CD38⁺ a través de tres mecanismos diferentes.
- 45

Los anticuerpos capaces de unirse a CD38 y de desencadenar muerte celular apoptótica en células CD38⁺ se han descrito previamente (M. Kumagai et al., 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110; E. Todisco et al. 2000, Blood, 95: 535-542), pero los anticuerpos de la invención son los primeros para los cuales se demuestra una actividad apoptótica en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. El término "estroma", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere al tejido de soporte no maligno de un tumor que incluye tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y células inflamatorias. Las células estromales producen factores de crecimiento y otras sustancias, incluidas citocinas, que pueden influir en la conducta de las células cancerosas. El término "citocina", tal como se emplea en este documento, se refiere a pequeñas proteínas segregadas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6, IFN γ , IL-3, IL-7 y GM-CSF) que median y regulan la inmunidad, la inflamación y la hematopoyesis. Se demuestra en este documento que los anticuerpos de la técnica anterior son incapaces de desencadenar muerte celular apoptótica en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En contraste, los anticuerpos anti-CD38 de la invención exhiben, bajo las mismas condiciones, potentes actividades apoptóticas.

En otro aspecto, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a la proteína CD38 con un K_D de 3×10^{-9} M o menos.

El término "CD38" tal como se emplea en esta memoria se refiere a una proteína transmembrana de tipo II que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como en el número de acceso en Genbank NP_001766. Una "célula CD38⁺" es una célula que expresa la proteína CD38. Preferiblemente, la célula CD38⁺ es una célula mamífera.

La célula CD38⁺ es preferiblemente una célula maligna. La célula CD38⁺ puede ser una célula B. Preferiblemente, la célula CD38⁺ es una célula de tumor derivada de una malignidad hematopoyética. En una realización preferida, la célula CD38⁺ es una célula de linfoma, una célula de leucemia o una célula de mieloma múltiple. En otra realización preferida, la célula CD38⁺ es una célula NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL o CML.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención da a conocer anticuerpos anti-CD38 capaces de inactivar por lo menos 24 % de células de linfoma Daudi en ausencia de células estromales o de citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 7 % de células de linfoma Ramos en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 11 % de células de mieloma múltiple MOLP-8 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 36 % de células de linfoma de SU-DHL-8 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 27 % de células de linfoma NU-DUL-1 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 62 % de células de leucemia DND-41 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 9 % de células de leucemia JVM-13 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de inactivar por lo menos 4 % de células de leucemia HC-1 en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" se usa en la presente memoria en su sentido más amplio y concretamente abarca anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud total) de cualquier isotipo tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos y fragmentos de anticuerpo. Un anticuerpo reactivo con un antígeno específico se puede generar por métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares, o inmunizando a un animal con el antígeno o un ácido nucleico que codifica el antígeno.

Un anticuerpo IgG típico está comprendido por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos llamados "regiones determinantes de complementaridad" ("CDR") o "regiones hipervariables", que son principalmente responsables de unirse a un epítipo de un antígeno. A menudo se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente desde el término N. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables se denominan "regiones marco".

Tal como se emplea en la presente memoria, "V_H" o "VH" se refiere a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluida la cadena pesada de un fragmento F_v, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab')₂. La referencia a "V_L" o "VL" se refiere a la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluida la cadena ligera de un fragmento F_v, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab')₂.

Un "anticuerpo policlonal" es un anticuerpo que se produjo entre o en presencia de uno o más de otros anticuerpos no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de varios

otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Usualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

5 Un "anticuerpo monoclonal", tal como se emplea en la presente memoria, es un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que forman esta población son esencialmente idénticos, excepto por mutaciones posiblemente naturales, que podrían estar presentes en cantidades menores. Estos anticuerpos se dirigen contra un solo epítipo y son por lo tanto altamente específicos.

10 Un "epítipo" es el sitio en el antígeno al que se une un anticuerpo. Si el antígeno es un polímero, tal como una proteína o polisacárido, el epítipo se puede formar por residuos contiguos o residuos no contiguos acercados mediante el pliegue de un polímero antigénico. En las proteínas, los epítopos formados por aminoácidos contiguos típicamente son retenidos en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por aminoácidos no contiguos típicamente se pierden ante dicha exposición.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término " K_D " se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno particular.

15 La presente invención procede a partir de nuevos anticuerpos murinos anti-CD38, en este documento 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 que se caracterizan totalmente con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera, la identificación de las CDR, la identificación de aminoácidos superficiales, y medios para su expresión en forma recombinante. El aminoácido primario y las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, y de las versiones humanizadas, se describen en este documento.

20 Las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos murinos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 anti-CD38 se han depositado en American Type Culture Collection (10801 University Bid, Manassas, VA, 20110-2209, EE. UU.), el 21 de junio de 2006, bajo los números de depósito PTA-7667, PTA-7669, PTA-7670, PTA-7666, PTA-7668 y PTA-7671, respectivamente.

25 La presente descripción no se limita a los anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. Por lo tanto, se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que pueden diferir de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 o los derivados humanizados en las secuencias de aminoácidos de su andamio, CDR, cadena ligera y cadena pesada.

30 La presente descripción da a conocer anticuerpos o sus fragmentos de unión al epítipo que comprenden una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36. Como se describe, los anticuerpos comprenden por lo menos una cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 31, 32 y 33, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35 y 36.

35 Preferiblemente, los anticuerpos de la descripción comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17 y 18. En otra realización más preferida, se da a conocer un anticuerpo 38SB19, que comprende por lo menos una cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NOS: 16, 17 y 18.

40 Preferiblemente, los anticuerpos anti-CD38 de la descripción comprenden una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. Más preferiblemente, se da a conocer un anticuerpo 38SB19 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 42.

45 Se dan a conocer también anticuerpos que comprenden una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54. Preferiblemente, se da a conocer un anticuerpo 38SB19 que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

Anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 quiméricos y humanizados

50 Tal como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo en el cual la región constante, o una porción de esta, es alterada, reemplazada o intercambiada, de forma tal que la región variable se une a una región constante de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. "Anticuerpo quimérico" también se refiere a un anticuerpo en el que la región variable, o su porción, se altera, reemplaza o intercambia, de forma tal que la región constante se une a una región variable de una especie diferente o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se

conocen en la técnica. Véanse, p. ej., Morrison, 1985, Science, 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques, 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods, 125: 191-202; patente de EE. UU. núm. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

En una realización de la invención, se dan a conocer las versiones quiméricas de 38SB19. En particular, dichas versiones quiméricas contienen por lo menos una región constante humana. En una realización más preferida, esta región constante humana es la región constante humana IgG1/Kappa.

La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. La meta de humanización es una reducción en la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo murino, para introducción en un ser humano, mientras se mantienen la afinidad y especificidad del anticuerpo para la unión total al antígeno. Los anticuerpos humanizados, o los anticuerpos adaptados para no rechazo de otros mamíferos, se pueden producir usando tecnologías tales como reacondicionamiento de superficie e injerto de CDR. Tal como se emplea en la presente memoria, la tecnología de reacondicionamiento de superficie utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de las regiones variables del anticuerpo para que se asemejen a las superficies de anticuerpos conocidos al hospedante. La tecnología de injerto de CDR implica sustituir las regiones determinantes de complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, por un dominio de marco humano, p. ej., ver el documento WO 92/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados preferiblemente poseen regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas sustancialmente o exclusivamente de las correspondientes regiones de anticuerpos humanos y CDR derivadas sustancialmente o exclusivamente de un mamífero distinto de un ser humano.

Las estrategias y métodos para el acondicionamiento de superficie de los anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un hospedante distinto, se describen en la patente de Estados Unidos 5.639.641. En síntesis, en un método preferido, (1) se generan las alineaciones de posición de regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo para dar un conjunto de posiciones expuestas a la superficie marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera en donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son por lo menos aproximadamente 98% idénticas; (2) se define un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos a la superficie marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (o su fragmento); (3) se identifica un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos a la superficie marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera que es el más idéntico al conjunto de residuos de aminoácidos expuestos a la superficie del roedor; (4) el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos a la superficie marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos a la superficie marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera identificado en la etapa (3), excepto por aquellos residuos de aminoácidos que están dentro de 5 Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

Los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de otras técnicas que incluyen injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; patentes de EE. UU. núm. 5.530.101; y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento de superficie (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering, 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, PNAS, 91: 969-973) y transposición de cadenas (patente de EE. UU. núm. 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden estar hecho de una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluidos métodos de exhibición de fagos. Ver también las patentes de EE. UU. núm. 4.444.887, 4.716.111, 5.54.806 y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales números WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

La presente invención da a conocer anticuerpos humanizados que reconocen CD38 e inactivan las células CD38⁺ por apoptosis, ADCC y CDC. En una realización adicional, los anticuerpos humanizados o sus fragmentos de unión al epítipo de la invención son capaces de inactivar dichas células CD38⁺ por apoptosis incluso en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma.

Una realización preferida de dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado 38SB19.

En realizaciones más preferidas, se dan a conocer versiones humanizadas o con acondicionamiento de superficie del anticuerpo 38SB19 en donde los residuos expuestos a la superficie del anticuerpo o sus fragmentos se reemplazan tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada para asemejarse más a las superficies de anticuerpos humanos conocidos. Los anticuerpos humanizados 38SB19 de la presente invención poseen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados 38SB19 o sus fragmentos de unión al epítipo reconocen específicamente la proteína CD38. Los anticuerpos humanizados 38SB19 tienen la capacidad adicional de inactivar una célula CD38⁺, por apoptosis, ADCC y CDC.

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 se caracterizan totalmente en este documento con respecto a sus respectivas secuencias de aminoácidos de las

regiones variables de las cadenas ligera y pesada, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos superficiales, y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante.

5 Las CDR de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 se identifican por modelado y sus estructuras moleculares se han pronosticado. Nuevamente, si bien las CDR son importantes para el reconocimiento de epítomos, no son esenciales para los anticuerpos y fragmentos de la invención. Por consiguiente, se dan a conocer anticuerpos y fragmentos que tienen propiedades mejoradas producidas, por ejemplo, por maduración de afinidad de un anticuerpo.

10 Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, y las secuencias de sus CDR, no se conocían previamente y se exponen en esta solicitud. Dicha información se puede usar para producir versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39. Estos anticuerpos anti-CD38 humanizados o sus derivados se pueden usar también como el agente de unión a las células.

15 Por lo tanto, en una realización, la presente descripción da a conocer una versión humanizada de 38SB19, que comprende por lo menos una cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende tres regiones secuenciales determinantes de complementaridad que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 14 y 15, y en donde dicha cadena ligera comprende tres regiones secuenciales determinantes de complementaridad representadas por SEQ ID NOS: 16, 17 y 18.

20 En una realización preferida, se da a conocer un anticuerpo 38SB19 humanizado que comprende una V_H que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.

En otra realización, se da a conocer un anticuerpo humanizado 38SB19 que comprende una V_L que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NOS: 62 y 64.

25 Los anticuerpos humanizados 38SB19 descritos en este documento pueden además incluir sustituciones en los residuos de aminoácidos de las cadenas ligera y/o pesada en una o más posiciones definidas por los residuos grises de la Tabla 1A y 1B que representan los residuos marco de superficie murinos que se han cambiado del residuo murino original al correspondiente residuo de superficie marco en el anticuerpo humano, 28E4. Los residuos con asterisco (*) en la Tabla 1B corresponden a las retromutaciones murinas en la variante humanizada de la cadena ligera 38SB19 (SEQ ID NO:65). Los residuos para las retromutaciones son proximales a las CDR y se escogieron como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5.639.641 o en analogía a la selección de residuos que en intentos de inmunización previos resultaron en una reducción de la afinidad de unión al antígeno (Roguska et al., 1996, publicaciones de solicitudes de patentes de EE. UU. 2003/0235582 y 2005/0118183).

30

Asimismo, los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, y sus fragmentos de unión al epítomo pueden también incluir sustitución en los residuos de aminoácidos de las cadenas ligera y/o pesada.

Polinucleótidos, vectores y células hospedantes

35 Se dan a conocer ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-CD38 de la invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena ligera y/o una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-CD38. En una realización preferida, un ácido nucleico simple codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-CD38 y otra molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CD38.

40 Como se describe, se dan a conocer polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72. Preferiblemente, un polinucleótido de la descripción se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 y 71.

45 La invención da a conocer vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. En una realización, el vector contiene un polinucleótido que codifica una cadena pesada de una inmunoglobulina anti-CD38. En otra realización, dicho polinucleótido codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CD38. La invención también da a conocer vectores que comprenden moléculas de polinucleótidos que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de estos.

50 Con el fin de expresar la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-CD38 de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas pesada y/o ligera se insertan en vectores de expresión de modo tal que los genes se enlazan operativamente a las secuencias de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, YAC, cósmidos, retrovirus, episomas derivados de EBV y todos los demás vectores que el experto en la técnica conoce como convenientes para asegurar la expresión de dichas cadenas pesada y/o ligera. El experto en la técnica se dará cuenta de que los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden clonar en

distintos vectores o en el mismo vector. En una realización preferida, dichos polinucleótidos se clonan en el mismo vector.

5 Los polinucleótidos y vectores de la invención que comprenden estas moléculas se pueden usar para la transformación de una célula hospedante en un mamífero adecuado. La transformación puede ser cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en el hospedante de una célula. El experto conoce dichos métodos que incluyen transformación mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido en liposomas, inyección biolística y micronejcción directa de ADN en los núcleos.

Fragmentos de anticuerpo

10 Tal como se emplea en la presente memoria, "fragmentos de anticuerpo" incluye cualquier porción de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud total, en general denominado "fragmento de unión al epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitarse a ello, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs unidos a disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o bien una VL o una VH. Los fragmentos de unión al epítipo, incluidos anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender una o más regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

15 Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDR de todo el anticuerpo, aunque los fragmentos que contienen menos de todas esas regiones, como tres, cuatro o cinco CDR, son también funcionales. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar miembros de cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y sus subclases.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden producir por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')₂).

25 Los fragmentos "FVs de cadena sencilla" ("scFvs") son fragmentos de unión al epítipo que contienen por lo menos un fragmento de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (V_H) unido a por lo menos un fragmento de una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L). El enlazador puede ser un péptido corto y flexible seleccionado para asegurar que ocurra el correcto pliegue tridimensional de las regiones V_L y V_H una vez que se enlazan como para mantener la especificidad de unión de la molécula diana de todo el anticuerpo del cual deriva el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. El término carboxilo de la secuencia V_L o V_H puede estar covalentemente unido por un enlazador al término aminoácido de una secuencia V_L o V_H complementaria.

30 Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla contienen secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos una de las regiones variables o determinantes de complementaridad (CDR) de los anticuerpos completos descritos en esta solicitud, pero carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión al antígeno, pero constituyen una porción importante de la estructura de los anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla pueden por lo tanto superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte o todo un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de interacciones indeseadas entre las moléculas biológicas y la región constante de la cadena pesada, u otra actividad biológica indeseada. Además, los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden por lo tanto tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos enteros, lo cual permite a los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla localizar y unirse a sitios diana de unión al antígeno de manera más eficiente. A su vez, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir en una escala relativamente grande en células procariontas, facilitando de este modo su producción. Asimismo, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla los hace menos propensos a provocar una respuesta inmune en un receptor que los anticuerpos enteros.

45 Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla se pueden generar por técnicas de clonación molecular, biblioteca de exhibición de fagos de anticuerpos o técnicas similares conocidas por el experto en la materia. Estas proteínas se pueden producir, por ejemplo, en células eucariotas o células procariontas, incluidas bacterias. Los fragmentos de unión al epítipo también se pueden generar usando distintos métodos de exhibición de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de exhibición de fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se exhiben en la superficie de las partículas del fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, dicho fago se puede utilizar para exhibir dominios de unión al epítipo expresados a partir de un repertorio de una biblioteca de anticuerpos combinatoria (p. ej., humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión al epítipo que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, p. ej., usar antígeno marcado o capturado a una perla o superficie sólida. El fago utilizado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso que incluye los dominios de unión a fd y M13 expresados a partir del fago con Fab, Fv o dominios de anticuerpo Fv estabilizados con disulfuro condensados en forma recombinante o bien a la proteína del gen III o el gen VIII del fago.

Los ejemplos de métodos de exhibición de fagos que se pueden utilizar para elaborar los fragmentos de unión al epítipo de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57: 191-280; WO/1992/001047; 5 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y en las patentes de EE. UU. núm. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Después de la selección de fagos, las regiones del fago que codifican los fragmentos se pueden aislar y utilizar para generar los fragmentos de unión al epítipo a través de la expresión en un hospedante seleccionado, incluidas 10 células mamíferas, células de insectos, células de plantas, levadura y bacterias, usando tecnología de ADN recombinante, p. ej., como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir fragmentos de Fab, Fab' y F(ab')₂ en forma recombinante también se pueden emplear usando métodos conocidos en la técnica como aquellos descritos en el documento WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34: 26-34; y Better et al., 1988, Science, 240:1041-1043. Los ejemplos de técnicas que se pueden 15 utilizar para producir Fvs de cadena sencilla y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las patentes de EE. UU. núm. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology, 203: 46-88; Shu et al., 1993, PNAS, 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science, 240:1038-1040.

La presente invención también incluye conjugados citotóxicos. Estos conjugados citotóxicos comprenden dos componentes primarios, un agente de unión a la célula y un agente citotóxico.

20 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "agente de unión a la célula" se refiere a un agente que reconoce específicamente y se une a la proteína CD38 en la superficie celular. En una realización, el agente de unión a la célula reconoce específicamente CD38 de modo tal que permite que los conjugados actúen en un modo dirigido con pocos efectos colaterales a partir de una unión no específica.

En otra realización, el agente de unión a la célula de la presente invención también reconoce específicamente la 25 proteína CD38 de modo que los conjugados entran en contacto con la célula diana por un periodo de tiempo suficiente para permitir que la porción citotóxica del fármaco del conjugado actúe sobre la célula y/o para permitir a los conjugados tiempo suficiente para ser internalizados por la célula.

En una realización preferida, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo anti-CD38 de acuerdo con la presente invención como el agente de unión a la célula. El anticuerpo 38SB19 es capaz de reconocer 30 específicamente CD38, y dirige el agente citotóxico a una célula o un tejido anormal, como las células de cáncer, en un modo dirigido.

El segundo componente de los conjugados citotóxicos de la presente invención es un agente citotóxico. La expresión "agente citotóxico", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una sustancia que reduce o 35 bloquea la función, o el crecimiento, de las células y/o causa la destrucción de las células.

En realizaciones preferidas, el agente citotóxico es un fármaco pequeño, un profármaco, un taxoide, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un derivado de tomaimicina, un derivado de leptomicina, CC-1065 o un análogo de CC-1065. En realizaciones preferidas, los agentes de unión a la célula de la presente invención se unen en forma 40 covalente, directamente o mediante un enlazador escindible o no escindible, al agente citotóxico.

Los agentes de unión a la célula, agentes citotóxicos y enlazadores se analizan en más detalle a continuación.

40 Agentes de unión a la célula

La efectividad de los compuestos de la presente descripción como agentes terapéuticos depende de la selección cautelosa de un agente de unión a la célula apropiado. Los agentes de unión a la célula pueden ser cualquier clase 45 actualmente conocida, o que se torne conocida, e incluyen péptidos y no péptidos. El agente de unión a la célula puede ser cualquier compuesto que se una a una célula, o bien en un modo específico o no específico. En general, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (como transferrina), o cualquier otra sustancia o molécula de unión a la célula.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a la célula que se pueden utilizar incluyen:

- a) anticuerpos policlonales;
- 50 b) anticuerpos monoclonales;
- c) fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab' y F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, J. Immunol., 131: 2895-2902; Spring et al., 1974, J. Immunol., 113: 470-478; Nisonoff et al., 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244);

En particular, un anticuerpo monoclonal anti-CD38 seleccionado entre 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 se puede usar como agente de unión a la célula. Asimismo, dicho agente de unión celular puede ser una versión quimérica de uno de los anticuerpos monoclonales 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado anti-CD38 se usa como el agente de unión celular. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado anti-CD38 se selecciona entre anticuerpos humanizados o con acondicionamiento de superficie 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39.

Agentes citotóxicos

En otra realización, el anticuerpo humanizado se puede conjugar a un fármaco, tal como un maitansinoide, para formar un profármaco que tiene citotoxicidad específica hacia las células que expresan el antígeno direccionando el fármaco hacia la proteína CD38. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño altamente tóxico (p. ej., maitansinoides, taxanos, derivados de tomamicina, leptomicina y análogos de CC-1065) se pueden usar como un agente terapéutico para el tratamiento de tumores tales como linfoma, leucemia y mieloma múltiple.

El agente citotóxico utilizado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser un compuesto que resulta en la muerte de una célula o que induce muerte celular o en algún modo disminuye la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoides, taxoides, derivados de tomamicina, derivados de leptomicina, CC-1065 y análogos de CC-1065, dolastatina y análogos de dostatina definidos a continuación. Estos agentes citotóxicos se conjugan a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos, como se describe en este documento

Los conjugados citotóxicos se pueden preparar por métodos *in vitro*. Con el fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados se conocen en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa y grupos lábiles de esterasa. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, los conjugados se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

Maitansinoides

Entre los agentes citotóxicos que se pueden utilizar en la presente invención para formar un conjugado citotóxico se encuentran los maitansinoides y análogos de maitansinoides. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y son altamente tóxicos para células mamíferas.

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados se describen en las patentes de E.E. UU. núm. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) descloro C-19 (patente de EE. UU. núm. 4.256.746) (preparado por reducción de LAH de ansamitocina P2);

(2) hidroxil C-20 (o desmetilo C-20) descloro +/-C-19 (patentes de EE. UU. núm. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando Streptomyces o Actinomyces o descloración usando LAH); y

(3) desmetoxi C-20, aciloxi C-20 (-OCOR), +/-descloro (patente de EE. UU. núm. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

(1) SH C-9 (Pat. estadounidense núm. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

(2) alcóximetilo C-14 (desmetoxi/CH₂OR) (Pat. estadounidense núm. 4.331.598);

(3) hidroximetilo C-14 o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (Pat. estadounidense núm. 4.450.254) (preparado por Nocardia);

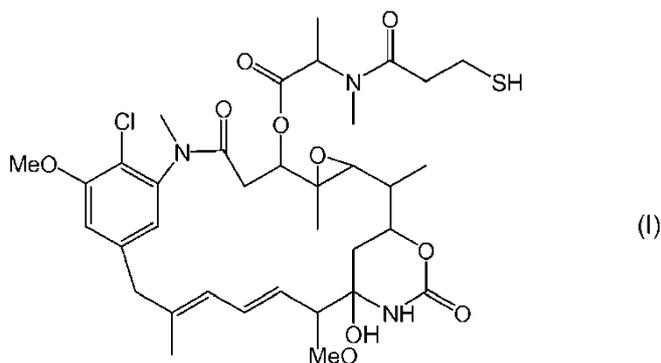
(4) hidroxil C-15/aciloxil (Pat. estadounidense núm. 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por Streptomyces);

(5) metoxil C-15 (Pat. estadounidenses núm. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

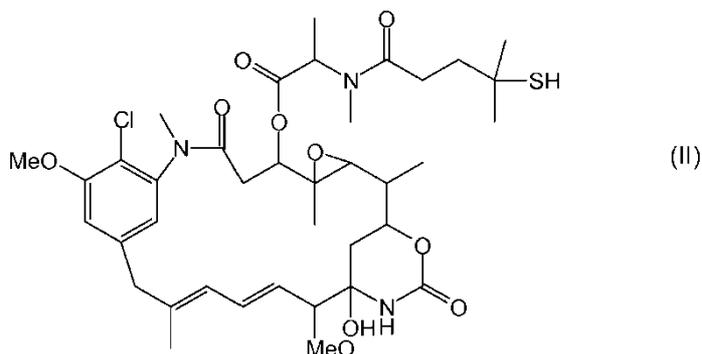
(6) N-desmetilo C-18 (Pat. estadounidenses núm. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y

(7) 4,5-desoxi (Pat. estadounidense núm. 4.371.533) (preparado por reducción de tricloruro de titanilo/LAH de maitansinol).

- 5 En una realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol DM1), formalmente denominado N2'-desacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 se representa con la siguiente fórmula estructural (I):

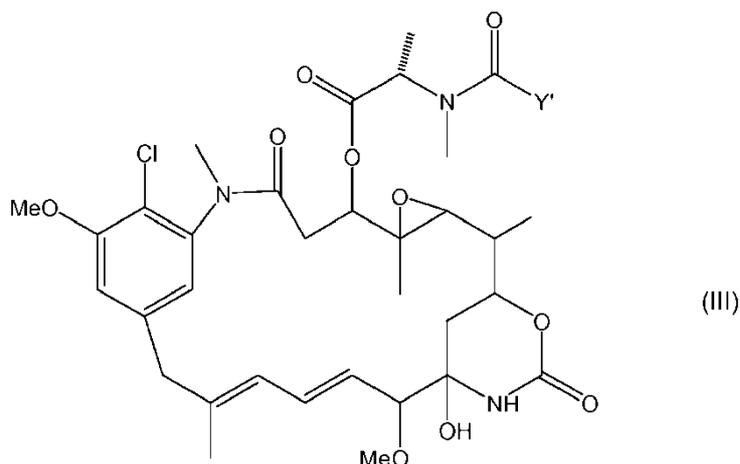


- 10 En otra realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contienen tiol N2'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como el agente citotóxico. DM4 se representa con la siguiente fórmula estructural (II):



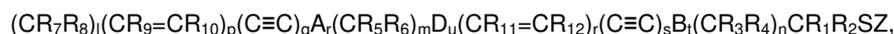
- 15 En otras realizaciones de la invención, se pueden usar otras maitansinas, incluidos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que portan una mono o di-alquil sustitución en el átomo de carbono que porta el átomo de azufre. Estas incluyen un maitansinoide que tiene, en hidroximetilo C-3, C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20, una cadena lateral de aminoácidos acilada con un grupo acilo que porta un grupo sulfhidrilo obstaculizado, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que porta la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, en donde dichos sustituyentes son CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo cíclico o alqueno que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además en donde uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de la cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.
- 20

Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde:

Y' representa



5 en donde:

R₁ y R₂ son cada uno en forma independiente CH₃, C₂H₅, alquilo lineal o alquenilo que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico o alquenilo que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

10 A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3 -10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁ y R₁₂ son cada uno en forma independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo lineal o alquenilo que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico o alquenilo que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

15 l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno en forma independiente 0 o un número entero entre 1 y 5, siempre que por lo menos de dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en cualquier momento; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo lineal o alquenilo que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, o radical arilo simple o sustituido o heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

Las realizaciones preferidas de fórmula (III) incluyen compuestos de fórmula (III) en donde:

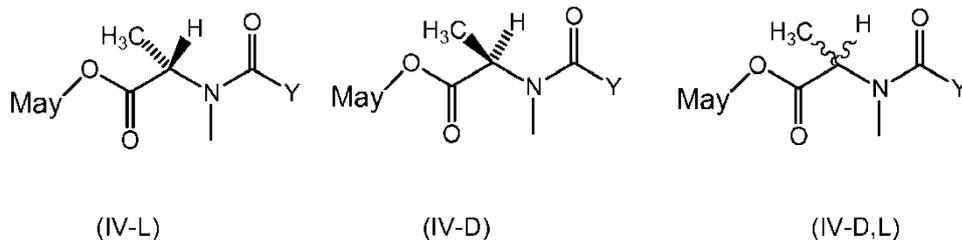
20 R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

R₁ es H, R₂ es metilo y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D) o (IV-D,L):



25 en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde:

5 R_1 y R_2 son cada uno en forma independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno en forma independiente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno en forma independiente un número entero entre 1 y 5, y además n puede ser 0;

10 Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que porta la cadena lateral en hidroximetilo C-3, C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20.

15 Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en donde:

R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0 y Z es H.

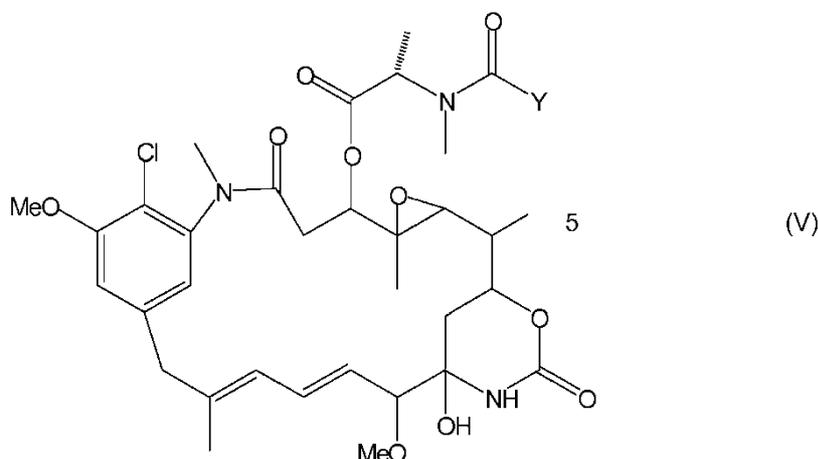
R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

20 R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

Preferiblemente, el agente citotóxico se representa con la fórmula (IV-L).

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



en donde:

25 Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

en donde:

R_1 y R_2 son cada uno en forma independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

30 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno en forma independiente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno en forma independiente un número entero entre 1 y 5, y además n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

5 Las realizaciones preferidas de fórmula (V) incluyen compuestos de fórmula (V) en donde:

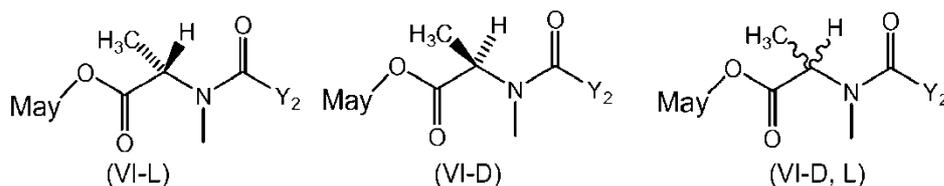
R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

10 Dichas maitansinas adicionales incluyen además compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D) o (VI-D,L):



en donde:

Y₂ representa (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂,

en donde:

15 R₁ y R₂ son cada uno en forma independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

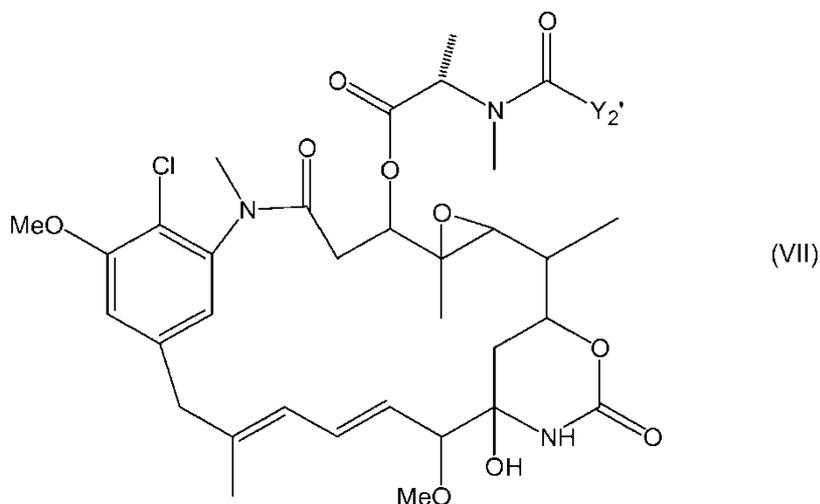
20 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno en forma independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o cíclico que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno en forma independiente un número entero entre 1 y 5, y además n puede ser 0;

Z₂ es SR o COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

25 May es un maitansinoide.

Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



en donde:

Y_2' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

5 en donde:

R_1 y R_2 son cada uno en forma independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

10 A, B y D son cada uno en forma independiente cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} y R_{12} son cada uno en forma independiente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

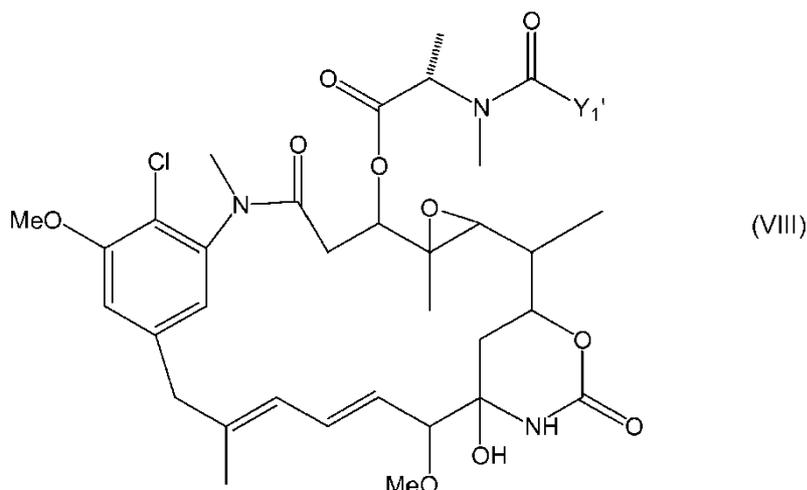
15 l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno en forma independiente 0 o un número entero entre 1 y 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de fórmula (VII) incluyen compuestos de fórmula (VII) en donde: R_1 es H y R_2 es metilo.

20 Los maitansinoides anteriormente mencionados se pueden conjugar a anticuerpo anti-CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 o su homólogo o fragmento, en donde el anticuerpo se une al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácidos acilada que se halla en hidroximetilo C-3, C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácidos acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro localizada en el átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, en donde dichos sustituyentes son CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de la cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

30 Un conjugado preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38 38SB19 conjugado a un maitansinoide de fórmula (VIII):



en donde:

Y₁' representa

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sBt(CR_3R_4)_nCR_1R_2S^-$,

5 en donde:

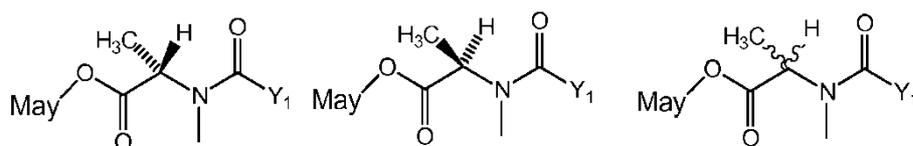
A, B y D, son cada uno en forma independiente cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3 -10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno en forma independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

l, m, n, o, p, q, r, s y t son cada uno en forma independiente 0 o un número entero entre 1 y 5, siempre que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

Preferiblemente, R₁ es H y R₂ es metilo, o R₁ y R₂ son metilo.

15 Un conjugado incluso más preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38 38SB19 conjugado a un maitansinoide de fórmula (IX-L), (IX-D) o (IX-D,L):



IX-L

IX-D

IX-D,L

en donde:

Y₁ representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S^-$,

en donde:

20 R₁ y R₂ son cada uno en forma independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

25 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno en forma independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene entre 3 y 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno en forma independiente un número entero entre 1 y 5, y además n puede ser 0; y

May representa un maitansinol que porta la cadena lateral en hidroximetilo C-3, C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20.

Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) en donde:

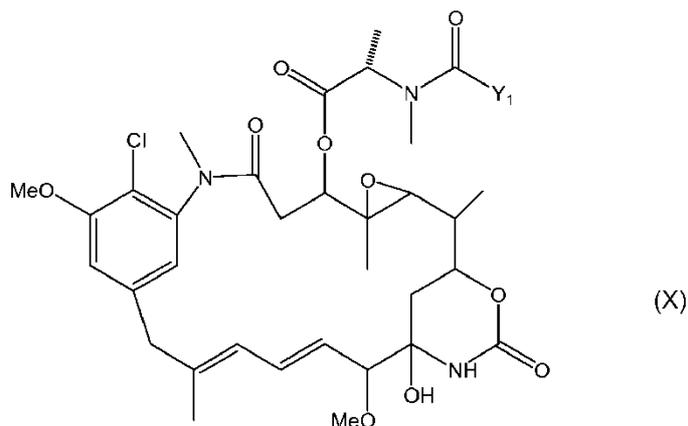
R₁ es H y R₂ es metilo, o R₁ y R₂ son metilo,

5 R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0,

R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

Preferiblemente, el agente citotóxico es representado por la fórmula (IX-L).

Otro conjugado preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38 38SB19 conjugado a un maitansinoide de fórmula (X):



10

en donde los sustituyentes son como se definieron para la fórmula (IX) anterior.

Se prefieren especialmente cualquiera de los compuestos anteriormente descritos, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0.

15 Se prefieren especialmente cualquiera de los compuestos anteriormente descritos, en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0

Además, se prefiere el estereoisómero L-aminoacilo.

Cada uno de los maitansinoides descritos en la solicitud de patente de EE. UU. en trámite número 10/849.136, presentada el 20 de mayo de 2004, también se puede usar en el conjugado citotóxico de la presente invención.

Grupos de enlace que contienen disulfuro

20 Con el fin de enlazar el maitansinoide a un agente de unión a la célula, tal como el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39, el maitansinoide comprende un resto de enlace. El resto de enlace contiene un enlace químico que permite la liberación de maitansinoides totalmente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados se conocen en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces lábiles ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles y enlaces esterasa lábiles. Se prefieren los enlaces disulfuro.

25 El resto de enlace puede además comprender un grupo químico reactivo. El grupo químico reactivo se puede unir en forma covalente al maitansinoide mediante un resto de enlace disulfuro.

Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son N-succinimidil ésteres y N-sulfosuccinimidil ésteres.

30 Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto de enlace que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos en lo que el resto de enlace contiene un enlace disulfuro y el grupo reactivo químico comprende un éster N-succinimidilo o N-sulfosuccinimidilo.

Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto de enlace. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo se espera que sean útiles. No obstante, se prefiere la posición C-3 y especialmente la posición C-3 de maitansinol.

5 Si bien la síntesis de ésteres de maitansinol que tiene un resto de enlace se describe en términos de restos de enlace que contienen enlaces disulfuro, el experto en la técnica entenderá que los restos de enlace con otros enlaces químicos (como se describió anteriormente) también se pueden utilizar con la presente invención, como también otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces lábiles ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces peptidasa lábiles y enlaces esterasa lábiles. La descripción de la patente de EE. UU. núm. 5.208.020 describe la producción de maitansinoides que portan dichos enlaces.

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que porta un grupo reactivo se describe en las patentes de EE. UU. núm. 6.441.163 y 6.333.410, y la solicitud de EE. UU. núm. 10/161.651.

10 Los maitansinoides que contienen grupos reactivos, tales como DM1, se someten a reacción con un anticuerpo, tal como el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39, para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados se pueden purificar por HPLC o por filtración en gel.

15 Se dan a conocer varios esquemas excelentes para producir dichos conjugados anticuerpo-maitansinoide en la patente de EE. UU. núm. 6.333.410 y en las solicitudes de patentes de EE. UU. núm. 09/867.598, 10/161.651 y 10/024.290.

En general, una disolución de un anticuerpo en tampón acuoso se puede incubar con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que porta un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede inactivar por adición de exceso de amina (como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado maitansinoide-anticuerpo puede luego purificarse por filtración en gel.

20 El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo por espectrofotometría la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo.

25 Se puede evaluar la capacidad de los conjugados de anticuerpos con fármacos maitansinoides de suprimir la proliferación de diversas líneas celulares indeseadas *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea celular de linfoma humano Daudi, la línea celular de linfoma humano Ramos, la línea celular de mieloma múltiple humano MOLP-8 y la línea de leucemia linfocítica aguda de células T humana MOLT-4 se pueden usar fácilmente para la evaluación de citotoxicidad de estos compuestos. Las células que se han de evaluar se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y las fracciones sobrevivientes de las células medirse en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores CI50 pueden luego calcularse a partir de los resultados de los ensayos.

30 Grupos de enlace que contienen PEG

35 Los maitansinoides pueden además enlazarse a agentes de unión celular usando grupos de enlace que contienen PEG, como se expone en la solicitud de EE. UU. núm. 10/024.290. Estos grupos de enlace que contienen PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y se pueden utilizar para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión celular. Los grupos de enlace que contienen PEG ilustrativos incluyen enlazadores PEG heterobifuncionales que se unen a agentes citotóxicos y a agentes de unión celular en extremos opuestos de los enlazadores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo, y un éster activo en el otro extremo.

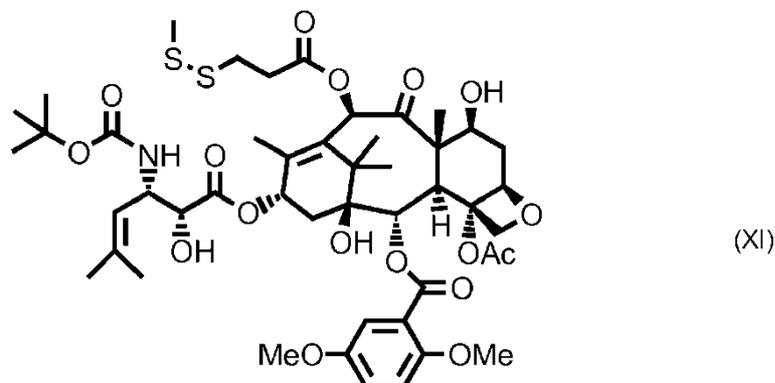
40 Como ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico que usa un grupo de enlace que contiene PEG, se hace referencia nuevamente a la solicitud de EE. UU. núm. 10/024.290 para detalles concretos. La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que portan un resto PEG reactivo con un agente de unión a la célula, lo que resulta en el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto PEG reactivo por un residuo de aminoácido del agente de unión a la célula, para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos en forma covalente a un agente de unión a la célula a través de un grupo de enlace que contiene PEG.

45 Taxanos

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención puede además ser un taxano o un derivado de este.

50 Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (Taxol), un producto natural citotóxico y docetaxel (Taxotere), un derivado semisintético, dos compuestos utilizados ampliamente en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos del huso mitóticos que inhiben la despolimerización de tubulina, lo que resulta en la muerte celular. Si bien el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad anti tumoral es limitada debido a su toxicidad no específica hacia las células normales. Asimismo, los compuestos como el paclitaxel y el docetaxel no son por sí mismos lo suficientemente potentes para usarse en conjugados de agentes de unión celular.

Un taxano preferido para uso en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de fórmula (XI):



Los métodos para sintetizar taxanos que se pueden utilizar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con métodos para conjugar los taxanos a los agentes de unión a la célula, se describen en detalle en las patentes de EE. UU. núm. 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, y en las solicitudes de EE. UU. núm. 10/024.290, 10/144.042, 10/207.814, 10/210.112 y 10/369.563.

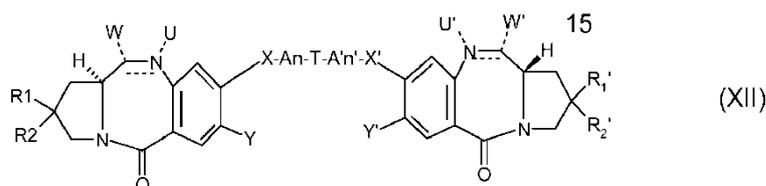
Derivados de tomamicina

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención puede además comprender un derivado de tomamicina. Los derivados de tomamicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas por unión covalente al N2 de guanina en el surco menor del ADN. Los PBD incluyen un número de aglutinantes del surco menor tales como antramycin, neotramycin y DC-81.

Los nuevos derivados de tomamicina que retienen alta citotoxicidad y que pueden enlazarse eficazmente a los agentes de unión celular se describen en la solicitud internacional núm. PCT/IB2007/000142. Los complejos de agente de unión celular-derivado de tomamicina permiten la medición completa de la acción citotóxica de los derivados de tomamicina que se han de aplicar en un modo dirigido contra células indeseadas solamente, evitando así los efectos colaterales debidos a daño a células sanas no dirigidas.

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención comprende uno o más derivados de tomamicina, enlazados a un agente de unión celular, como el anticuerpo 38SB19, mediante un grupo de enlace. El grupo de enlace es parte de un resto químico que se une en forma covalente a un derivado de tomamicina a través de métodos convencionales. En una realización preferida, el resto químico se puede unir en forma covalente al derivado de tomamicina mediante un enlace disulfuro.

Los derivados de tomamicina útiles en la presente invención tienen la fórmula (XII) que se muestra a continuación:



en donde

---- representa un enlace sencillo opcional;

==== representa o bien un enlace sencillo o un doble enlace;

siempre que cuando ---- represente un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representen en forma independiente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionen en forma independiente del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (p. ej., un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO3 -, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, un azido

tal como -N3, un ciano, un halo, un triarilquil o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácidos; preferiblemente W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe;

y cuando ---- representa un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

- 5 ▪ R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre haluro o alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arilo, Het, S(O)_qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

Preferiblemente, R1 y R2, y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

- 10 ▪ B y B' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre alqueno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arilo, Het, S(O)_qR o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= =CH₂ o =CH-CH₃,

▪ X, X' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre uno o más -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Preferiblemente, X=X'.

- 15 Más preferiblemente, X=X'=O.

▪ A, A' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre alquilo o alqueno que opcionalmente contiene un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arilo, Het, Alquilo, Alqueno.

Preferiblemente, A=A'.

- 20 Más preferiblemente, A=A'=alquilo lineal insustituido.

▪ Y, Y' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre H, OR;

Preferiblemente, Y=Y'.

Más preferiblemente, Y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

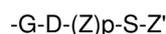
- 25 ▪ T es -NR-, -O-, -S(O)_q-, o un arilo, cicloalquilo, heterocíclico o heteroarilo de 4 a 10 miembros, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR y/o enlazador(es), o un alquilo ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR y/o enlazador(es), o un alquilo lineal sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR y/o enlazador(es).

Preferiblemente, T es un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo, opcionalmente sustituido con uno o más enlazadores.

- 30 Dicho enlazador comprende un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados se conocen en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, tioéter, grupos ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y los grupos tioéter.

35 Cuando el grupo de enlace es un grupo que contiene tiol -, sulfuro (o el llamado tioéter-S-) o disulfuro (-S-S-) -, la cadena lateral que porta el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser un heterocíclico lineal o ramificado, aromático. El experto en la técnica puede identificar fácilmente las cadenas laterales adecuadas.

Preferiblemente, dicho enlazador es de la fórmula:



en donde

G es un enlace sencillo o doble, -O-, -S- o -NR-;

- 40 D es un enlace sencillo o -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

en donde E y F son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre - (OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j- lineal o ramificado, -Alquil(OCH₂CH₂)_i-Alquilo-, -(OCH₂CH₂)_i-, -

5 (OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-, - (OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-, - (OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_i-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclico-Alquilo-, -Alquil-Heterocíclico-, -AlquilAril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquilo-;

en donde i y j, idénticos o diferentes, son números enteros y se seleccionan en forma independiente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquilo- lineal o ramificado;

p es 0 o 1;

10 Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R20 o SR20, en donde R20 representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o heterocíclico, siempre que cuando Z' es H, dicho compuesto esté en equilibrio con el correspondiente compuesto formado por ciclización intramolecular resultante de la adición del grupo tiol -SH en el enlace imina -NH= de uno de los restos PBD.

▪ n, n', iguales o diferentes son 0 o 1.

15 ▪ q es 0, 1 o 2.

▪ R, R' son iguales o diferentes y se seleccionan en forma independiente entre H, Alquilo, Arilo, cada uno opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arilo, Het;

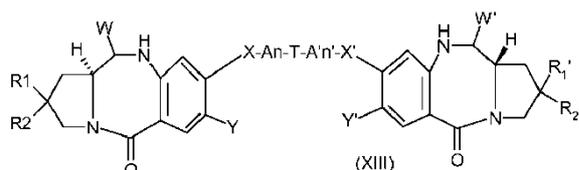
o sus sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimorfas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

20 Los compuestos de la fórmula general (XII) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también forman parte de la invención.

Se sabe que los derivados de tomamicina de doble enlace N-10, C-11 de fórmula (XII) son fácilmente convertibles en un modo reversible a los correspondientes aductos de imina en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible y se puede regenerar fácilmente a los correspondientes derivados de tomamicina en presencia de un agente deshidratante, en un disolvente orgánico no prótico, al vacío o a altas temperaturas (Z. Tozuka, 1983, J. Antibiotics, 36: 276).

25 correspondientes derivados de tomamicina en presencia de un agente deshidratante, en un disolvente orgánico no prótico, al vacío o a altas temperaturas (Z. Tozuka, 1983, J. Antibiotics, 36: 276).

Por lo tanto, los derivados reversibles de tomamicina de fórmula general (XIII) también se pueden utilizar en la presente invención:



30 en donde A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' son como se definen en la fórmula (XII) y W, W' son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (p. ej., un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como -SO₃-, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente una amina cíclica tal que N10 y C11 son parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como -N₃, un ciano, un halo, un triarilquilo o triarilfosfonilo, un grupo derivado de aminoácidos. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe.

40 Los compuestos de fórmula (XIII) pueden por lo tanto considerarse como solvatos, incluida agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

En una realización preferida, los derivados de tomamicina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

8,8'-[1,3-bencenodibis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridinadiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- éster terc-butílico de ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 35 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 40 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 45 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[2-[2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

5 8,8'-[(4-(2-[2-[2-(2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

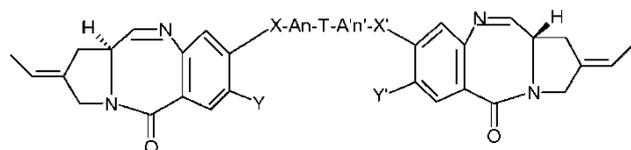
10 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

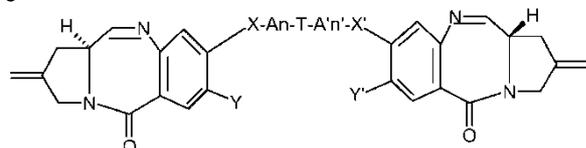
8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

15 así como también los correspondientes derivados de mercapto, o sus sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimorfas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Los compuestos preferidos son aquellos de fórmula:



o



en donde X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' son como se definió anteriormente.

25 Los compuestos de fórmula (XII) se pueden preparar en una diversidad de formas conocidas por el experto en la técnica. Los compuestos se pueden sintetizar, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos descritos a continuación, o variaciones de ellos, como apreciará el experto en la materia. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán fácilmente obvias y conocidas o fácilmente obtenibles de la bibliografía científica para el experto en la técnica. En particular, dichos métodos se pueden hallar en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

30 Los métodos para sintetizar los derivados de tomamicina que se pueden utilizar en la invención se describen en la solicitud internacional núm. PCT/IB2007/000142. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante una diversidad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida se comercializan o se sintetizan fácilmente por técnicas conocidas por el experto en la materia (ver, por ejemplo, los documentos, WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori et al., 1986, Tetrahedron, 42: 3793-3806).

35 Las moléculas del conjugado de la invención se pueden formar usando cualquier técnica. Los derivados de tomamicina de la invención se pueden enlazar a un anticuerpo o cualquier otro agente de unión celular mediante un enlazador lábil ácido, o mediante un enlazador fotolábil. Los derivados se pueden condensar con un péptido que tiene una secuencia adecuada y posteriormente enlazarse a un agente de unión a la célula para producir un enlazador de peptidasa lábil. Los conjugados se pueden preparar para contener un grupo hidroxilo primario, que se puede succinilar y enlazar a un agente de unión a la célula para producir un conjugado que se puede escindir por esterasas intracelulares para liberar derivado libre. Preferiblemente, los derivados se sintetizan para contener un grupo tiol libre o protegido, y luego uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol se enlazan en forma covalente al agente de unión celular mediante un enlace disulfuro o un enlace tioéter.

40

Numerosos métodos de conjugación se describen en los documentos USP 5.416.064 y USP 5.475.092. Los derivados de tomamicina se pueden modificar para producir un grupo amino libre y luego unirse a un anticuerpo u otro agente de unión a la célula mediante un enlazador lábil ácido o un enlazador fotolábil. Los derivados de tomamicina con un grupo carboxilo o amino libre se pueden condensar con un péptido y posteriormente enlazarse a un agente de unión a la célula para producir un enlazador de peptidasa lábil. Los derivados de tomamicina con un grupo hidroxilo libre en el enlazador se pueden succinilar y enlazar a un agente de unión celular para producir un conjugado que se puede escindir por esterasas intracelulares para liberar fármaco libre. Lo más preferiblemente, los derivados de tomamicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido, y luego dímeros de tomamicina que contienen disulfuro o tiol se enlazan al agente de unión celular mediante enlaces disulfuro.

Preferiblemente, los conjugados de anticuerpo monoclonal o agente de unión a la célula-derivado de tomamicina son aquellos que se unen mediante un enlace disulfuro, como se analizó anteriormente, que son capaces de administrar los derivados de tomamicina. Dichos conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos tal como modificando los anticuerpos monoclonales con succinimidil piridil-ditiopropionato (SPDP) (Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.*, 173: 723-737). El grupo tiopiridilo resultante se desplaza luego por tratamiento con derivados de tomamicina que contienen tiol para producir conjugados enlazados a disulfuro. Alternativamente, en el caso de los derivados de arilditio- tomamicina, la formación del conjugado de unión a la célula se efectúa por desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomamicina por grupos sulfhidrilo previamente introducidos en las moléculas de anticuerpo. Los conjugados que contienen 1 a 10 fármacos derivados de tomamicina enlazados mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquiera de los métodos.

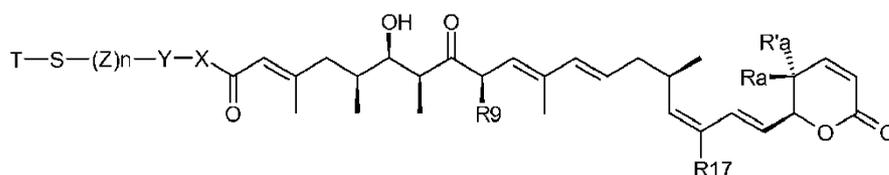
Más específicamente, una disolución del anticuerpo modificado con ditió-nitropiridilo en una concentración de 2,5 mg/ml en tampón de fosfato de potasio 0,05 M, a pH 7,5 que contiene EDTA 2 mM se trata con el derivado de tomamicina que contiene tiol (1,3 eq molares/grupo ditiopiridilo). La liberación de tio-nitropiridina del anticuerpo modificado se monitorea por espectrofotometría a 325 nm y se completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado de derivado de anticuerpo-tomamicina se purifica y libera de fármaco sin reacción y de otro material de bajo peso molecular por filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacril S300. El número de restos derivados de tomamicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo la relación de la absorbancia a 230 nm y 275 nm. Se puede enlazar un promedio de 1-10 moléculas de derivado de tomamicina/molécula de anticuerpo mediante enlaces disulfuro por este método.

El efecto de conjugación sobre la afinidad de unión hacia las células que expresan antígenos se puede determinar usando los métodos previamente descritos por Liu et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 8618-8623. La citotoxicidad de los derivados de tomamicina y sus conjugados de anticuerpo a las líneas celulares se puede medir por retro-extrapolación de las curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 3648-3651. La citotoxicidad de estos compuestos a las líneas celulares adherentes se puede determinar con ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1312-1319.

35 Derivados de leptomicina

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención puede además comprender un derivado de leptomicina. De acuerdo con la presente invención, los "derivados de leptomicina" se refieren a miembros de la familia de leptomicina como se define en Kalesse et al. (2002, *Synthesis* 8: 981-1003), e incluyen: leptomicinas, tales como leptomicina A y leptomicina B, calistatinas, ratjadonas tales como ratjadona A y ratjadona B, anguinomicinas tales como anguinomicina A, B, C, D, kasusamicinas, leptolstatina, leptofuraninas, tales como leptofuranina A, B, C, D. Se prefieren los derivados de leptomicina A y B.

Más concretamente, los derivados de la invención son de la fórmula (I):



(I)

en donde

45 Ra y Ra' son H o -Alc; preferiblemente Ra es -Alc, preferiblemente metilo y Ra' es H;

R17 es alquilo opcionalmente sustituido con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R17 es alquilo, más preferiblemente metilo o etilo;

R9 es alquilo opcionalmente sustituido con OR, CN, NRR', perfluoroalquilo; preferiblemente, R9 es alquilo, más preferiblemente metilo;

X es -O- o -NR-; preferiblemente, X es -NR-;

Y es -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-;

5 preferiblemente, cuando X es -O-, Y es -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-;

en donde U se selecciona entre -Alc lineal o ramificado, -Alc(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m-Alc-, -Alc(OCH₂CH₂)_m-Alc-, -(OCH₂CH₂)_m-, -Cicloalquilo-, -Heterocíclico-, -Cicloalquilo-Alc-, -Alc-Cicloalquilo-, -Heterocíclico-Alc-, -Alc-Heterocíclico-;

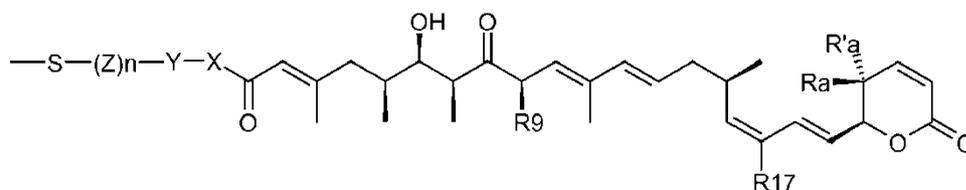
en donde m es un número entero seleccionado entre 1 y 2000;

10 preferiblemente, U es -Alc- lineal o ramificado,

Z es -Alc-;

n es 0 o 1; preferiblemente n es 0;

T representa H, un grupo protector de tiol tal como Ac, R₁ o SR₁, en donde R₁ representa H, metilo, Alc, Cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido o heterocíclico, o T representa



15

en donde:

Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n son como se definió anteriormente;

preferiblemente, T es H o SR₁, en donde R₁ representa Alc, más preferiblemente metilo;

R, R', idénticos o diferentes, son H o alquilo;

20 Alc representa un alquilo lineal o ramificado; preferiblemente Alc representa -(CH_{2-q}(CH₃)_q)_p- en donde p representa un número entero entre 1 y 10; y q representa un número entero entre 0 y 2; preferiblemente, Alc representa -(CH₂- o -C(CH₃)₂-.

o sus sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimorfas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

25 Los compuestos preferidos se pueden seleccionar entre:

(2-Metilsulfanil-etil)-amid de ácido (2E, 10E, 12E, 16Z, 18E)-(R)-6-Hidroxi-3,5, 7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico

Bis-[(2-mercaptoetil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5, 7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico]

30 (2-Mercapto-etil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11, 15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico

(2-Metildisulfanil-etil)-amid de ácido (2E, 10E, 12E, 16Z, 18E)-(R)-6-hidroxi-3,5, 7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico

35 (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amid de ácido (2E, 10E, 12E, 16Z, 18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico

(2-Mercapto-2-metil-propil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico

o sus sales, hidratos o sales hidratadas farmacéuticamente aceptables, o las estructuras cristalinas polimorfas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Con el fin de enlazar el derivado a un agente de unión a la célula, el derivado debe incluir un resto (grupo de enlace) que permita que los derivados se enlacen a un agente de unión a la célula mediante un enlace tal como disulfuro, un enlace sulfuro (o el llamado tioéter en la presente invención), un grupo lábil ácido, un grupo fotolábil, un grupo peptidasa lábil o un grupo esterasa lábil. Los derivados se preparan de forma tal de contener un resto necesario para enlazar el derivado de leptomicina a un agente de unión a la célula mediante, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un grupo lábil ácido, un grupo fotolábil, un grupo peptidasa lábil o un grupo esterasa lábil. Con el fin de potenciar más la solubilidad en disoluciones acuosas, el grupo de enlace puede contener un espaciador de polietilenglicol. Preferiblemente, un enlace sulfuro o disulfuro se usa porque el entorno reducido de la célula diana resulta en la escisión del sulfuro o disulfuro y en la liberación de los derivados con un incremento asociado de la citotoxicidad.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante una diversidad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida se comercializan o se pueden sintetizar fácilmente por técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los métodos para sintetizar derivados de leptomicina que se pueden emplear en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con métodos para conjugar dichos derivados de leptomicina a los agentes de unión a la célula tales como anticuerpos, se describen en detalle en la solicitud de patente europea núm. 06290948.6.

Análogos de CC-1065

El agente citotóxico en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención puede también ser CC-1065 o un derivado de este.

CC-1065 es un potente antibiótico antitumoral aislado de caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente *in vitro* que los fármacos antineoplásicos comúnmente utilizados, como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al., 1982, Cancer Res., 42, 3532-3537). CC-1065 y sus análogos se describen en las patentes de EE. UU. núm. 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 y 5.585.499.

La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad de unión al ADN o de intercalación con el ADN. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Por lo tanto, la actividad alquilante está contenida en la subunidad de ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de unión al ADN reside en las dos subunidades de pirroloindol.

Si bien CC-1065 posee ciertos rasgos atractivos como agente citotóxico, presenta limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones causó un retraso en la hepatotoxicidad que condujo a la mortalidad en el día 50 después de una única dosis intravenosa de 12,5 µg/kg (V. L. Reynolds et al., 1986, J. Antibiotics, XXIX: 319-334). Esto impulsó a desarrollar análogos que no causen demora en la toxicidad, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados en CC-1065 (M.A. Warpehoski et al., 1988, J. Med. Chem., 31: 590-603).

En otra serie de análogos, el resto CPI se reemplazó con un resto ciclopropabenzindol (CBI) (D.L. Boger et al., 1990, J. Org. Chem., 55: 5823-5833; D.L. Boger et al., 1991, BioOrg. Med. Chem. Lett., 1: 115-120). Estos compuestos mantienen la gran potencia *in vitro* del fármaco parental, sin causar demora en la toxicidad en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del ADN en un modo covalente para causar la muerte celular. No obstante, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesin y Carzelesin, ha llevado a resultados desalentadores (B.F. Foster et al., 1996, Investigational New Drugs, 13: 321-326; I. Wolff et al., 1996, Clin. Cancer Res., 2: 1717-1723). Estos fármacos exhiben efectos terapéuticos deficientes debido a su alta toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar en gran medida cambiando la distribución *in vivo* a través de la administración dirigida al sitio del tumor, lo que resulta en menor toxicidad para los tejidos no dirigidos, y por lo tanto en menor toxicidad sistémica. Con el fin de lograr esta meta, se han descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a la célula que se dirigen específicamente a células tumorales (patentes de EE. UU.; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545). Estos conjugados típicamente exhiben gran citotoxicidad específica de la diana *in vitro*, y actividad antitumoral excepcional en modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones (R.V. J. Chari et al., 1995, Cancer Res., 55: 4079-4084).

Recientemente, se han descrito profármacos de análogos de CC-1065 con mejor solubilidad en medio acuoso (solicitud de patente europea núm. 06290379.4). En estos profármacos, el grupo fenólico de la porción alquilante de la molécula se protege con una funcionalidad que torna al fármaco estable tras el almacenamiento en disolución acuosa ácida, y confiere mayor solubilidad en agua al fármaco en comparación con un análogo desprotegido. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* a un pH fisiológico para dar el correspondiente fármaco activo. En los profármacos descritos en el documento EP 06290379.4, el sustituyente fenólico se protege como un ácido sulfónico que contiene fenil carbamato, que posee una carga a pH fisiológico, y por lo tanto presenta mejor solubilidad en agua. Con el fin de potenciar más la solubilidad en agua, se puede introducir un espaciador de polietilenglicol

opcional al enlazador entre la subunidad de indolilo y el enlace escindible tal como un grupo disulfuro. La introducción de este espaciador no altera la potencia del fármaco.

5 Los métodos para sintetizar los análogos de CC-1065 que se pueden utilizar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con métodos para conjugar los análogos a agentes de unión a la célula tales como anticuerpos, se describen en detalle en el documento EP 06290379.4) y en las patentes de EE. UU. núm. 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499, 6.534.660 y 6.586.618, y en las solicitudes de EE. UU. núm. 10/116.053 y 10/265.452.

Otros fármacos

10 Los fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina son también adecuados para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también se pueden enlazar a moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehículo intermediaria como albúmina del suero. Los compuestos de doxorrubicina y danorrubicina, como se describen, por ejemplo, en la serie de EE. UU. núm. 09/740991, pueden ser también agentes citotóxicos útiles.

Composición terapéutica

15 La invención se refiere además a una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo o una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune en un mamífero, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición farmacéutica es para el tratamiento del cáncer, incluido (aunque sin limitarse a ello) linfoma de células B y mieloma múltiple.

20 La presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden:

a) una cantidad eficaz de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y;

b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, además de sus combinaciones. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. En particular, los ejemplos relevantes de vehículos adecuados incluyen: (1) disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml albúmina de suero humano, (2) 0,9% disolución salina (0,9% p/v cloruro de sodio (NaCl)) y (3) 5% (p/v) dextrosa; y pueden también contener un antioxidante tal como triptamina y un estabilizante tal como Tween 20.

35 Las composiciones de la presente invención pueden también contener otro agente terapéutico, en caso de ser necesario, para el trastorno particular que se esté tratando. Preferiblemente, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y el compuesto activo complementario, tendrán actividades complementarias, que no se afectarán adversamente entre sí. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un antagonista de un receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluidos el receptor HER2, receptor HER3, c-MET y otros receptores de tirosina cinasas. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un agente que direcciona grupos de antígenos de diferenciación (CD), incluidos CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138 y CD152. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o inmunomodulador.

50 Las composiciones de la invención pueden tener una diversidad de formas. Estas incluyen por ejemplo las formas de administración líquidas, semisólidas y sólidas, pero la forma preferida depende del modo intencionado de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas tienen la forma de disoluciones inyectables o para infusión. El modo de administración preferido es parenteral (p. ej., intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran por vía intravenosa como bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo. En otra realización preferida, se inyectan por rutas intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales y sistémicos.

5 Las composiciones estériles para administración parenteral se pueden preparar incorporando el anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, seguido de esterilización por microfiltración. Como disolvente o vehículo, se pueden usar agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, además de sus combinaciones. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. Estas composiciones pueden contener también adyuvantes, en particular agentes humectantes, de isotonización, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral pueden también prepararse en la forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en cualquier momento de uso en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

10 El anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención puede además administrarse por vía oral. Como composiciones sólidas para administración oral, se pueden usar comprimidos, pastillas, polvos (cápsulas de gelatina, sachets) o gránulos. En estas composiciones, el ingrediente activo de acuerdo con la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes, como almidón, celulosa, sacarosa, lactosa o sílice, bajo una corriente de argón. Estas composiciones pueden además comprender sustancias distintas de otros diluyentes, por ejemplo uno o más lubricantes tales como estearato de magnesio o talco, un colorante, un recubrimiento (comprimido recubierto con azúcar) o un glaseado.

15 Como composiciones líquidas para administración oral, se pueden usar disoluciones farmacéuticamente aceptables, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender sustancias distintas de otros diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saporíferos o estabilizantes.

20 La dosis depende del efecto deseado, la duración del tratamiento y la ruta de administración utilizada; está en general entre 5 mg y 1000 mg por día oralmente para un adulto con dosis unitarias que oscilan entre 1 mg y 250 mg de sustancia activa. En general, el médico determinará la dosis apropiada dependiendo de la edad, el peso y cualquier otro factor específico para el sujeto que se ha de tratar.

25 Métodos de uso terapéuticos

Se describe en este documento un método para inactivar una célula CD38⁺ administrando a un paciente que lo necesita un anticuerpo que se une a CD38 y es capaz de inactivar dicha célula CD38⁺ por apoptosis, ADCC y/o CDC. Cualquier tipo de anticuerpo o conjugado citotóxico de la invención se puede usar terapéuticamente. La invención incluye por lo tanto el uso de anticuerpos anti-CD38 o conjugados citotóxicos como medicamentos.

30 En una realización preferida, los anticuerpos o conjugados citotóxicos de la invención se usan para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo o enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune en un mamífero. En una realización más preferida, una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo o conjugado citotóxico de la invención, se usa para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una realización, el trastorno es cáncer. En particular, el cáncer es cáncer metastásico.

35 Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de una diversidad de tipos de cáncer, incluidos (aunque sin limitarse a ello) linfoma de células B y mieloma múltiple. Otras enfermedades incluyen lo siguiente: carcinoma, incluido aquel de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluido carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfóide incluidos leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluidos leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluidos fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; otros tumores incluidos melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluidos fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma y osteosarcoma; y otros tumores que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres aún por determinar, en los que se expresa CD38. Otro trastorno es NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL o CML, en donde se expresa CD38, y otros tipos de cáncer aún por determinar, en los que se expresa CD38 en forma predominante. Las enfermedades autoinmunes incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, gastritis, tiroiditis de Hashimoto, espondilitis anquilosante, vasculitis crioglobulinémica asociada a hepatitis C, encefalitis focal crónica, penfigoide ampolloso, hemofilia A, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Sjogren, dermatomiositis adulta y juvenil, polimiositis adulta, urticaria crónica, cirrosis biliar primaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neuromielitis óptica, enfermedad distiroide de Graves, penfigoide ampolloso, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Churg- Strauss y asma. Otros trastornos incluyen, por ejemplo, rechazos de injertos, como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad injerto contra hospedante; infecciones víricas tales como infección mV, infección por VIH, sida, etc.; e infecciones por parásitos, como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras que podrá determinar el experto en la técnica.

De forma similar, la presente descripción da a conocer un método para inhibir el crecimiento de poblaciones de células seleccionadas que comprende poner en contacto las células diana, o el tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, o un anticuerpo o un agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, o bien solo o combinado con otros agentes citotóxicos o terapéuticos. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un antagonista de un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor endotelial vascular (VEGF), incluidos el receptor HER2, receptor HER3, c-MET y otros receptores de tirosina cinasa. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un agente que direcciona grupos de antígenos de diferenciación (CD), incluidos CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138 y CD152. En una realización preferida, el otro agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o inmunomodulador.

El método para inhibir el crecimiento de las poblaciones de células seleccionadas se puede practicar *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. Tal como se emplea en la presente memoria, "inhibir el crecimiento" significa ralentizar el crecimiento de una célula, reducir la viabilidad celular, causar la muerte de una célula, lisar una célula e inducir la muerte celular, o bien durante un periodo de tiempo corto o largo.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante al mismo paciente con el fin de inactivar las células de enfermedad o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante con el fin de inactivar células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD); tratamientos de cultivos celulares con el fin de inactivar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o inactivar variantes que expresan el antígeno indeseado.

El experto en la técnica podrá determinar las condiciones de uso *in vitro* no clínicas.

Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son eliminar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedad autoinmune, o eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea autóloga o alogénica o de tejido antes del trasplante con el fin de prevenir la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD). El tratamiento se puede llevar a cabo de la siguiente manera. Se cosecha médula ósea del paciente u otro individuo y luego se incuba en medio que contiene suero al que se le añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones oscilan entre aproximadamente 10 μM y 1 pM , durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones exactas de concentración y el tiempo de incubación, es decir, la dosis. Después de la incubación, las células de médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se regresan al paciente por infusión i.v. de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el tiempo de cosecha de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula ósea se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando equipos médicos estándar.

Para uso clínico *in vivo*, el anticuerpo o el conjugado citotóxico de la invención se suministran como disoluciones que se ensayan para esterilidad y para niveles de endotoxina. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados citotóxicos son los siguientes. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como una inyección bolo i.v. cada semana. Las dosis de bolo se administran en 50 a 100 ml de disolución salina normal a la que se le pueden añadir 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. La dosis oscilará entre 10 μg y 100 mg por administración i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg por día). Más preferiblemente, las dosis oscilarán entre 50 μg y 30 mg. Lo más preferiblemente, las dosis oscilarán entre 1 mg y 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento semanalmente. El experto en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a administración, excipientes, diluyentes, dosis, tiempos, etc. si la situación clínica lo justifica.

Diagnóstico

Los anticuerpos descritos también se pueden utilizar para detectar CD38 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, los anticuerpos anti-CD38 descritos se usan *in vitro* para determinar el nivel de CD38 en un tejido o en células derivadas del tejido. Preferiblemente, el tejido es un tejido patológico. Más preferiblemente, el tejido es un tumor o una biopsia de este. Más preferiblemente, un tejido o una biopsia se escinde primero de un paciente, y luego se pueden determinar los niveles de CD38 en el tejido o la biopsia en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la descripción. La descripción da a conocer también la determinación del nivel de CD38 en una muestra de tejido o una biopsia, que se puede congelar o fijar. El mismo método puede utilizarse para

determinar otras propiedades de la proteína CD38, tal como sus niveles de superficie celular, o su localización celular.

5 El método anteriormente descrito se puede usar para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o se sospecha que tiene cáncer, en donde el nivel de CD38 medido en dicho paciente se compara con aquel de un sujeto de referencia normal o estándar. Dicho método puede luego utilizarse para determinar si un tumor expresa CD38, lo que puede sugerir que el tumor responderá bien al tratamiento con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o conjugados de anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, el tumor es NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL o CML, en el cual se expresa CD38, y otros tipos de cáncer aún por determinar en los que CD38 se expresa en forma predominante.

10 La presente descripción da a conocer también anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y sus fragmentos de unión al epítipo, que además se etiquetan para uso en investigación o aplicaciones diagnósticas. En realizaciones preferidas, la etiqueta es una radioetiqueta, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de obtención de imágenes o un ion metálico.

15 También se da a conocer un método para diagnóstico en el que dichos anticuerpos etiquetados o sus fragmentos de unión al epítipo se administran a un sujeto que se sospecha que tiene cáncer o una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune, y se mide o monitorea la distribución de la etiqueta dentro del cuerpo del sujeto.

Kit

20 La presente descripción también incluye kits, p. ej., que comprenden un conjugado citotóxico descrito e instrucciones para uso del conjugado citotóxico para inactivar tipos de células particulares. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para usar los conjugados citotóxicos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

25 Típicamente, el kit tendrá un compartimiento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, en forma líquida o en cualquier otra forma modificable para incluirse en un kit. El kit puede contener también elementos adicionales necesarios para poner en práctica el método descrito en las instrucciones del kit, tal como una disolución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinar con el conjugado citotóxico antes de administrarlo a un paciente, y herramientas que ayudan a administrar el conjugado al paciente.

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son ilustrativos solamente, y no tienen como fin limitar la presente invención.

30 Ejemplo 1

Anticuerpos CD38 de ratón

35 Células 300-19, una línea celular pre-B derivada de ratón Balb/c (M. G. Ret et al. 1985, Nature, 317: 353-355), que expresan establemente un alto nivel de CD38 humana, se usaron para inmunización de ratones Balb/c VAF. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con aproximadamente 5×10^6 células 300-19 por ratón que expresan CD38 cada 2-3 semanas con protocolos de inmunización estándar utilizados en ImmunoGen, Inc. Los ratones inmunizados recibieron un refuerzo de otra dosis de antígeno tres días antes de ser sacrificados para generación de hibridoma. Se extirpó el bazo del ratón de conformidad con los protocolos animales estándar y se dispuso entre dos portaobjetos microscópicos estériles congelados para obtener una sola suspensión celular en medio RPMI-1640. Las células del bazo se peletizaron, lavaron y condensaron con células P3X63Ag8.653 de mieloma murino (J. F. Kearney et al. 1979, J Immunol, 123: 1548-1550) empleando polietilenglicol-1500 (Roche 783 641). Las células condensadas se resuspendieron en medio de selección RPMI-1640 que contenía hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT) (Sigma H-0262) y se seleccionaron para desarrollo en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano (Corning-Costar 3596, 200 μ l de suspensión celular por pocillo) a 37°C (5% CO₂). Después de 5 días de incubación, se eliminaron 100 μ l de sobrenadante de cultivo de cada pocillo y se reemplazó con 100 μ l de medio RPMI-1640 que contenía suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). La incubación a 37°C (5% CO₂) continuó hasta que los clones de hibridoma estuvieron listos para la detección de anticuerpos. Otras técnicas de inmunización y producción de hibridomas también se pueden utilizar, incluidas aquellas descritas en J. Langone y H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; Academic Press, Florida) y E. Harlow y D. Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

50 Por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando un instrumento Becton Dickinson FACSCalibur o FACSArray, se estudiaron los sobrenadantes de cultivo del hibridoma (con antisuero de IgG anti-ratón conjugado a FITC o PE) para segregación de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen a las células 300-19 que expresan CD38, pero no a las células 300-19 parentales. Los clones de hibridoma que arrojaron resultados positivos se subclonaron, y se identificó el isotipo de cada anticuerpo anti-CD38 segregado usando reactivos comerciales para

isotipificación (Roche 1493027). Se purificó un total de 29 anticuerpos positivos para unión a CD38 por cromatografía de Proteína A o G usando un protocolo estándar y luego se caracterizó.

Ejemplo 2

Caracterización de unión de anticuerpos anti-CD38

- 5 Los histogramas FACS que demuestran la unión de anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 a células 300-19 que expresan CD38 y ausencia de unión a las células 300-19 parentales se muestran en la Fig. 1. El anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 (10 nM) se incubó durante 3 h o bien con células 300-19 que expresan CD38 o con células 300-19 parentales ($1-2 \times 10^5$ células por muestra) en 100 μ l de medio RPMI-1640 enfriado con hielo, enriquecido con 2% de suero de cabra normal. Luego las células se peletizaron, se lavaron e incubaron durante 1 h en hielo con anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra conjugado a FITC (Jackson Laboratory, 100 μ l, 6 μ g/ml en medio RPMI-1640 frío enriquecido con 2% de suero de cabra normal). Las células se peletizaron nuevamente, se lavaron, se resuspendieron en 200 μ l de PBS que contenía 1% formaldehído y se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el software CellQuest (BD Biosciences).
- 10
- 15 Los histogramas de FACS de células 300-19 que expresan CD38 incubadas con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 exhibieron un fuerte desplazamiento de fluorescencia, en comparación con aquel del correspondiente control negativo (células incubadas solamente con anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra conjugado a FITC) (Fig. 1). Asimismo, no se detectó desplazamiento de fluorescencia significativo cuando se incubaron células 300-19 parentales con cualquiera de estos anticuerpos. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó anticuerpo anti-CD38 control positivo, AT13/5 (Serotec, MCA1019).
- 20

Se observó también un fuerte desplazamiento de fluorescencia cuando se incubaron células de linfoma Ramos (ATCC CRL 1596) con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 (Fig. 1). Los valores para las constantes de disociación (KD) aparentes de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 para la unión a células Ramos se estimaron a partir de las curvas del análisis FACS que se muestra en la Fig. 2, usando el método de regresión no lineal para curvas de dosis y respuesta sigmoideas (GraphPad Prism, versión 4, software, San Diego, CA). Los valores son los siguientes: 0,10 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,16 nM, 0,11 nM y 3,03 nM, respectivamente.

25

Ejemplo 3

Inducción de apoptosis de linfoma de células Ramos y Daudi, por anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39

30

Los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 indujeron apoptosis de las líneas celulares de linfoma Ramos y Daudi (ATCC CCL-213) y la línea celular de mieloma múltiple MOLP-8 (DSMZ ACC 569). El grado de apoptosis se midió por análisis FACS después de teñir con conjugados FITC de Anexina V (Biosource PHN1018) y con TO-PRO-3 (Invitrogen T3605). La anexina V se une a fosfatidilserina en el exterior pero no en el interior de la bicapa de la membrana celular de células intactas. En células normales sanas, la fosfatidilserina se expresa en el interior de la bicapa de la membrana, y la transición de fosfatidilserina del interior al exterior de la membrana plasmática es una de las señales más precozmente detectables de apoptosis. La unión de Anexina V es por lo tanto una señal para la inducción de apoptosis. TO-PRO-3 es un tinte de ácido nucleico de cianina monomérica que solamente penetra en la membrana plasmática cuando se viola la integridad de la membrana, como ocurre en las etapas tardías de la apoptosis.

35

40

Células que se desarrollan en forma exponencial se dispusieron a aproximadamente 2×10^5 células/ml en placas de 24 pocillos en medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2mM y 50 μ g/ml gentamicina (anteriormente indicada como medio RPMI-1640 completo). Las células se desarrollaron en general en medio RPMI-1640 completo, a menos que se indique algo distinto. Las células se incubaron con anticuerpos anti-CD38 (10 nM) durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO₂. Las células luego se peletizaron, se lavaron dos veces con 500 μ l PBS, se resuspendieron en 100 μ l de tampón de unión (provisto en el kit de Anexina V-FITC), que contenía 5 μ l de Anexina V-FITC y se incubaron durante 15 min en hielo. Luego se añadieron a la mezcla 400 μ l de tampón de unión y TO-PRO-3 (en una concentración final de 1 μ M), y la fluorescencia asociada a las células de FITC y TO-PRO-3 se midió de inmediato por análisis FACS. Se recogieron 4.000 eventos de cada muestra. Los gráficos de puntos para fluorescencia de TO-PRO-3 (FL4-H; eje y) y fluorescencia de Anexina V-FITC (FL1-H; eje x) se generaron usando el software CellQuest.

45

50

Los resultados se muestran en las Fig. 3 y 4. La Fig. 3 expone un ejemplo de dicho gráfico de puntos para células Daudi después de 24 horas de incubación con distintos anticuerpos anti-CD38. Los porcentajes promedio de células Anexina V-positivas (incluye tanto células TO-PRO-3 positivas como negativas) de muestras duplicadas se determinaron a partir de estos gráficos y se muestran en la Fig. 4. Inesperadamente, 38SB13, 38SB18, 38SB19,

55

38SB30, 38SB31 y 38SB39 demostraron actividades apoptóticas. Más de 30% de las células Daudi expuestas a cualquiera de estos anticuerpos fueron Anexina V-positivas, en comparación con solamente aproximadamente 6 % de células no tratadas (Fig. 3 y 4A). 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 demostraron actividades apoptóticas por lo menos 2,4 veces más fuertes (24% después de la sustracción del valor control no tratado) que los anticuerpos CD38 murinos de la técnica anterior ensayados a la misma concentración de 10 nM, (AT13/5, OKT10, IB4 y SUN-4B7, menos de 10% Anexina V-positivas después de la sustracción del valor control no tratado) y otros dos anticuerpos anti-CD38 generados en nuestro laboratorio, (38SB7 y 38SB23, no superior al control no tratado, es decir, aproximadamente 6% Anexina V-positiva) (Fig. 4A). Se adquirió AT13/5 de Serotec (MCA1019), y se produjo OKT10 y se purificó a partir de hibridoma (ATCC CRL-8022). IB4 y SUN-4B7 fueron un obsequio del Prof. F. Malavasi, Universidad de Turín, Italia. De modo similar, los anticuerpos anti-CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 exhibieron actividad pro-apoptótica por lo menos 3,5 veces más fuerte en otra línea celular de linfoma, Ramos (7 % o más Anexina V-positiva después de la sustracción del valor control no tratado) que cualquiera de los anticuerpos CD38 murinos de la técnica anterior, AT13/5, OKT10, IB4 y SUN-4B7, u otros dos anticuerpos anti-CD38 nuevos, 38SB7 y 38SB23 (menos de 2 % Anexina V-positiva después de la sustracción del valor control no tratado) (Fig. 4B). Finalmente, los anticuerpos anti-CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 exhibieron fuerte actividad pro-apoptótica en la línea celular de mieloma múltiple MOLP-8 (Fig. 4C). Aproximadamente 50% de las células MOLP-8 tratadas con estos anticuerpos fueron Anexina V-positivas, en comparación con aproximadamente 39 % de las células no tratadas. En contraste, el tratamiento con cualquier anticuerpo CD38 murino de la técnica anterior, AT13/5, OKT10, IB4 y SUN-4B7, u otros dos anticuerpos anti-CD38 nuevos, 38SB7 y 38SB23, no produjo ningún incremento en la porción de células apoptóticas.

Ejemplo 4

Clonación y secuenciación de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos anti-CD38

Anticuerpo 38SB19.

Preparación de ARN de células de hibridoma que produce el anticuerpo 38SB19

25 Se obtuvieron preparaciones de ARN total de 5×10^6 células de hibridoma, que producen el anticuerpo 38SB19, usando el kit miniprep RNeasy de Qiagen. En síntesis, 5×10^6 células se pelletizaron y resuspendieron en 350 μ l de tampón RLT (que contenía 1% β -mercaptoetanol).

30 La suspensión se homogeneizó pasándolo por una aguja de 21,5 y una jeringa de aproximadamente 10 - 20 veces o hasta que ya no era viscosa. Se añadió etanol (350 μ l de etanol al 70% acuoso) al homogeneizado, que se mezcló bien. La disolución se transfirió a una columna giratoria, se dispuso en un tubo de recolección de 2 ml y se giró a $>8000 \times g$ durante 15 segundos. La columna se lavó dos veces con 500 μ l de tampón RPE, luego se transfirió a un tubo fresco y se eluyó con 30 μ l de agua libre de RNase y se giró un minuto. La elución (30 μ l) se volvió a disponer en la columna durante una centrifugación de 1 segundo-minuto. Se diluyó una alícuota de 30 μ l de elución con agua y se usó para medir la absorción UV a 260 nm para cuantificación de ARN.

35 Preparación de ADNc con reacción de transcriptasa inversa (RT)

40 El ADNc del anticuerpo 38SB19 de región variable se generó a partir del ARN total usando el kit SuperscriptII de Invitrogen. Se siguieron estrictamente los protocolos del kit, utilizando hasta 5 μ g de ARN total de Qianeasy mini preps. En síntesis, el ARN, 1 μ l de cebadores aleatorios y 1 μ l de mezcla de dNTP se llevaron a 12 μ l con agua destilada estéril libre de RNasa y se incubó a 65°C durante 5 minutos. La mezcla luego se dispuso en hielo durante por lo menos 1 minuto. Después se añadieron 4 μ l de 5 x tampón de reacción, 2 μ l DTT 0,1 M y 1 μ l RNaseOUT y la mezcla se incubó a 25°C durante 2 minutos en un ciclador térmico MJ Research. El ciclador térmico se pausó para poder añadir 1 μ l de enzima SuperscriptII y luego se reinició por 10 minutos más a 25°C antes de pasar a 55°C durante 50 minutos. La reacción se inactivó por calor, calentando a 70°C durante 15 min y se eliminó el ARN añadiendo 1 μ l RNase H e incubando a 37°C durante 20 minutos.

45 Degeneración de reacciones PCR

El procedimiento para la primera tanda de reacción PCR degenerada en el ADNc derivado de células de hibridoma se basó en los métodos descritos en Wang *et al.* (2000) y Co *et al.* (1992). Los cebadores para esta tanda (Tabla 2) contienen sitios de restricción para facilitar la clonación en plásmidos pBluescriptII.

50 Los componentes de la reacción PCR (Tabla 3) se mezclaron en hielo en tubos de PCR de paredes delgadas y luego se transfirieron a un ciclador térmico MJ research precalentado a 94°C.

Las reacciones se llevaron a cabo usando un programa derivado de Wang *et al.*, 2000 de la siguiente manera:

Nombre: Wang45

94°C 3:00 min

94°C 0:15 seg

45°C 1:00 min

72°C 2:00 min

5 Goto 2 29 veces

72°C 6:00 min

4°C siempre

fin

10 Las mezclas de la reacción PCR se dispusieron en un gel de agarosa 1% de baja fusión, se cortaron las bandas de 300 a 400 bp, se purificaron usando mini columnas de ADN Zymo y se enviaron a Agencourt biosciences para secuenciación. Los respectivos cebadores de PCR 5' y 3' se usaron como cebadores de secuenciación para generar los ADNc de región variable 38SB19 de ambas direcciones.

Clonación del extremo 5' de la secuencia

15 Dado que los cebadores degenerados utilizados para clonar las secuencias de ADNc de cadenas ligera y pesada de la región variable 38SB19 alteran las secuencias del extremo 5', fue necesario secuenciar adicionalmente para descifrar las secuencias completas. La secuencia de ADNc preliminar de los métodos anteriormente descritos se usó para investigar el sitio NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) para las secuencias de líneas germinales murinas de las cuales deriva la secuencia 38SB19. Se designaron cebadores PCR (Tabla 3) para naturalizar a la secuencia líder del anticuerpo murino de modo tal que una nueva reacción PCR pudiese producir el ADNc de región variable completo, inalterado por los cebadores PCR. Las reacciones PCR, purificaciones de bandas y secuenciación se llevaron a cabo como se describió precedentemente.

20 Análisis de péptidos para confirmación de secuencias

25 La información de la secuencia de ADNc para la región variable se combinó con la secuencia de la región constante de la línea germinal para obtener secuencias de ADNc de anticuerpos de longitud total. Los pesos moleculares de la cadena pesada y de la cadena ligera se calcularon luego y se compararon con los pesos moleculares obtenidos por análisis LC/MS del anticuerpo murino 38SB19.

La Tabla 4 expone la masa calculada a partir de secuencias de ADNc para 38SB19 LC y HC junto con los valores medidos por LC/MS. Las mediciones del peso molecular coinciden con las secuencias de ADNc tanto para la cadena ligera como pesada de 38SB19.

30 Ejemplo 5

Expresión recombinante de anticuerpos hu38SB19

35 Las secuencias de región variable para hu38SB19 se optimizaron con codones y se sintetizaron por Blue Heron Biotechnology. Las secuencias se flanquean por sitios de enzimas de restricción para clonación en marco con las respectivas secuencias constantes en los plásmidos de expresión mamíferos tanto en la cadena sencilla como en la cadena dual en tándem. La región variable de la cadena ligera se clona en los sitios EcoRI y BsiWI en ambos plásmidos ps38SB19LCZv1.0 y ps38SB19v1.00 (Fig. 5A y 5C). La región variable de la cadena pesada se clona en los sitios HindIII y Apa1 en ambos plásmidos ps38SB19HCNv1.0 y ps38SB19v1.00 (Fig. 5B y 5C). Estos plásmidos se pueden usar para expresar hu38SB19 en transfecciones transitorias o estables en células mamíferas. Se utilizaron constructos de vectores de expresión similares para producir anticuerpos quiméricos y humanizados.

40 Las transfecciones transitorias para expresar hu38SB19 en células HEK-293T se llevaron a cabo usando reactivos CaPO₄ de BD biosciences. Los protocolos suministrados se modificaron ligeramente para mejores rendimientos de expresión. En síntesis, 2×10^6 células HEK-293T se dispusieron en placas de cultivo de tejido de 10 cm recubiertas con polietilénimina (PEI) 24 h antes de la transfección. La transfección comenzó lavando las células con PBS y reemplazando el medio con 10 ml de DMEM (Invitrogen) con 1% Ultra Low IgG FBS (Hyclone). Se añadió gota a gota Disolución A (10 µg ADN, 86,8 µl disolución de Ca²⁺ y hasta 500 µl con H₂O) a la Disolución B mientras se agitaba en vórtex. La mezcla se incubó a TA durante 1 min y se añadió gota a gota 1 ml de la mezcla a cada placa de 10 cm. Aproximadamente 16 h después de la transfección, el medio se reemplazó con 10 ml de DMEM fresco con 1% Ultra Low IgG FBS. Aproximadamente 24 horas después, se añadió butirato sódico 2 mM a cada placa de 10 cm. La transfección se cosechó 4 días más tarde.

Se preparó sobrenadante para cromatografía de afinidad de Proteína A por adición de 1/10 volumen de tampón 1 M Tris/HCl, pH 8,0. El sobrenadante con el pH ajustado se filtró con una membrana del filtro de 0,22 µm y se cargó a una columna Sepharose de Proteína A (Proteína A HiTrap HP, 1 ml, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón de unión (PBS, pH 7,3). Se conectó una precolumna A Q-Sepharose (10 ml) en la fase anterior de la columna de Proteína A durante la carga de la muestra para reducir la contaminación del material celular tal como ADN. Después de cargar la muestra, la precolumna se eliminó y se invirtió la orientación de la columna de Proteína A para lavado y elución. La columna se lavó con tampón de unión hasta que se obtuvo una situación inicial estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo se eluyó con tampón de ácido acético 0,1 M que contenía NaCl 0,15 M, pH 2,8, usando un caudal de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,25 ml y se neutralizaron con adición de 1/10 volúmenes de Tris 1M /HCl, pH 8,0. La fracción o fracciones del pico se dializaron durante la noche dos veces contra PBS, y el anticuerpo purificado se cuantificó por absorbancia a OD₂₈₀. Los anticuerpos humanizados y quiméricos pueden además purificarse usando una columna de Proteína G con procedimientos ligeramente distintos.

Todos los anticuerpos quiméricos y humanizados anti-CD38 descritos se expresaron y purificaron en procedimientos similares a los descritos anteriormente.

Ejemplo 6

Citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos quiméricos anti-CD38

Puesto que se ha demostrado previamente que algunos anticuerpos anti-CD38 presentan actividad ADCC y/o CDC como anticuerpos quiméricos o humanizados con regiones constantes de IgG1 humana (J. H. Ellis et al. 1995, J Immunol, 155: 925-937; F. K. Stevenson et al. 1991, Blood, 77: 1071-1079; WO 2005/103083), se prepararon versiones quiméricas de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39, que consisten en regiones variables murinas y en la región constante IgG1humana/IgKappa, y se ensayaron para actividades de ADCC y/o CDC.

Se ensayaron primero Ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31 y ch38SB39 para ADCC usando células Ramos como células diana y linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos como células efectoras. Se usó un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) para medir la lisis celular (R. L. Shields et al., 2001, J Biol Chem, 276: 6591-6604).

Las células NK se aislaron primero de sangre humana (de un donante normal; adquiridas de Research Blood Components, Inc., Brighton, MA) utilizando un protocolo modificado para el kit II de aislamiento de NK (Miltenyi Biotech). La sangre se diluyó 2-3 veces con disolución salina balanceada de Hank (HBSS). Se dispusieron en capas 25 ml de la sangre diluida cuidadosamente sobre 25 ml de Ficoll Paque en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 400 g durante 45 min a 19°C. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interface, se transfirieron a un nuevo tubo cónico de 50 ml y se lavaron una vez con HBSS. Las PBMC se resuspendieron en 2 ml de tampón de aislamiento de NK, y luego se añadieron 500 µl de cóctel de anticuerpo de biotina (del kit de aislamiento de NK, 130-091-152, Miltenyi Biotech) a la suspensión celular. El cóctel de anticuerpo de biotina contiene anticuerpos biotinilados que se unen a los linfocitos, excepto por las células NK. La mezcla se incubó a 4°C durante 10 min, y luego se añadieron 1,5 ml de tampón de aislamiento de NK (PBS, 0,1% BSA, EDTA 1 mM) y 1 ml de microesferas antibiotina (Anti-Biotin Micro Beads). La mezcla de células-anticuerpos se incubó durante otros 15 min a 4°C. Luego las células se lavaron una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK y se resuspendieron en 3 ml de tampón de aislamiento NK. Luego se prelavó la columna de MACS LS (en el separador de MACS, Miltenyi Biotech) con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. La suspensión celular se aplicó luego a una columna de LS. El efluente (fracción con células no etiquetadas) se recogió en un nuevo tubo cónico de 50 ml. La columna se lavó 3 veces con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. Todo el efluente se recogió en el mismo tubo y se lavó una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK. Las células de NK se dispusieron en placas en 30 ml de RPMI-1640 enriquecido con 5% de suero bovino fetal, 50 µg/ml gentamicina.

Diversas concentraciones de anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31 y ch38SB39 en medio RPMI-1640 enriquecido con 0,1% BSA, HEPES 20 mM, pH 7,4 y 50 µg/ml gentamicina (indicado anteriormente como medio RHBP) se introdujeron en alícuotas (50 µl/pocillo) a una placa con fondo redondo de 96 pocillos. Las células Ramos diana se suspendieron a 10⁶ células/ml en medio RHBP y se añadieron a cada pocillo (100 µl/pocillo) que contenía diluciones de anticuerpo. La placa que contenía las células diana y las diluciones de anticuerpo se incubó durante 30 min a 37°C. Se añadieron luego células NK (50 µl/pocillo) a los pocillos que contenían las células diana típicamente en una relación de 1 célula diana a 3-6 células NK. Se añadió medio RHBP (50 µl/pocillo) a los pocillos control con células NK. Además, se añadieron 20 µl de disolución Triton X-100 (medio RPMI-1640, 10% Triton X-100) a los 3 pocillos que contenían solamente células diana sin anticuerpo, para determinar la liberación de LDH máxima posible. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 4 h, luego se centrifugaron durante 10 min a 1200 rpm, y se transfirieron 100 µl del sobrenadante cuidadosamente a una nueva placa con fondo redondo de 96 pocillos. La mezcla de reacción de LDH (100 µl/pocillo) del Kit de Detección de Citotoxicidad (Roche 1 644 793) se añadió a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5-30 min. La

densidad óptica de las muestras se midió a 490 nm (OD_{490}). El porcentaje de lisis específica de cada muestra se determinó atribuyendo 100% lisis al valor OD_{490} de 100 muestras tratadas con Triton X y 0% lisis al valor OD_{490} de la muestra control no tratada que contenía solamente células diana. Las muestras que contenían solamente células NK proporcionaron lecturas de OD_{490} insignificantes.

- 5 Cuando se ensayaron con células diana Ramos y células efectoras NK, los anticuerpos quiméricos anti-CD38 exhibieron actividades de ADCC muy potentes (Fig. 6). Los valores de CE_{50} se estimaron por el método de regresión no lineal con curvas sigmoideas de dosis y respuesta y se halló lo siguiente: 0,0013 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB13, 0,0013 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB18, 0,0018 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB19, 0,0022 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB30, 0,0012 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB31, 0,1132 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB39. Los anticuerpos anti-CD38 quiméricos también exhibieron potente actividad de ADCC en células de mieloma múltiple LP-1 (DSMZ ACC 41) (valores CE_{50} : 0,00056 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB18; 0,00034 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB19; 0,00024 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB31) (Fig. 7A). Ch38SB19 también inactivó de manera eficiente células de linfoma Daudi (Fig. 7B), células NALM-6 B-ALL (DSMZ ACC 128) (Fig. 8A) y células MOLT-4 T-ALL (ATCC CRL-1582) (Fig. 8B) por ADCC, lo que sugiere anticuerpos anti-CD38 con actividad apoptótica inusualmente potente y también actividad de ADCC potente contra diversas células tumorales derivadas de malignidades hematopoyéticas. Además, un anticuerpo control de IgG1 no de unión (rituximab, Biogenldec) (Fig. 7A, 8A y 8B) o mu38SB19 (Fig. 7B) en el mismo experimento no tuvo actividad de ADCC significativa.

Ejemplo 7

Actividades de CDC de los anticuerpos quiméricos anti-CD38

10 Las actividades de CDC de ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31 y ch38SB39 se midieron en base a un método modificado de (H. Gazzano-Santoro et al. 1997, J. Immunol Methods, 202: 163-171). Se liofilizó suero del complemento humano (Sigma-Aldrich S1764) que se reconstituyó con agua purificada estéril como lo indica el fabricante y luego se diluyó cinco veces con medio RHBP inmediatamente antes del experimento. Células diana suspendidas a 10^6 células/ml en medio RHBP se introdujeron en alícuotas en pocillos de una placa de cultivo de tejido con fondo redondo de 96 pocillos (50 $\mu\text{l/pocillo}$). Luego se añadieron 50 μl de diversas concentraciones (de 10 nM a 0,001 nM) de los anticuerpos anti-CD38 en medio RHBP (un anticuerpo por muestra), a lo cual le siguieron 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de disolución de complemento. La placa se incubó luego durante 2 h a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO_2 , después de lo cual se añadieron 50 μl de 40% reactivo azul Alamar (Biosource DAL1100) diluido en RHBP (10% final) a cada pocillo para medir la viabilidad de las células. El azul Alamar controla la capacidad de reducción de las células viables. La placa se incubó durante 5-18 h a 37°C antes de medir la fluorescencia (en unidades de fluorescencia relativas, RFU) a 540/590 nm. El porcentaje de viabilidad celular específica para cada muestra se determinó corrigiendo primero los valores experimentales para fluorescencia de fondo, sustrayendo el valor RFU de fondo (pocillos con medio solamente, sin ninguna célula) de los valores RFU para cada muestra y luego dividiendo los valores RFU corregidos por el valor RFU corregido de las muestras de células no tratadas.

35 Cuando las actividades de CDC de las muestras de anticuerpo quimérico anti-CD38 se ensayaron con células Raji-IMG usando complemento humano en una dilución final de 5%, los anticuerpos quiméricos anti-CD38 exhibieron actividades de CDC muy potentes (Fig. 9). Raji-IMG son células derivadas de células Raji (ATCC CCL-86) y expresan niveles inferiores de los inhibidores de complemento de membrana CD55 y CD59. Los valores CE_{50} se estimaron por regresión no lineal a partir de la curva de dosis y respuesta sigmoidea que se expone en la Fig. 8. y son los siguientes: 0,005 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB13, 0,0101 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB18, 0,028 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB19, 0,020 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB30, 0,010 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB31 y 0,400 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB39. Los anticuerpos quiméricos anti-CD38 también exhibieron actividad de CDC potente hacia células de mieloma múltiple LP-1 (valor CE_{50} : 0,032 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB18; 0,030 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB19; 0,043 $\mu\text{g/ml}$ para ch38SB31), mientras que un IgG1 control quimérico no de unión (rituximab, Biogenldec) no tuvo ninguna actividad de CDC (Fig. 10). Cuando los anticuerpos quiméricos CD38 se ensayaron en células de linfoma Daudi, los distintos anticuerpos anti-CD38 difirieron en sus actividades de CDC (Fig. 11). Si bien la viabilidad específica de las células Daudi fue inferior a 15% después de su incubación con 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de ch38SB19 en presencia de complemento, hubo solamente una reducción marginal en la viabilidad específica de estas células después de su incubación con ch38SB18 o ch38SB39 (1,25 $\mu\text{g/ml}$ o concentración superior) en presencia de complemento (la viabilidad específica fue 85% y 91%, respectivamente). Además, se observó solamente una reducción modesta de viabilidad específica cuando las células Daudi se incubaron con 1,25 $\mu\text{g/ml}$ o más de concentración de ch38SB13, ch38SB30 y ch38SB31 en presencia de complemento (la viabilidad específica fue 65%, 45% y 53%, respectivamente).

Ejemplo 8

Afinidad de unión y actividades apoptóticas, de ADCC y de CDC de los anticuerpos humanizados anti-CD38

55 Las dos versiones de 38SB19 humanizado (hu38SB19 v1.00 y v1.20) y 38SB19 quimérico exhibieron afinidades de unión similares cuando se ensayaron con células Ramos con valores K_D de 0,23 nM, 0,25 nM y 0,18 nM, respectivamente (Fig. 12A). Las afinidades de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados 38SB19 también

se compararon en un ensayo de unión de competición, en donde se mide su capacidad de competir con la unión de anticuerpo murino 38SB19 biotinilado. El anticuerpo murino 38SB19 marcado con biotina (3×10^{-10} M) se mezcló con distintas concentraciones de ch38SB19, hu38SB19 v1.00 o hu38SB19 v1.20. La mezcla de anticuerpos se incubó con células Ramos, y se midió la cantidad del anticuerpo murino 38SB19 biotinilado unido a las células con estreptavidina conjugada a FITC por análisis FACS. Hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20 y ch38SB19 compitieron con la unión del 38SB19 murino biotinilado igualmente bien (Fig. 12B), nuevamente indicando que la afinidad de unión no se vio afectada por la humanización. Cuando ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 (10^{-8} a 10^{-11} M) se compararon por su capacidad de inducir apoptosis de células Daudi, exhibieron actividades apoptóticas similares (Fig. 13). Asimismo, hu38SB19 v1.00 y v1.20 también demostraron ADCC similar a ch38SB19 en las células LP-1 (Fig. 14) y potencias de CDC similares a ch38SB19 en células Raji-IMG y LP-1 (Fig. 15). Hu38SB19 v1.00 también exhibió actividad de CDC similar a ch38SB19 en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda de células T, DND-41 (DSMZ 525) (FIG 15). Se ensayó incluso más la capacidad de Hu38SB19 v1.00 de inducir apoptosis en un conjunto diverso de líneas celulares (Fig. 16). El tratamiento con hu38SB19 v1.00 (10^{-8} M) resultó en un importante incremento de células Anexina V-positivas en las líneas celulares de linfoma de células B -DHL-8 (DSMZ ACC 573) (de 7% en el control no tratado a 97% en las células tratadas con hu38SB19) y NU-DUL-1 (DSMZ ACC 579) (de 10% en control sin tratar a 37% en células tratadas con hu38SB19) y en la línea celular T-ALL, DND-41 (de 7% en control sin tratar a 69% en células tratadas con hu38SB19). A su vez, el tratamiento con hu38SB19 v1.00 (10^{-8} M) aumentó la porción de células Anexina V-positivas en la línea celular de leucemia linfocítica de células B JVM-13 (DSMZ ACC 19) (de 8% en control sin tratar a 17% en células tratadas con hu38SB19) y en la línea celular de leucemia de células vellosas HC-1 (DSMZ ACC 301) (de 6% en control sin tratar a 10% en células tratadas con hu38SB19).

De modo similar, dos versiones de 38SB31 humanizado (hu38SB31 v1.1 y v1.2 y 38SB31 quimérico demostraron afinidades de unión similares cuando se ensayaron con células Ramos con valores K_D de 0,13 nM, 0,11 nM y 0,12 nM, respectivamente. Las afinidades de unión de los anticuerpos quiméricos y humanizados 38SB31 se compararon también en un ensayo de unión de competición, como se describió anteriormente, y se desempeñaron igualmente bien. Hu38SB31v1.1 se ensayó además por su capacidad de inducir apoptosis en varias líneas celulares. El anticuerpo humanizado demostró actividades apoptóticas similares a ch38SB31 hacia células Ramos, Daudi, Molp-8 y SU-DHL-8. Asimismo, hu38SB31 v1.1 también demostró actividades de ADCC y CDC similares a ch38SB31 en estas líneas celulares.

30 Ejemplo 9

Eficacia *in vivo* de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39

Se investigaron las actividades antitumorales *in vivo* de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 y 38SB39 en un modelo de tumor de xenoinjerto humano de supervivencia en ratones inmunodeficientes (hembra CB.17 SCID) establecidos con células de linfoma Ramos. Los ratones CB.17 SCID hembra se inocularon con 2×10^6 células Ramos en 0,1 ml de medio libre de suero a través de la vena lateral del rabo. Siete días después de la inoculación de las células del tumor, los ratones fueron aleatorizados en siete grupos en base al peso corporal. Hubo 10 ratones por grupo, excepto por el grupo tratado con 38SB31, que tuvo 6 ratones, y el grupo tratado con 38SB39, que tuvo 8 ratones. Los ratones recibieron los anticuerpos por vía intravenosa en una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas, comenzando siete días después de la inoculación de las células. Los ratones eran sacrificados si una o ambas patas traseras se paralizaban, si el adelgazamiento era de más de 20% del valor previo al tratamiento o si el animal estaba demasiado enfermo para llegar hasta el alimento y el agua. El tratamiento con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 o 38SB39 extendió significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con aquella de los ratones tratados con PBS (Fig. 17). La supervivencia mediana de los ratones tratados con PBS fue 22 días y aquella de los grupos tratados con anticuerpo osciló entre 28 y 33 días.

Se investigaron más las actividades anti-tumorales *in vivo* de mu38SB19 y hu38SB19 en modelos de xenoinjerto humano adicionales en ratones inmunodeficientes. Para el modelo de supervivencia de linfoma Daudi, se inocularon ratones SCID con 5×10^6 células Daudi en 0,1 ml de medio libre de suero a través de la vena lateral del rabo. El estudio se llevó a cabo como se describió anteriormente. El tratamiento con mu38SB19 o hu38SB19 extendió de manera significativa la supervivencia de los ratones en comparación con aquella de los ratones tratados con PBS (Fig. 18). La supervivencia mediana de los ratones tratados con PBS fue de 22 días, mientras que la supervivencia mediana de los ratones tratados con anticuerpo fue de 47 días.

Para un modelo de tumor de mieloma múltiple NCI-H929, se inocularon ratones SCID por vía subcutánea con 10^7 células. Cuando los tumores fueron palpables en el día 6, los animales fueron aleatorizados en grupos de 10 de acuerdo con el peso corporal, y se inició el tratamiento con anticuerpos. El anticuerpo hu38SB19 o un anticuerpo control de IgG1 quimérico no de unión (rituximab, BiogenIdec) se administraron a los ratones por vía intravenosa en una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas. Se vigiló el volumen del tumor, y los animales se sacrificaron si los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm^3 o se pusieron necróticos. El grupo tratado con PBS alcanzó un volumen del tumor medio de 1000 mm^3 el día 89, el grupo control de anticuerpo quimérico IgG1 el día 84 (Fig. 19). El tratamiento con hu38SB19 previno completamente el crecimiento del tumor en

los 10 animales. En contraste, solamente dos animales en el grupo tratado con PBS y tres animales en el grupo de anticuerpo control quimérico IgG1 exhibieron regresión del tumor.

5 Para un modelo de tumor de mieloma múltiple MOLP-8, los ratones SCID fueron inoculados por vía subcutánea con 10^7 células. Cuando los tumores fueron palpables el día 4, los animales fueron aleatorizados en grupos de 10 de acuerdo con el peso corporal, y se inició el tratamiento con anticuerpos. Los ratones recibieron anticuerpos hu38SB19 y mu38SB19 o un anticuerpo control quimérico de IgG1 por vía intravenosa en una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas. Se vigiló el volumen del tumor y los animales fueron sacrificados si los tumores alcanzaban un tamaño de 2000 mm^3 o se pusieron necróticos. El grupo tratado con PBS alcanzó un volumen del tumor medio de 500 mm^3 el día 22, el grupo de anticuerpo control quimérico de IgG1 el día 23 (Fig. 20).
 10 No hubo regresión de ninguno de los tumores en estos grupos. En contraste, el tratamiento con hu38SB19 o mu38SB19 condujo a la regresión del tumor en 8 de 10 o 6 de 10 animales, respectivamente.

Tablas

Tabla 1A:

15 Residuos superficiales marco de la cadena ligera de mu38SB19 y residuos correspondientes en la misma posición Kabat en el anticuerpo 1.69 humano. Los residuos que son diferentes y por lo tanto modificados en el anticuerpo hu38SB19 se muestran en casilleros grises. Los residuos con el asterisco (*) son retromutados al residuo mu38SB19 en una o más variantes de hu38SB19.

| Residuos superficiales marco de la cadena ligera de mu38SB19 y residuos correspondientes en el anticuerpo humano 1.69 | | |
|---|----------|------|
| Posición Kabat | mu38SB19 | 1.69 |
| 1 | D | D |
| 3 | V | V |
| 5* | T | A |
| 9 | L | K |
| 10 | S | F |
| 15 | L | V |
| 18 | P | R |
| 40 | P | P |
| 41 | G | G |
| 42 | Q | Q |
| 45 | R | K |
| 57 | G | G |
| 60 | D | D |
| 67 | A | A |
| 80 | A | A |
| 81 | E | E |
| 107 | K | K |
| 108 | R | R |

Tabla 1B:

20 Residuos superficiales marco de la cadena pesada de mu38SB19 y residuos correspondientes en la misma posición Kabat en el anticuerpo humano 1.69. Los residuos que son diferentes y por lo tanto modificados en el anticuerpo hu38SB19 se muestran en casilleros grises.

ES 2 726 754 T3

| Residuos superficiales marco de la cadena pesada de mu38SB19 y residuos correspondientes en el anticuerpo humano 1.69 | | |
|---|----------|------|
| Posición Kabat | mu38SB19 | 1.69 |
| 1 | Q | Q |
| 3 | Q | Q |
| 5 | V | Q |
| 9 | A | A |
| 11 | V | L |
| 13 | K | R |
| 14 | P | P |
| 19 | K | K |
| 23 | K | K |
| 28 | T | T |
| 41 | P | P |
| 42 | G | G |
| 43 | Q | Q |
| 61 | Q | Q |
| 62 | K | K |
| 64 | Q | K |
| 65 | G | G |
| 73 | K | K |
| 74 | S | S |
| 82 B | S | S |
| 84 | S | S |
| 85 | E | E |
| 106 | Q | Q |
| 113 | S | S |

Tabla 2

Los cebadores utilizados para las reacciones PCR degeneradas se basan en aquellos de Wang *et al.*, 2000 excepto HindKL que se basa en Co *et al.* 1992. Las bases mixtas se definen de la siguiente manera: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g, W=A+T, V = A+C+G.

| Cebador | Secuencia |
|--------------------------|--------------------------------------|
| BamIlgG1 (SEQ ID NO. 73) | GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC |
| IgG2Abam (SEQ ID NO. 74) | GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA |
| EcoMH 1 (SEQ ID NO. 75) | CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC |
| EcoMH2 (SEQ ID NO. 76) | CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG |
| SacIMK (SEQ ID NO. 77) | GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA |
| HindKL (SEQ ID NO. 78) | |

ES 2 726 754 T3

| | |
|---------|--|
| Cebador | Secuencia |
| | TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTT GGTGC |

Tabla 3:

Mezclas de la reacción PCR de cadenas ligera y pesada para clonación de las secuencias de ADNc de región variable 38SB19.

| Mezcla de reacción de cadena ligera | Mezcla de reacción de cadena pesada |
|--|---|
| 5 µl tampón de reacción PCR 10 X (Roche) | 5 µl tampón de reacción PCR 10 X (Roche) |
| 4 µl mezcla dNTP 10mM (2,5 mM de cada uno) | 4 µl mezcla de dNTP 10mM (2,5 mM de cada uno) |
| 2 µl Molde (reacción RT) | 2 µl Molde (reacción RT) |
| 5 µl cebador izquierdo Sac1MK 10 µM | 2,5 µl cebador izquierdo EcoMH1 10 µM |
| 5 µl cebador derecho HindKL 10 µM | 2,5 µl cebador izquierdo EcoMH2 10 µM |
| | 5 µl cebador derecho BamIlg1 10 µM |
| 5 µl DMSO | 5 µl DMSO |
| 0,5 µl Taq Polimerasa (Roche) | 0,5 µl Taq Polimerasa (Roche) |
| 23,5 µl H ₂ O destilada estéril | 23,5 µl H ₂ O destilada estéril |
| 50 µl Total | 50 µl Total |

5

Tabla 4:

Cebadores de la secuencia líder murina del extremo 5' utilizados para las reacciones PCR de la segunda tanda 38SB19. Los cebadores del extremo 3' son idénticos a aquellos utilizados en las reacciones de la primera tanda, ya que se ceban a las respectivas secuencias de las regiones constantes.

| | |
|--|----------------------------------|
| Cebador | Secuencia |
| 38SB19 LC líder de cadena ligera (SEQ ID NO. 79) | ATGGAGTCACAGATTCAGGTC |
| 38-19HC Líder 1 de cadena pesada (SEQ ID NO. 80) | TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC |

10

Tabla 5:

ADNc calculado y pesos moleculares medidos por LC/MS de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino 38SB19.

| | Cadena ligera | | | Cadena pesada | | |
|----------|---------------|-------|------------|---------------|-------|------------|
| | ADNc | LC/MS | Diferencia | ADNc | LC/MS | Diferencia |
| Mu38SB19 | 23735 | 23736 | 1 | 48805 | 48826 | 21 |

ES 2 726 754 T3

Lista de secuencias

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CD38 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> FR2006-043

<160> 80

5 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

10 <400> 1

Ser Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2

< 211> 17

< 212> PRT

15 < 213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

< 211> 5

20 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 3

Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

25 < 211> 15

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr Gly Asn Gly Phe Met Asn
1 5 10 15

30 <210> 5

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Mus sp.
 <400> 5
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 6
 5 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 6
 Glu Glu Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5
 10 <210> 7
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 7
 15 Asn Ser Gly Met Asn
 1 5
 <210> 8
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 20 <400> 8
 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 9
 < 211> 5
 < 212> PRT
 25 < 213> Mus sp.
 <400> 9
 Arg Gly Phe Val Tyr
 1 5
 <210> 10
 < 211> 15
 30 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.

ES 2 726 754 T3

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Leu Lys
1 5 10 15

<210> 11

< 211> 7

5 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12

10 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 13

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 13

20 Asp Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 14

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

25 <400> 14

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

< 211> 11

< 212> PRT

30 < 213> Mus sp.

<400> 15

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 16

<211> 11

212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val Val Ala
 1 5 10

<210> 17

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile
 1 5

<210> 18

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

25 Gly Ser Trp Met Asn
 1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

30 <400> 20

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe Arg
 1 5 10 15

Asp

<210> 21
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 5 <400> 21
 Trp Gln Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 22
 < 211> 11
 < 212> PRT
 10 < 213> Mus sp.
 <400> 22
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 23
 < 211> 7
 15 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 23
 Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 24
 20 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 24
 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr Thr
 1 5
 25 <210> 25
 < 211> 5< 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 25
 Ser Tyr Thr Leu Ser
 1 5
 30 <210> 26
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.

ES 2 726 754 T3

<400> 26

Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 27

< 211> 8

5 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 27

Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe
1 5

<210> 28

10 < 211> 11

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala Val Ala
1 5 10

15 <210> 29

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 29

20 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 30

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

25 <400> 30

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 31

< 211> 5

< 212> PRT

30 < 213> Mus sp.

<400> 31

ES 2 726 754 T3

Asn Phe Gly Met His
 1 5
 <210> 32
 < 211> 17
 < 212> PRT
 5 < 213> Mus sp.
 <400> 32
 Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 33
 < 211> 11
 10 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 33
 Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 34
 15 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 34
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10
 20 <210> 35
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 <400> 35
 25 Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 36
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Mus sp.
 30 <400> 36
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

ES 2 726 754 T3

<210> 37

< 211> 336

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

5 <220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(336)

<400> 37

aac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct ctt ggg 48
 Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gag att tat 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr
 20 25 30

ggc aat ggt ttt atg aac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag cca ccc 144
 Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

10

aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

agg ttc agt gcc agt ggg tct agg aca gag ttc acc ctc acc att gat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt caa caa att aat 288
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
 85 90 95

gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg 336
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 38

< 211> 112

< 212> PRT

15

< 213> Mus sp.

<400> 38

ES 2 726 754 T3

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 39

< 211> 336

< 212> ADN

5 < 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(336)

<400> 39

| | | |
|----|---|-----|
| | gac att gta ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg | 48 |
| | Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly | |
| | 1 5 10 15 | |
| | cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gag agt gtt gct att tat | 96 |
| | Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr | |
| | 20 25 30 | |
| | ggc aat agt ttt ctg aaa tgg ttc cag cag aaa ccg gga cag cca ccc | 144 |
| | Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro | |
| | 35 40 45 | |
| 10 | aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc | 192 |
| | Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala | |
| | 50 55 60 | |
| | agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc att aat | 240 |
| | Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn | |
| | 65 70 75 80 | |
| | cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa att aat | 288 |
| | Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn | |
| | 85 90 95 | |
| | gag gat ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg | 336 |
| | Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg | |
| | 100 105 110 | |

<210> 40

< 211> 112

ES 2 726 754 T3

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 40

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5 <210> 41

< 211> 324

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

10 < 221> CDS

< 222> (1)..(324)

<400> 41

ES 2 726 754 T3

gac att gtg atg gcc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gtt gga 48
 Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gtt 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
 20 25 30

gtg gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa cga ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

tac tcg gca tcc tat cgg tat att gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc agt gtg cag gct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat agt cct ccg tac 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
 85 90 95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 42

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 42

Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10 <210> 43

<211> 324

<212> ADN

<213> Mus sp.

ES 2 726 754 T3

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(324)

<400> 43

gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ttg tcc aca tca gtt gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtc agt atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg gtt act gct 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala
 20 25 30

gtt gcc tgg ttt caa cag aaa cca gga caa tct cca aaa cta ctg att 144
 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

5 tat tcg gca tcc cac cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ttc acc atc atc agt gtg cag gct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ile Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt caa caa cat tat act act ccc acg 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr
 85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gac ttc aga cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg
 100 105

<210> 44

< 211> 108

10 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg
 100 105

<210> 45

ES 2 726 754 T3

< 211> 324

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

5 < 221> CDS

< 222> (1)..(324)

<400> 45

gac act gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ata tcc aca tca gtt gga 48
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gtt gtg ggt agt gct 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240

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

gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat ccg tac 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

10 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 46

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

15 <400> 46

ES 2 726 754 T3

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 47

< 211> 324

< 212> ADN

5 < 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(324)

<400> 47

| | | |
|----|---|-----|
| | gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta gga | 48 |
| | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly | |
| | 1 5 10 15 | |
| | gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat | 96 |
| | Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn | |
| | 20 25 30 | |
| | gtt gcc tgg tat caa cac aaa cca gga caa tcc cct aaa ata atg att | 144 |
| | Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile | |
| | 35 40 45 | |
| | tat tcg gcg tcc tcc cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc | 192 |
| | Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly | |
| | 50 55 60 | |
| 10 | agt gga tct ggg aca ctt ttc act ctc acc atc aac aat gtg cag tct | 240 |
| | Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser | |
| | 65 70 75 80 | |
| | gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat cct ctc | 288 |
| | Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu | |
| | 85 90 95 | |
| | acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg | 324 |
| | Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg | |
| | 100 105 | |

<210> 48

< 211> 108

ES 2 726 754 T3

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 49

< 211> 342

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

10 < 221> CDS

< 222> (1)..(342)

<400> 49

ES 2 726 754 T3

cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ctc aca agc tac 96
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg 144
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

ggc tgg ata aac acc tac act gga gaa cca aca tat gct gat gac ttt 192
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

aag gga cgt ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt 288
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

gta aga cgc ggg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc 336
 Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

tct gca 342
 Ser Ala

<210> 50

5 < 211> 114

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 50

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

10 <210> 51

< 211> 342

ES 2 726 754 T3

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

5 < 222> (1)..(342)

<400> 51

| | |
|---|-----|
| cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag | 48 |
| Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu | |
| 1 5 10 15 | |
| aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca aac tct | 96 |
| Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser | |
| 20 25 30 | |
| gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg | 144 |
| Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met | |
| 35 40 45 | |
| ggc tgg ata aac acc tac act gga gag ccg aca tat gct gat gac ttc | 192 |
| Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe | |
| 50 55 60 | |
| aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc tct gcc tat | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr | |
| 65 70 75 80 | |
| ttg cag atc agt aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt | 288 |
| Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys | |
| 85 90 95 | |
| gca aga agg ggt ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act ctg gta act gtc | 336 |
| Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val | |
| 100 105 110 | |
| tct gca | 342 |
| Ser Ala | |

10 <210> 52

< 211> 114

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 52

ES 2 726 754 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

ser Ala

<210> 53

< 211> 360

< 212> ADN

5 < 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(360)

<400> 53

ES 2 726 754 T3

cag gtt cag ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gca aga cct ggg act 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttt act gac tac 96

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tgg atg cag tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gag tgg att 144
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg act att tat cct gga gat ggt gat act ggg tac gct cag aag ttc 192
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gcg gat aaa tcc tcc aaa aca gtc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80

atg cac ctc agc agt ttg gct tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga ggg gat tac tac ggt agt aat tct ttg gac tat tgg ggt caa 336
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 360
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

5 < 211> 120

< 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 54

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 55

ES 2 726 754 T3

< 211> 357< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

5 < 222> (1)..(357)

<400> 55

| | |
|---|-----|
| cag gtc cag tta cag caa tct gga cct gaa ctg gtg agg cct ggg gcc | 48 |
| Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala | |
| 1 5 10 15 | |
| tca gtg aag att tcc tgc aaa act tct ggc tac gca ttc agt ggc tcc | 96 |
| Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser | |
| 20 25 30 | |
| tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga cag ggt cta gag tgg att | 144 |
| Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | |
| 35 40 45 | |
| gga cgg att tat ccg gga gat gga gat atc att tac aat ggg aat ttc | 192 |
| Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe | |
| 50 55 60 | |
| agg gac aag gtc aca ctg tct gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac | 240 |
| Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr | |
| 65 70 75 80 | |
| atg cag ctc agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc tat ttt tgt | 288 |
| Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys | |
| 85 90 95 | |
| tcg aga tgg ggg aca ttt acg ccg agt ttt gac tat tgg ggc caa ggc | 336 |
| Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly | |
| 100 105 110 | |
| acc act ctc aca gtc tcc tca | 357 |
| Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser | |
| 115 | |

<210> 56

< 211> 119

10 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 56

ES 2 726 754 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe
 50 55 60
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

< 211> 351

< 212> ADN

5 < 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(351)

<400> 57

ES 2 726 754 T3

gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
 Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gaa gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

acc ctg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag acg agg ctg gag tgg gtc 144
 Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr 40 Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
 35 45

gca acc att agt att ggt ggt cgc tac acc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

aca aga gat ttt aat ggt tac tct gac ttc tgg ggc caa ggc acc act 336
 Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 58

< 211> 117

< 212> PRT

5 < 213> Mus sp.

<400> 58

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 59

< 211> 360

ES 2 726 754 T3

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<220>

< 221> CDS

5 < 222> (1)..(360)

<400> 59

| | |
|---|-----|
| aat gta cag ctg gta gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga ggg | 48 |
| Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| tcc cgg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aac ttt | 96 |
| Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe | |
| 20 25 30 | |
| gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag ggt ctg gag tgg gtc | 144 |
| Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val | |
| 35 40 45 | |
| gca tac att cgt agt ggc agt ggt acc atc tac tat tca gac aca gtg | 192 |
| Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val | |
| 50 55 60 | |
| aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat ccc aag aac acc ctg ttc | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe | |
| 65 70 75 80 | |
| ctg caa atg acc agt cta agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt | 288 |
| Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys | |
| 85 90 95 | |
| gca aga tcc tac tat gat ttc ggg gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa | 336 |
| Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln | |
| 100 105 110 | |
| ggg act ctg gtc act gtc tct gca | 360 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala | |
| 115 120 | |

<210> 60

< 211> 120

10 < 212> PRT

< 213> Mus sp.

<400> 60

ES 2 726 754 T3

Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 61

5 < 211> 324

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

10 < 222> (1)..(324)

<400> 61

| | |
|---|-----|
| gat atc gta atg acc cag tcc cac ctg agt atg agt acc tcc ctg gga | 48 |
| Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| gat cct gtg tca atc act tgc aag gcc tca cag gat gtg agc acc gtc | 96 |
| Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val | |
| 20 25 30 | |
| gtt gct tgg tat cag cag aag ccc ggg caa tca ccc aga cgt ctc atc | 144 |
| Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile | |
| 35 40 45 | |
| tac tca gca tca tac cgt tac atc ggg gtg cct gac cga ttt act ggc | 192 |
| Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly | |
| 50 55 60 | |
| tct ggc gct ggc aca gat ttc acc ttt aca att agt tcc gtc cag gcc | 240 |
| Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala | |
| 65 70 75 80 | |
| gaa gac ctg gcc gtg tac tac tgc cag cag cac tac agt ccc cca tac | 288 |
| Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr | |
| 85 90 95 | |
| act ttc ggg gga ggg act aag ctc gaa atc aaa cgt | 324 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg | |
| 100 105 | |

<210> 62

ES 2 726 754 T3

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 62

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

5 Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 63

< 211> 324

10 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(324)

15 <400> 63

ES 2 726 754 T3

gac att gtt atg gct caa agc cat ctg tct atg agc aca tct ctg gga 48
 Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gat cct gtg tcc atc act tgc aaa gcc agt caa gac gtg tct aca gtt 96
 Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
 20 25 30

gtt gca tgg tat caa cag aag cca gcc cag tca ccc aga cgg ctc att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45

tac tca gct tct tac cga tac atc ggg gtc cct gac aga ttt aca ggt 192
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

agt ggg gcc ggt act gac ttc act ttt act atc tca tcc gta caa gcc 240
 Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gta tat tac tgc cag caa cat tat tcc cca ccc tac 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
 85 90 95

aca ttc ggc ggg ggt act aag ctg gaa att aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 64

< 211> 108

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 64

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10 <210> 65

< 211> 360

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

15 < 221> CDS

ES 2 726 754 T3

< 222> (1)..(360)

<400> 65

| | |
|---|-----|
| cag gta cag ctc gtt cag tcc ggc gcc gag gta gct aag cct ggt act | 48 |
| Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr | |
| 1 5 10 15 | |
| tcc gta aaa ttg tcc tgt aag gct tcc ggg tac aca ttt aca gac tac | 96 |
| Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr | |
| 20 25 30 | |
| tgg atg cag tgg gta aaa cag cgg cca ggt cag ggc ctg gag tgg att | 144 |
| Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | |
| 35 40 45 | |
| gga aca ata tat ccc ggc gac ggc gac aca ggc tat gcc cag aag ttt | 192 |
| Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe | |
| 50 55 60 | |
| caa ggc aag gca acc ctt act gct gat aaa tct tcc aag act gtc tac | 240 |
| Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr | |
| 65 70 75 80 | |
| atg cat ctg tct tcc ttg gca tct gag gat agc gct gtc tat tac tgt | 288 |
| Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys | |
| 85 90 95 | |
| gct agg ggg gac tac tat ggg tca aat tcc ctg gat tac tgg ggc cag | 336 |
| Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln | |
| 100 105 110 | |
| ggc acc agt gtc acc gtg agc agc | 360 |
| Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser | |
| 115 120 | |

<210> 66

5 < 211> 120

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 66

ES 2 726 754 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67

5 < 211> 324

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

10 < 222> (1)..(324)

<400> 67

| | |
|---|-----|
| gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc acc atc tcc acc tct gtg ggc Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly 1 5 10 15 | 48 |
| gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala 20 25 30 | 96 |
| gtg gcc tgg tat cag cag aag cct ggc cag tcc cct aag ctg ctg atc Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45 | 144 |
| tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc ggc gtg cct gac cgg ttc acc ggc Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly 50 55 60 | 192 |
| tcc gcc agc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser 65 70 75 80 | 240 |
| gac gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr 85 90 95 | 288 |
| acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gag atc aag cgt Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105 | 324 |

<210> 68

ES 2 726 754 T3

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 69

< 211> 324

10 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(324)

15 <400> 69

ES 2 726 754 T3

gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc tcc atc tcc acc tcc atc ggc 48
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15

gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
 20 25 30

gtg gcc tgg tat cag cag aag cct gcc cag tcc cct aag ctg ctg atc 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc gcc gtg cct gcc cgg ttc acc ggc 192
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

tcc gcc agc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

gag gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

acc ttt gcc ggc gga aca aag ctg gag atc aag cgt 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 70

< 211> 108

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10 <210> 71

< 211> 351

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

ES 2 726 754 T3

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(351)

<400> 71

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | gag | gtg | cag | ctg | gtg | gag | tct | ggc | ggc | gga | ctg | gtg | aag | cct | ggc | ggc | 48 |
| | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| | tcc | ctg | agg | ctg | tcc | tgt | gag | gcc | tcc | ggc | ttc | acc | ttc | tcc | tcc | tac | 96 |
| | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Glu | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | acc | ctg | tcc | tgg | gtg | agg | cag | acc | cct | ggc | aag | ggc | ctg | gag | tgg | gtg | 144 |
| | Thr | Leu | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Thr | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | gcc | acc | atc | tcc | atc | ggc | ggc | agg | tac | acc | tac | tac | cct | gac | tcc | gtg | 192 |
| | Ala | Thr | Ile | Ser | Ile | Gly | Gly | Arg | Tyr | Thr | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Ser | Val | |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | | |
| | aag | ggc | cgg | ttc | acc | atc | tcc | cgg | gac | aac | gcc | aag | aac | acc | ctg | tac | 240 |
| | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | |
| | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | |
| | ctg | cag | atg | aac | tcc | ctg | aag | tcc | gag | gac | acc | gcc | atg | tac | tac | tgt | 288 |
| | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| | acc | cgg | gac | ttc | aac | ggc | tac | tcc | gac | ttc | tgg | ggc | cag | ggc | acc | aca | 336 |
| | Thr | Arg | Asp | Phe | Asn | Gly | Tyr | Ser | Asp | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| 5 | ctg | acc | gtg | tcc | tcc | | | | | | | | | | | | 351 |
| | Leu | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 72

< 211> 117

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10 <400> 72

ES 2 726 754 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73

5 < 211> 36

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<400> 73

ggaggatcca tagacagatg ggggtgctgt ttggc 36

10 <210> 74

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<400> 74

15 ggaggatccc tggaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 75

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

20 <220>

< 221> rasgo_misc

< 222> (1)..(32)

< 223> las bases mixtas se definen de la siguiente manera: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

25 <400> 75

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32
 <210> 76
 < 211> 35
 < 212> ADN
 5 < 213> Mus sp.
 <220>
 < 221> rasgo_misc
 < 222> (1)..(35)
 10 < 223> las bases mixtas se definen de la siguiente manera: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G,
 W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T
 <400> 76
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35
 <210> 77
 < 211> 31
 15 < 212> ADN
 < 213> Mus sp.
 <220>
 < 221> rasgo_misc
 < 222> (1)..(31)
 20 < 223> las bases mixtas se definen de la siguiente manera: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G,
 W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T
 <400> 77
 ggagctcgay attgtgmts a cmcarwctmc a 31
 <210> 78
 25 < 211> 46
 < 212> ADN
 < 213> Mus sp.
 <400> 78
 tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tgggtc 46
 30 <210> 79
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Mus sp.
 <400> 79
 35 atggagtcac agattcaggt c 21
 <210> 80
 < 211> 32

ES 2 726 754 T3

< 212> ADN

< 213> Mus sp.

<400> 80

tttgaattc cagtaacttc aggtgtccac tc 32

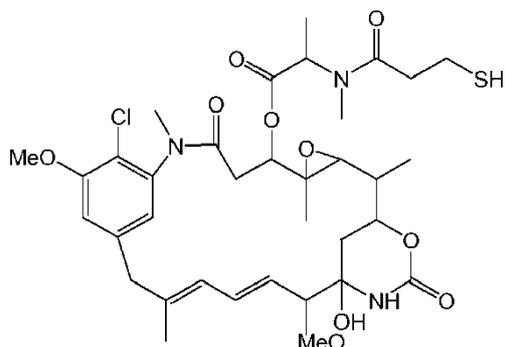
5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a CD38, en donde:
 - i. dicho anticuerpo es capaz de inactivar una célula CD38⁺ por apoptosis, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC);
 - 5 ii. dicho anticuerpo comprende por lo menos una cadena pesada, por lo menos una cadena ligera y por lo menos una región constante humana;
 - iii. dicha cadena pesada comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.66; y
 - iv. dicha cadena ligera comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.62.
- 10 2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es capaz de inactivar dicha célula CD38⁺ por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma.
3. Un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha célula CD38⁺ es una célula de linfoma, una célula de leucemia o una célula de mieloma múltiple.
- 15 4. El anticuerpo según la reivindicación 3, en donde dicha célula CD38⁺ es una célula de linfoma no Hodgkin (NHL), una célula de linfoma de Burkitt (BL), una célula de mieloma múltiple (MM), una célula de leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), una célula de leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), una célula de linfoma de células T (TCL), una célula de leucemia mieloide aguda (AML), una célula de leucemia de células vellosas (HCL), una célula de linfoma de Hodgkin (HL) o una célula de leucemia mieloide crónica (CML).
5. Un anticuerpo según la reivindicación 1, en donde:
 - 20 • dicho anticuerpo es capaz de inactivar por lo menos 24 % de células de linfoma Daudi por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 7 % de células de linfoma Ramos por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - 25 • dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 11 % de células de mieloma múltiple MOLP-8 por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 36 % de células de linfoma SU-DHL-8 por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 62 % de células de leucemia DND-41 por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - 30 • dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 27 % de células de linfoma NU-DUL-1 por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 9 % de células de leucemia JVM-13 por apoptosis en ausencia de células estromales o citocinas derivadas de estroma; y/o
 - dicho anticuerpo es capaz de inactivar más de 4 % de células de leucemia HC-1 por apoptosis en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma.
 - 35
6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo se une a CD38 con un valor k_D de 3×10^{-9} M o menos.
7. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o con superficie reacondicionada.
- 40 8. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha región constante humana es la región constante humana IgG1/Kappa.
9. Un conjugado que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 enlazado a un agente citotóxico.
- 45 10. El conjugado según la reivindicación 9, en donde dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, un fármaco pequeño, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065.

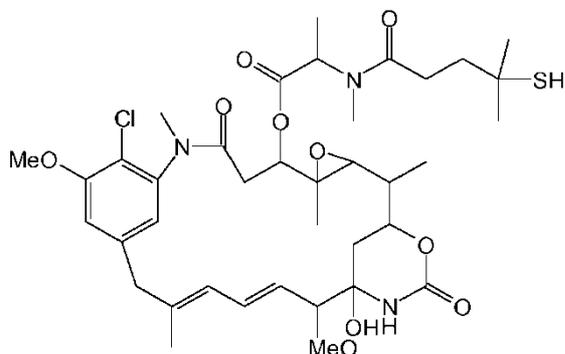
11. El conjugado según la reivindicación 10, en donde:

• dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de fórmula:



o

5 • dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula:



o

• dicho agente citotóxico es un derivado de tomaimicina seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 ◦8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 ◦8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 ◦8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilo)-2,6-piridinadiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropilo)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 ◦ 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 ◦ éster terc butílico de ácido bis-[2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil]-carbámico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 ◦ 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 ◦ 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 ◦ 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 ◦ 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-f2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 35 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 40 ◦ 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], o
- 45 • dicho agente citotóxico es un derivado de leptomicina seleccionado del grupo que consiste en:

- (2-Metilsulfanil-etil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-Hidroxi-3,5, 7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
 - Bis-[(2-mercaptoetil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9, 11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico]
- 5 ◦ (2-Mercapto-etil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11, 15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- (2-Metildisulfanil-etil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- 10 ◦ (2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico
- (2-Mercapto-2-metil-propil)-amid de ácido (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hidroxi-3,5,7,9,11,15,17-heptametil-19-((2S,3S)-3-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoico.
12. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para uso como medicamento.
- 15 13. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, en donde dicha composición contiene otro agente terapéutico adicional.
- 20 15. La composición farmacéutica según la reivindicación 14, en donde el otro agente terapéutico es un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un antagonista de un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluido el receptor HER2, receptor HER3, c-MET y otros receptores de tirosina cinasas; o dicho otro agente terapéutico es un anticuerpo dirigido contra un grupo de antígenos de diferenciación seleccionados del grupo que comprende CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138 y CD152.
- 25 16. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune.
- 30 17. El anticuerpo o conjugado para uso según la reivindicación 16, en donde dicho cáncer es mieloma múltiple.
18. El anticuerpo o conjugado para uso según la reivindicación 16 en donde dicho cáncer es linfoma de células B.
- 35 19. El anticuerpo o conjugado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el tratamiento comprende además el uso de otro agente terapéutico en la misma composición o en una composición diferente.
- 40 20. El anticuerpo o conjugado para uso según la reivindicación 19, en donde el otro agente terapéutico es un antagonista del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un antagonista de un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de tejido (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimuladora de macrófagos (MSP) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluido el receptor HER2, receptor HER3, c-MET y otros receptores de tirosina cinasas; o dicho otro agente terapéutico es un anticuerpo dirigido contra un grupo de antígenos de diferenciación seleccionados del grupo que comprende CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138 y CD152.
- 45 21. Un polinucleótido en donde:
- dicho polinucleótido codifica un anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; o

• dicho polinucleótido codifica una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

22. Un vector recombinante que comprende un polinucleótido según la reivindicación 21.

23. Una célula hospedante que comprende un vector según la reivindicación 22.

Fig. 1A
 α -ratón de cabra
IgG-FITC solamente

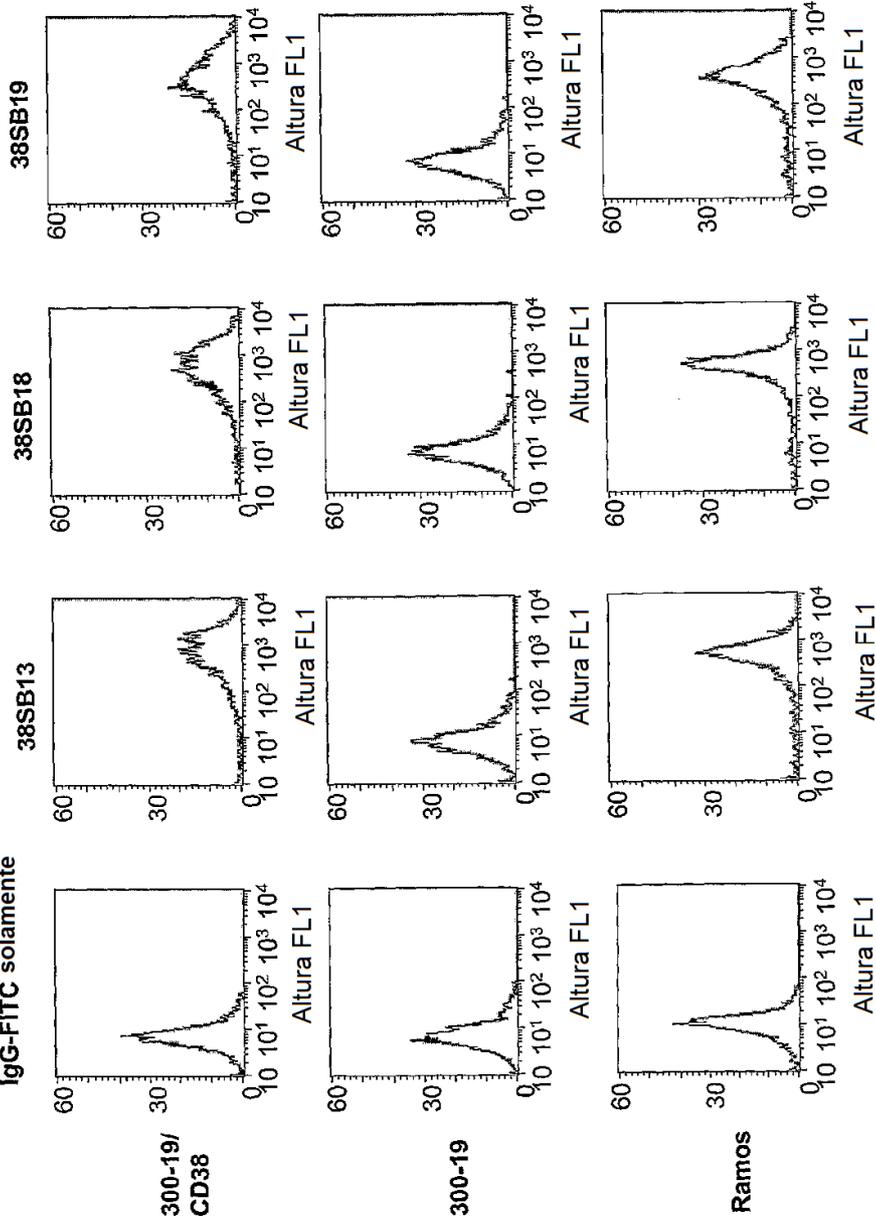


Fig. 1B

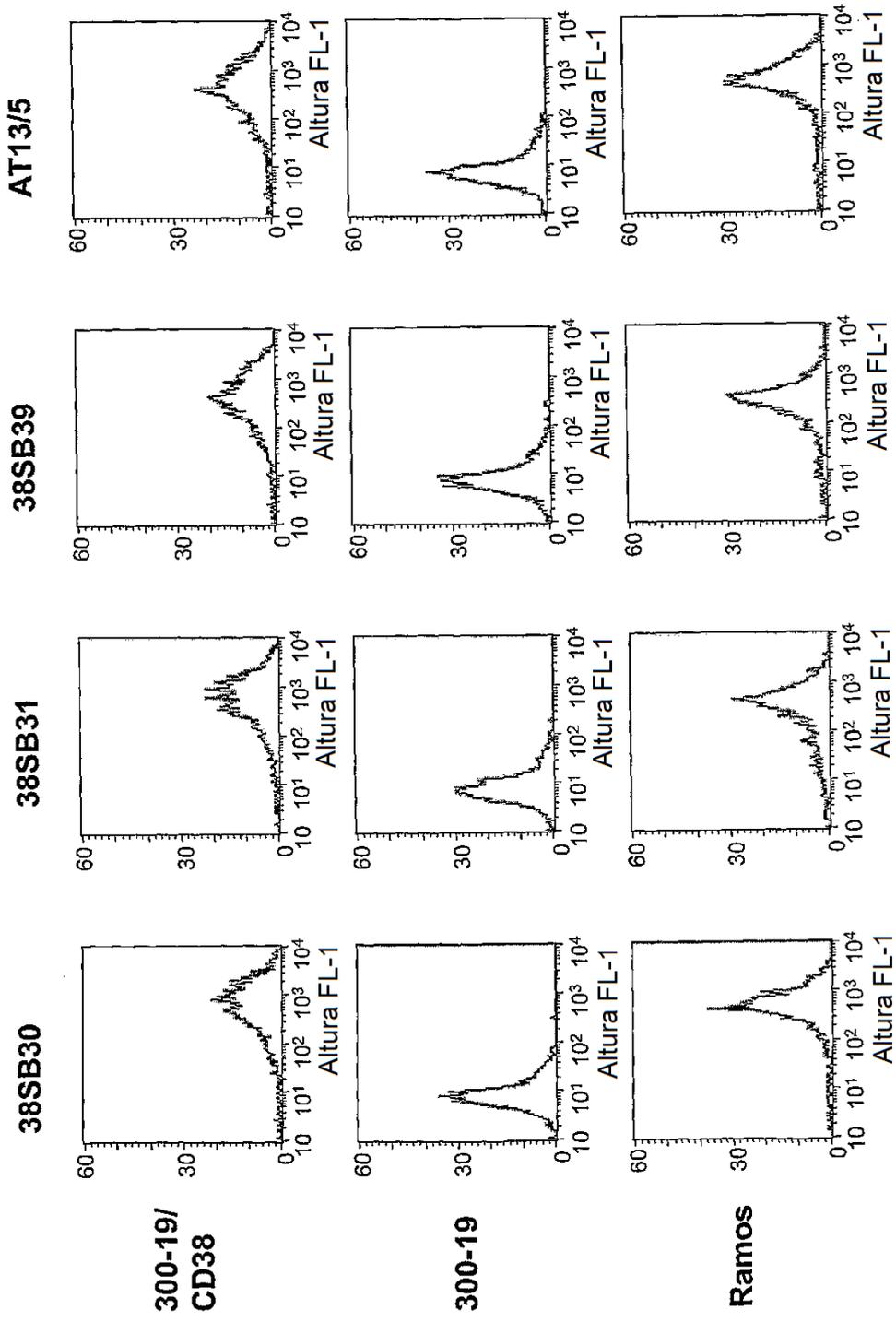


Fig. 2

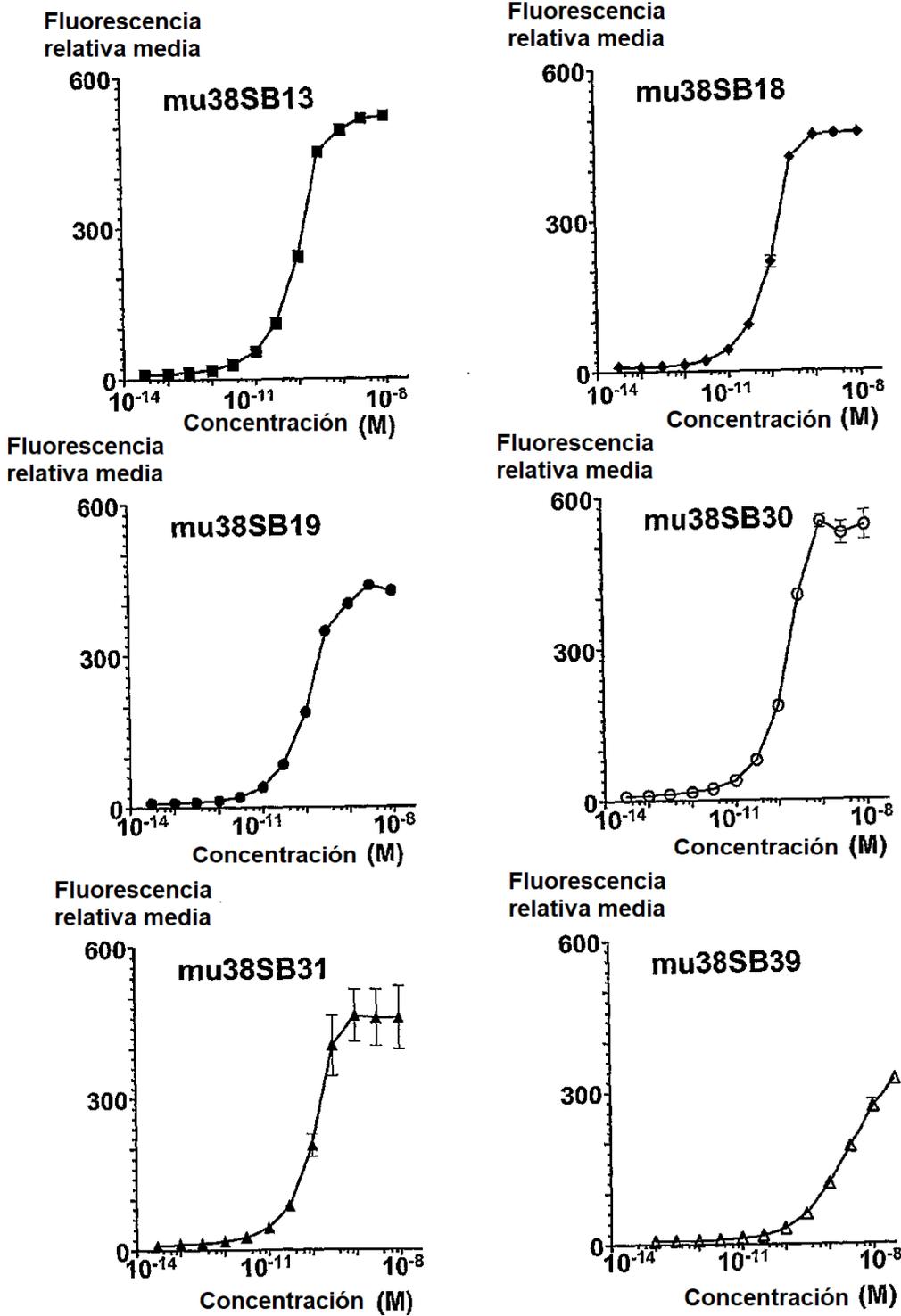


Fig. 3

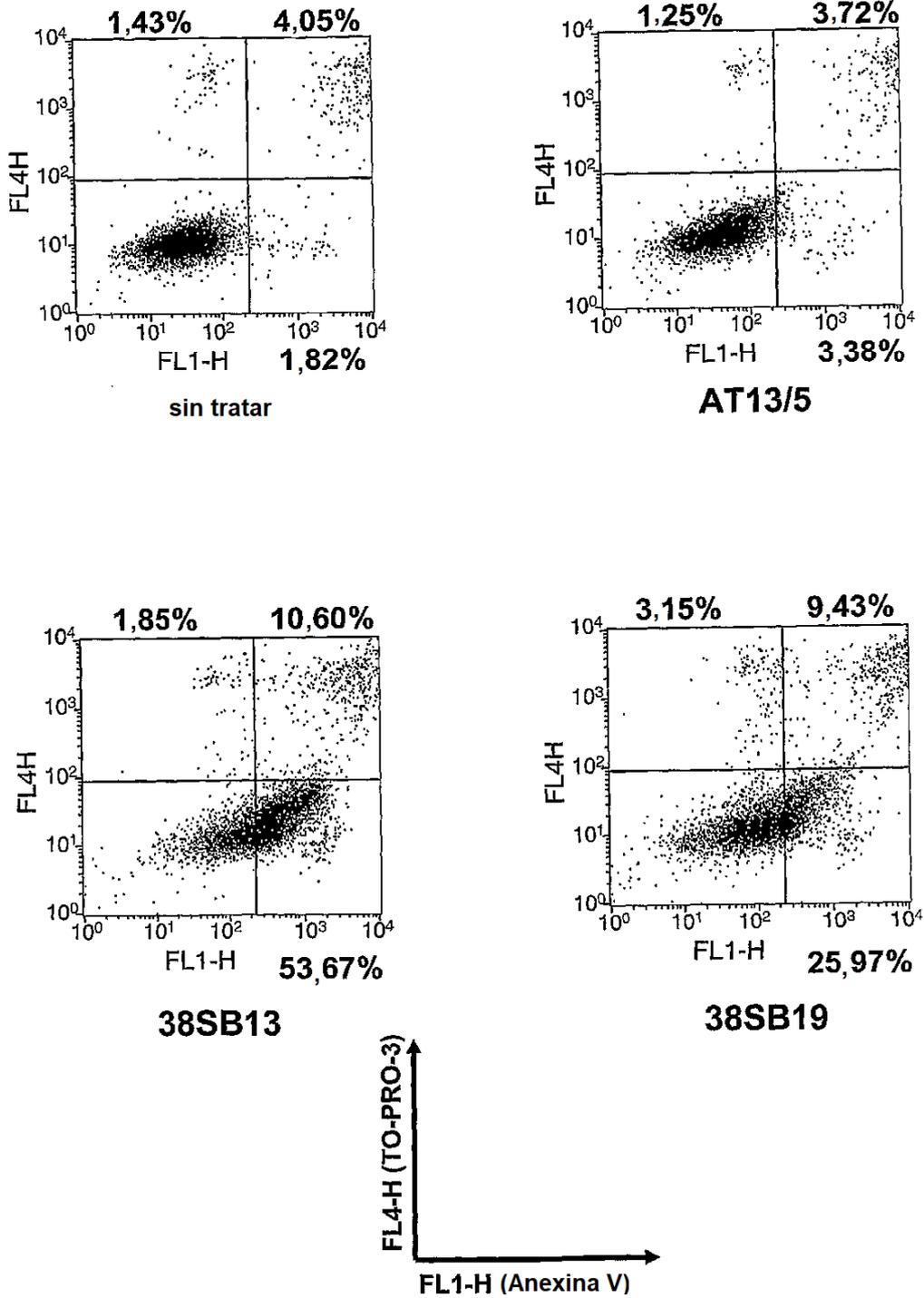


Fig. 4A

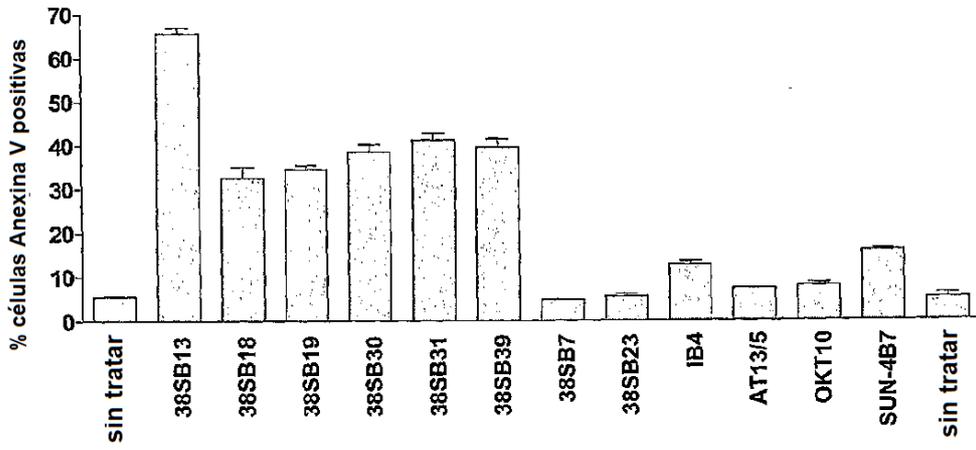


Fig. 4B

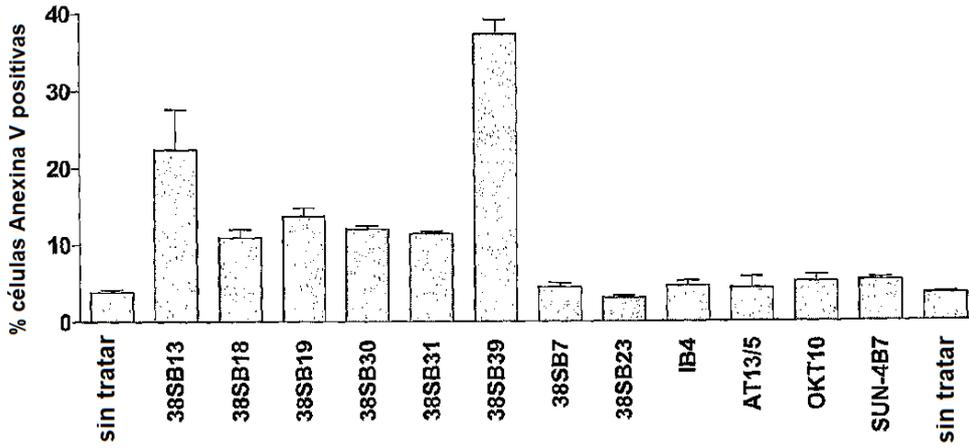


Fig. 4C

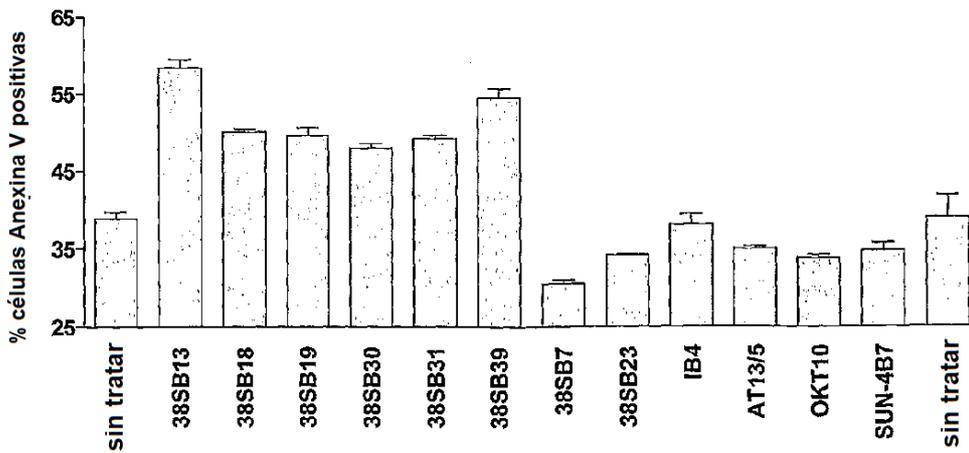


Fig. 5A

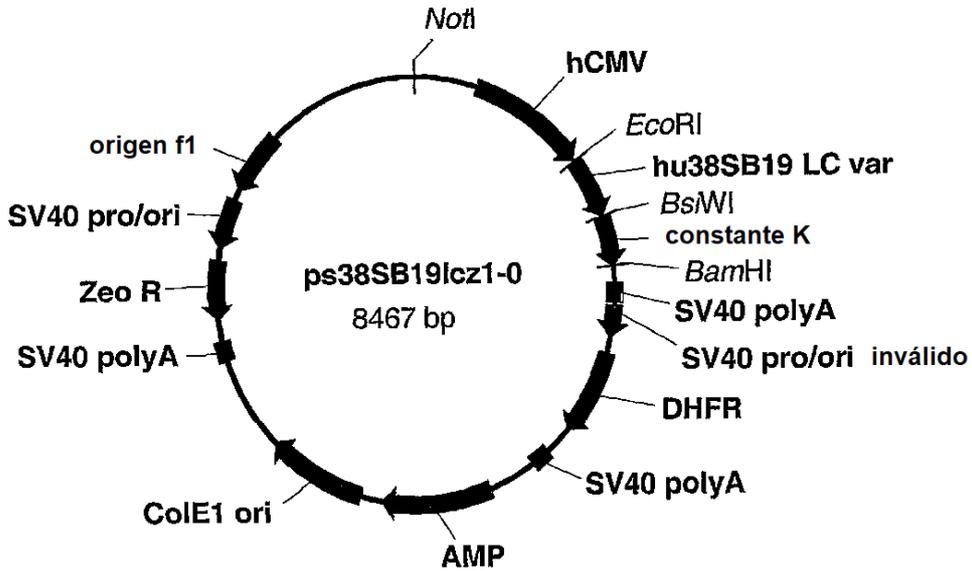


Fig. 5B

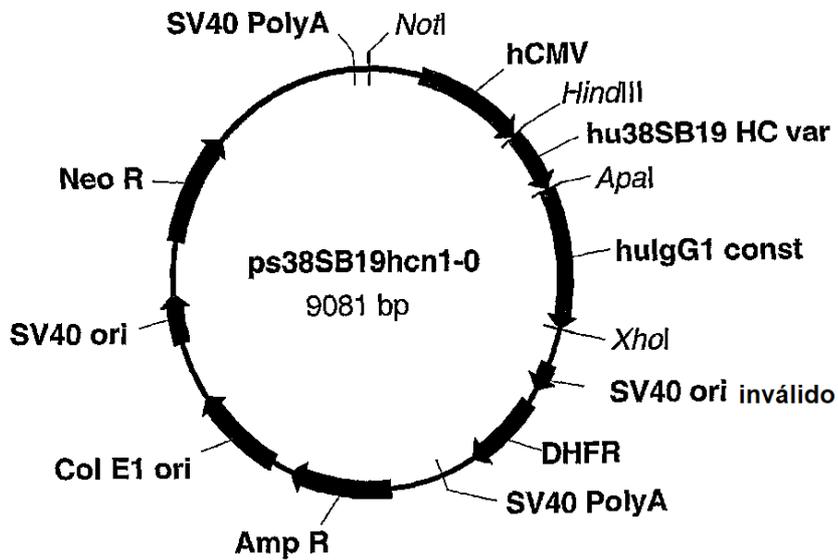


Fig. 5C

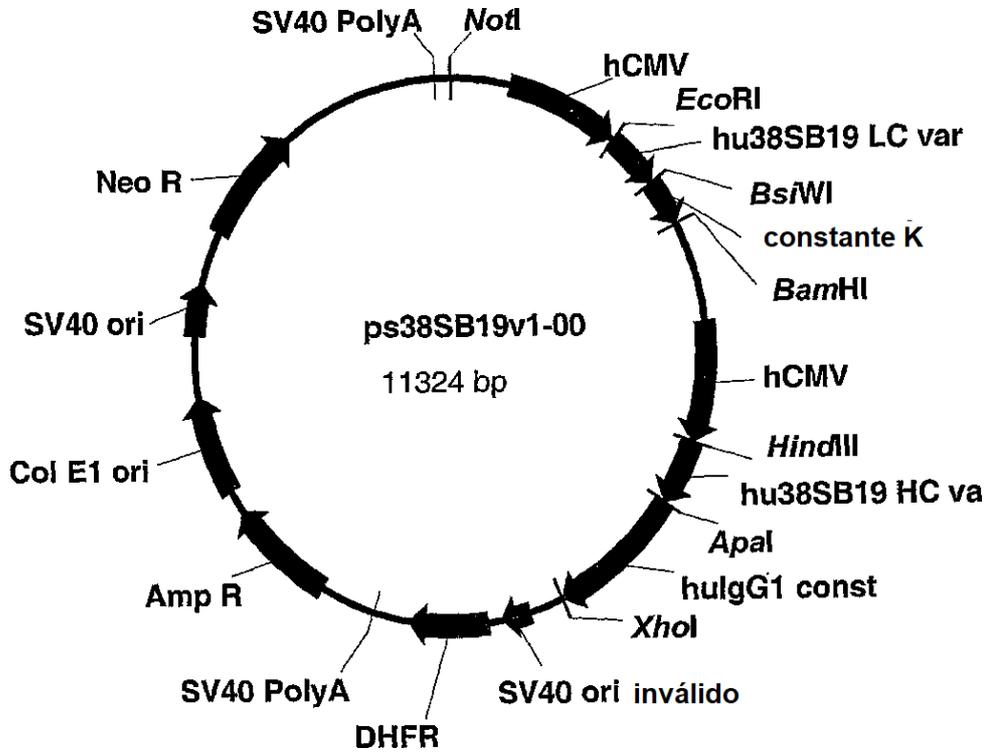


Fig. 6A

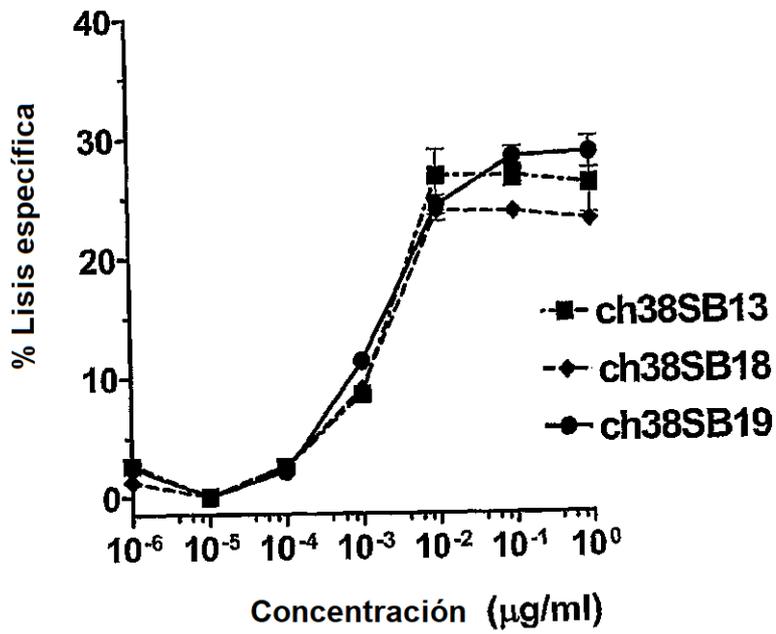


Fig. 6B

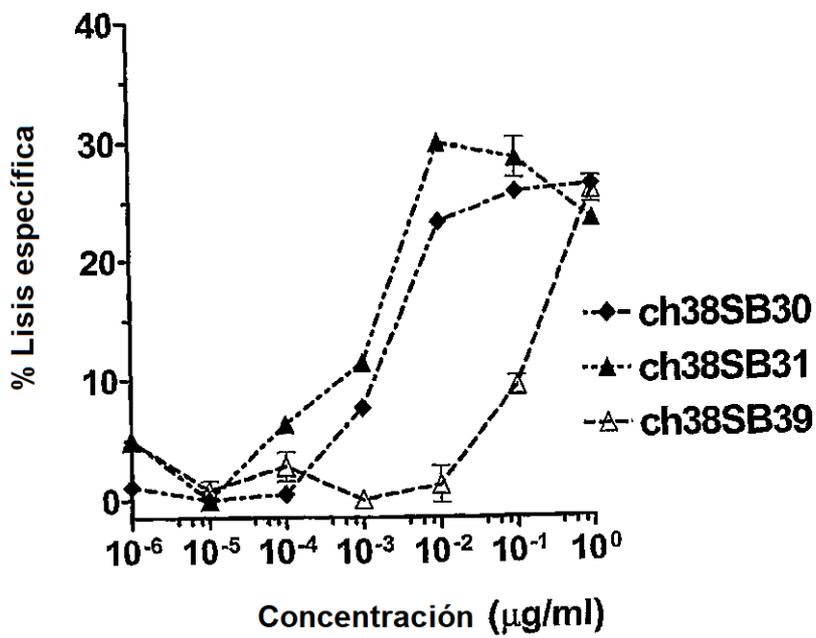


Fig. 7A

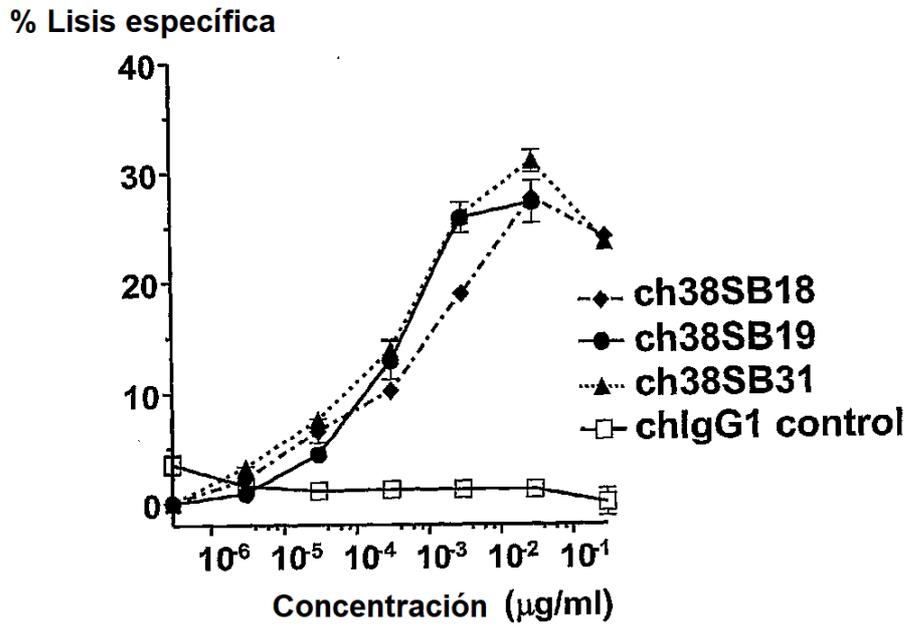


Fig. 7B

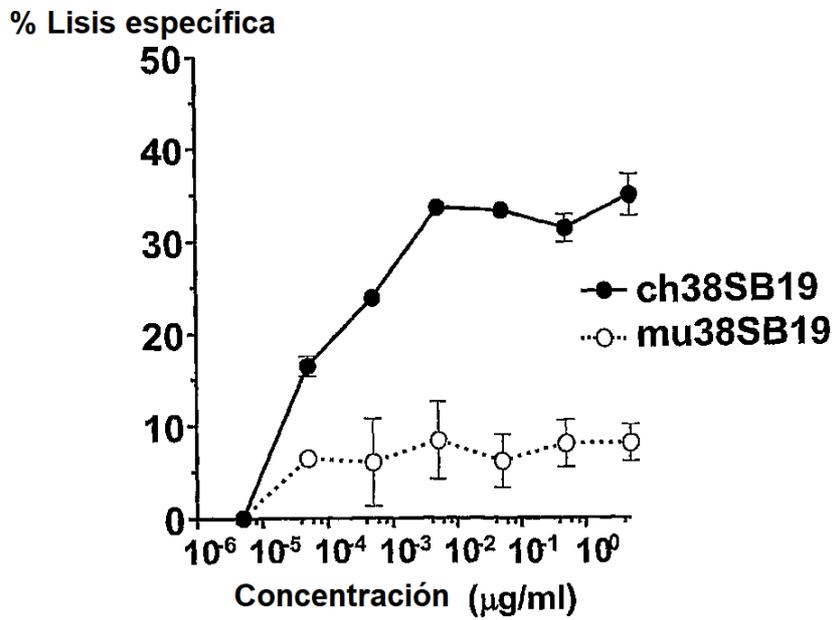


Fig. 8A

% Lisis específica

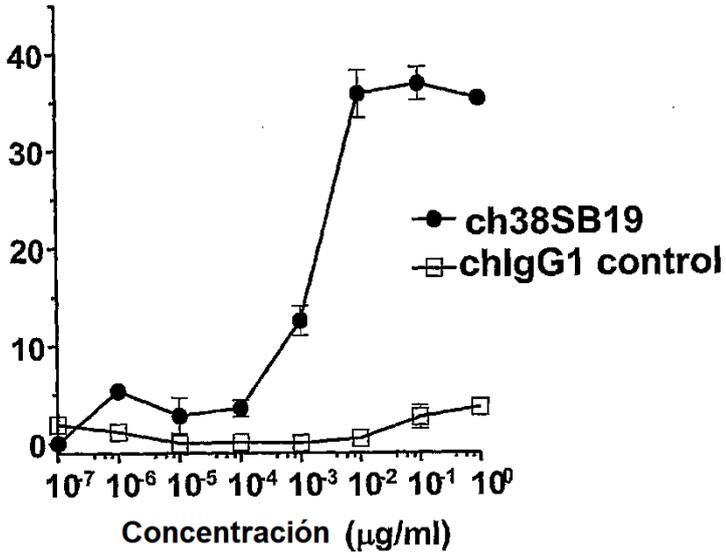


Fig. 8B

% Lisis específica

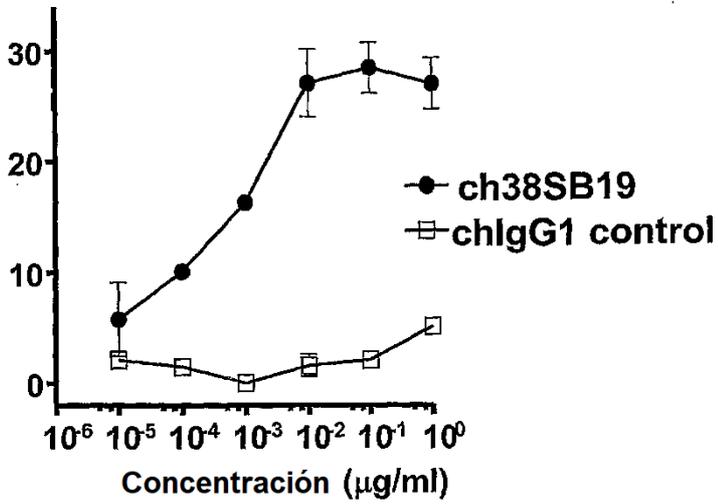


Fig. 9 A

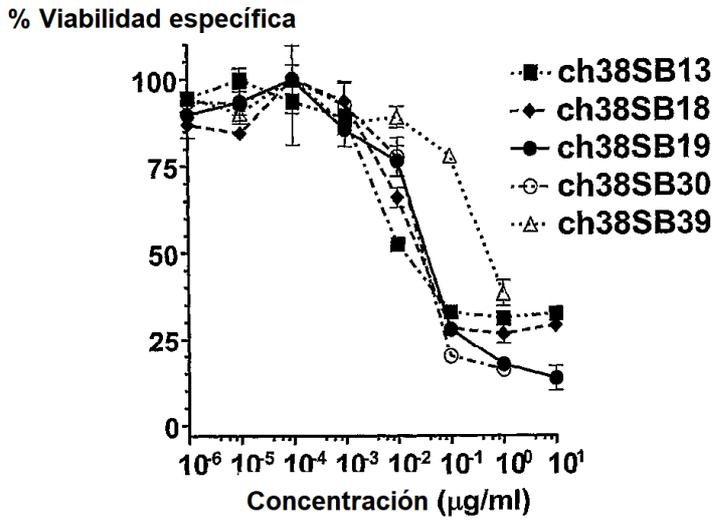


Fig. 9 B

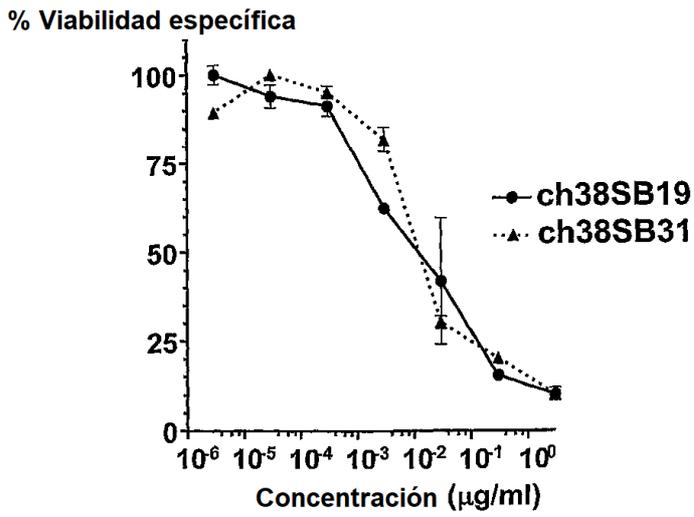


Fig. 10

% Viabilidad específica

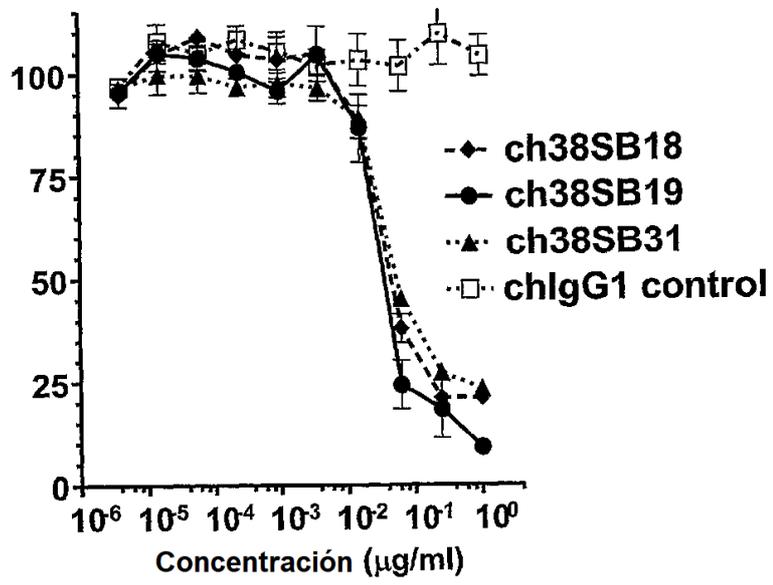


Fig. 11A

% Viabilidad específica

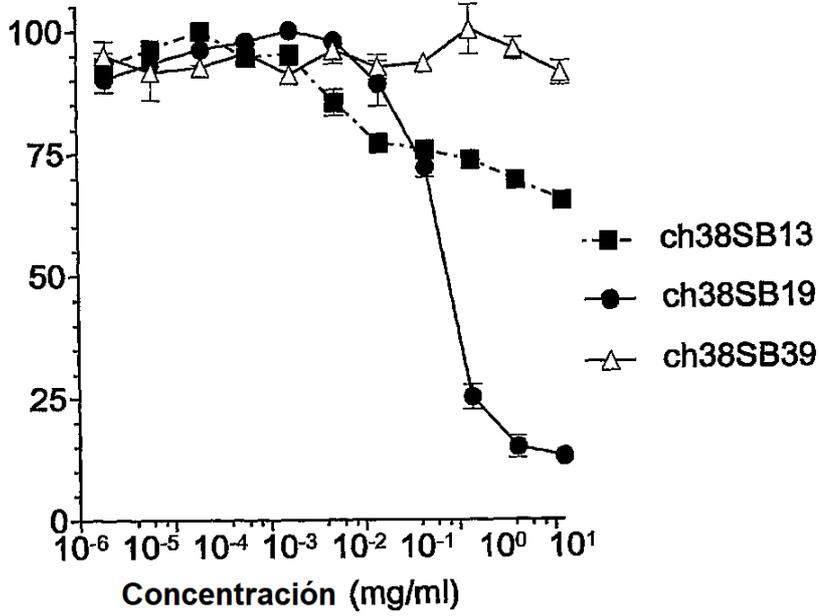


Fig. 11B

% Viabilidad específica

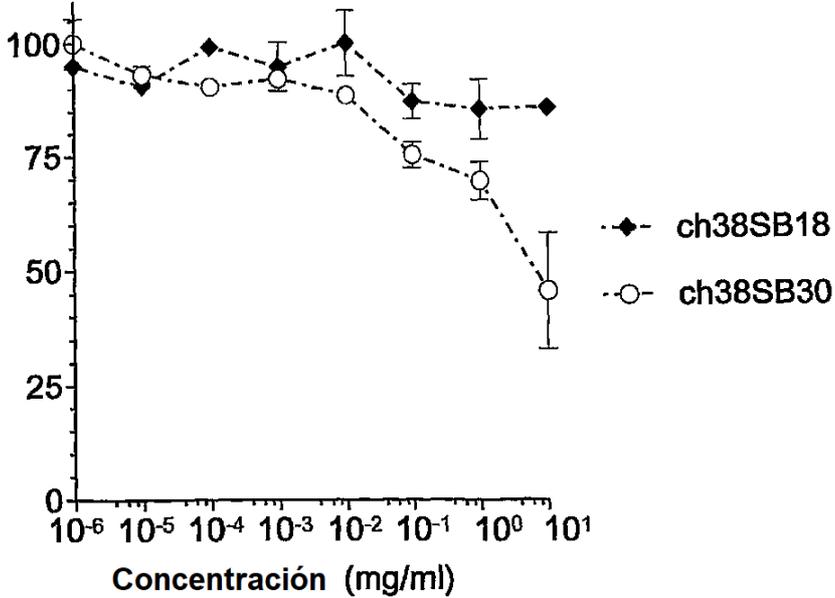


Fig. 11C

% Viabilidad específica

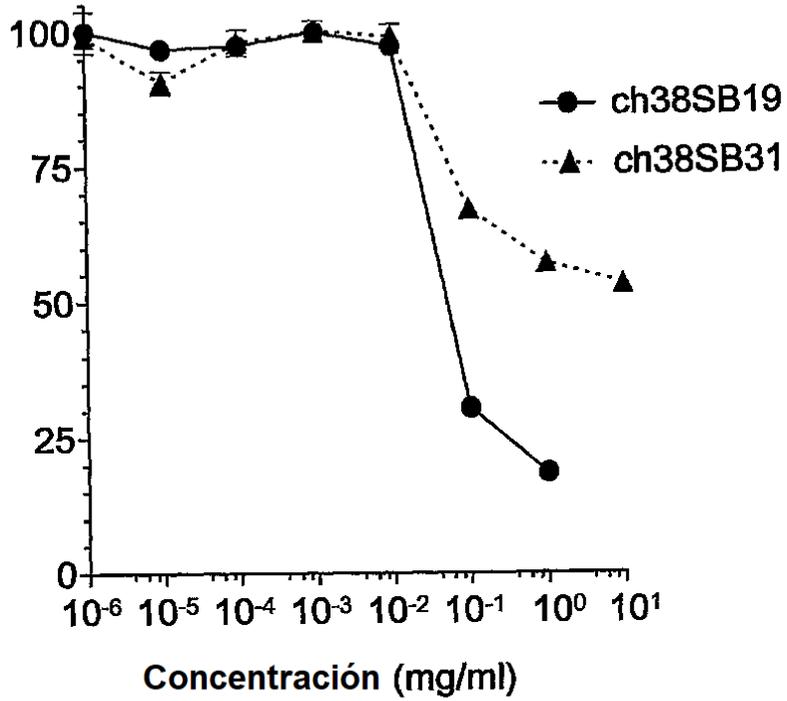


Fig. 12A

Fluorescencia relativa media

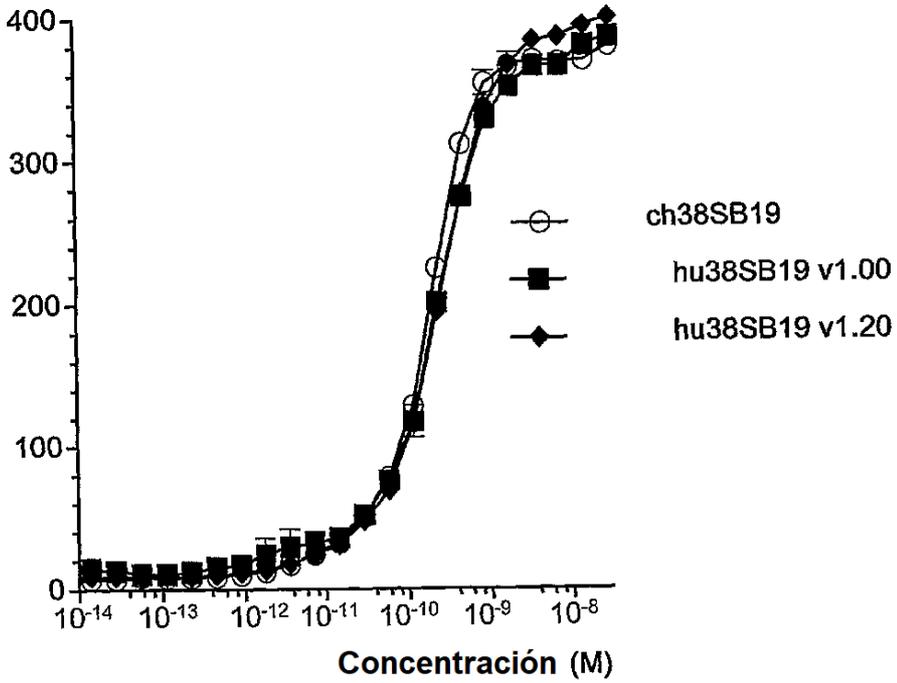


Fig. 12B

Fluorescencia relativa media

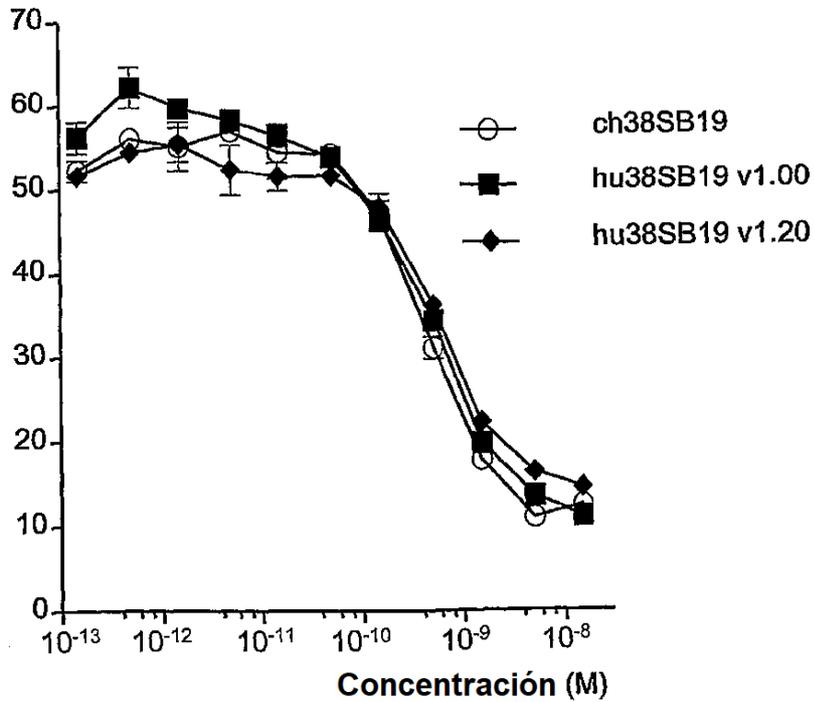


Fig. 13

% células Anexina V positivas

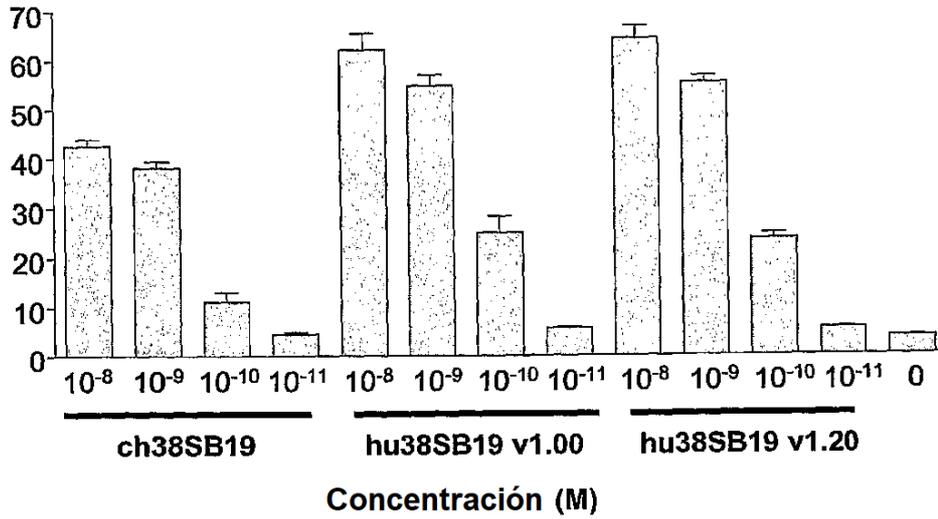


Fig. 14

% Lisis específica

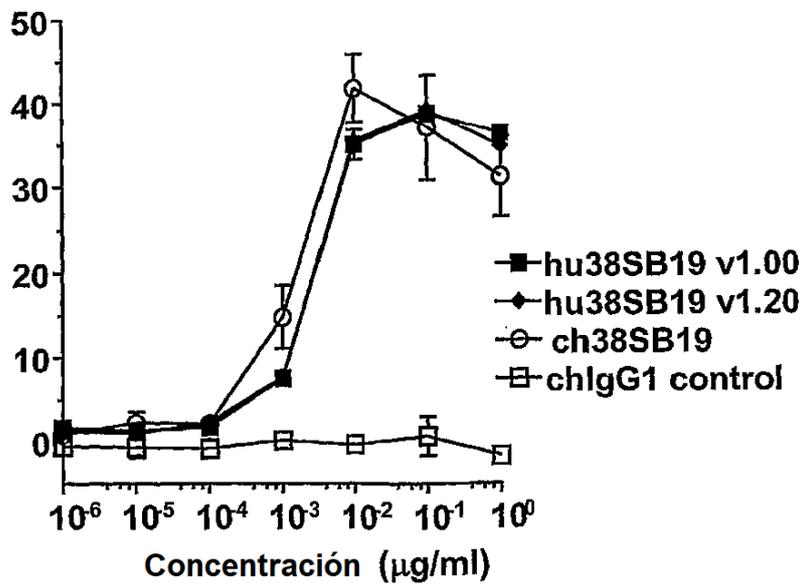


Fig. 15A

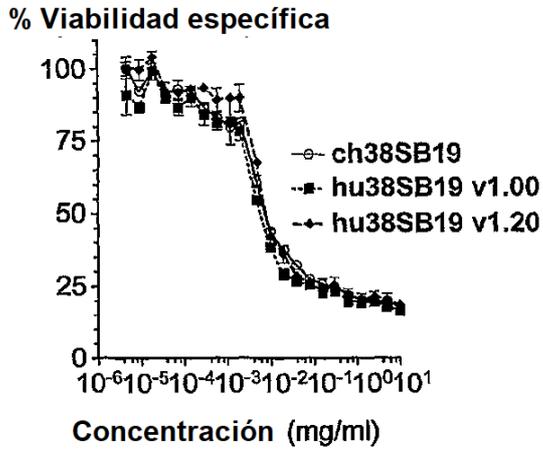


Fig. 15B

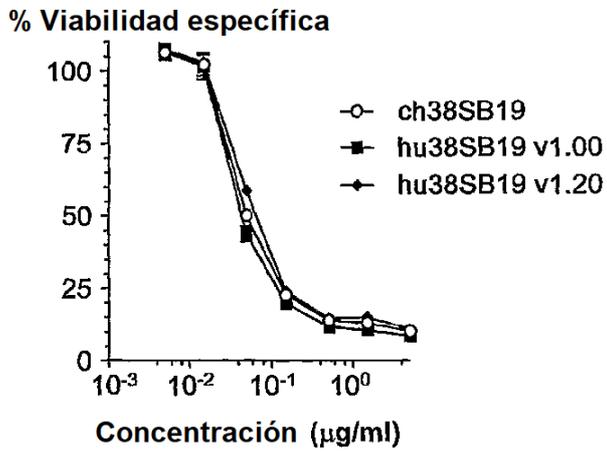


Fig. 15C

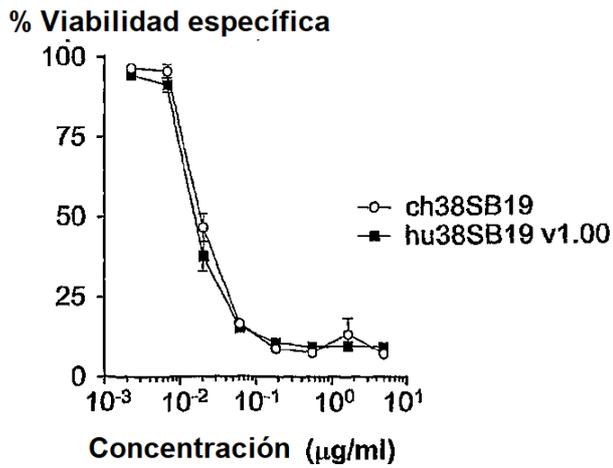


Fig. 16

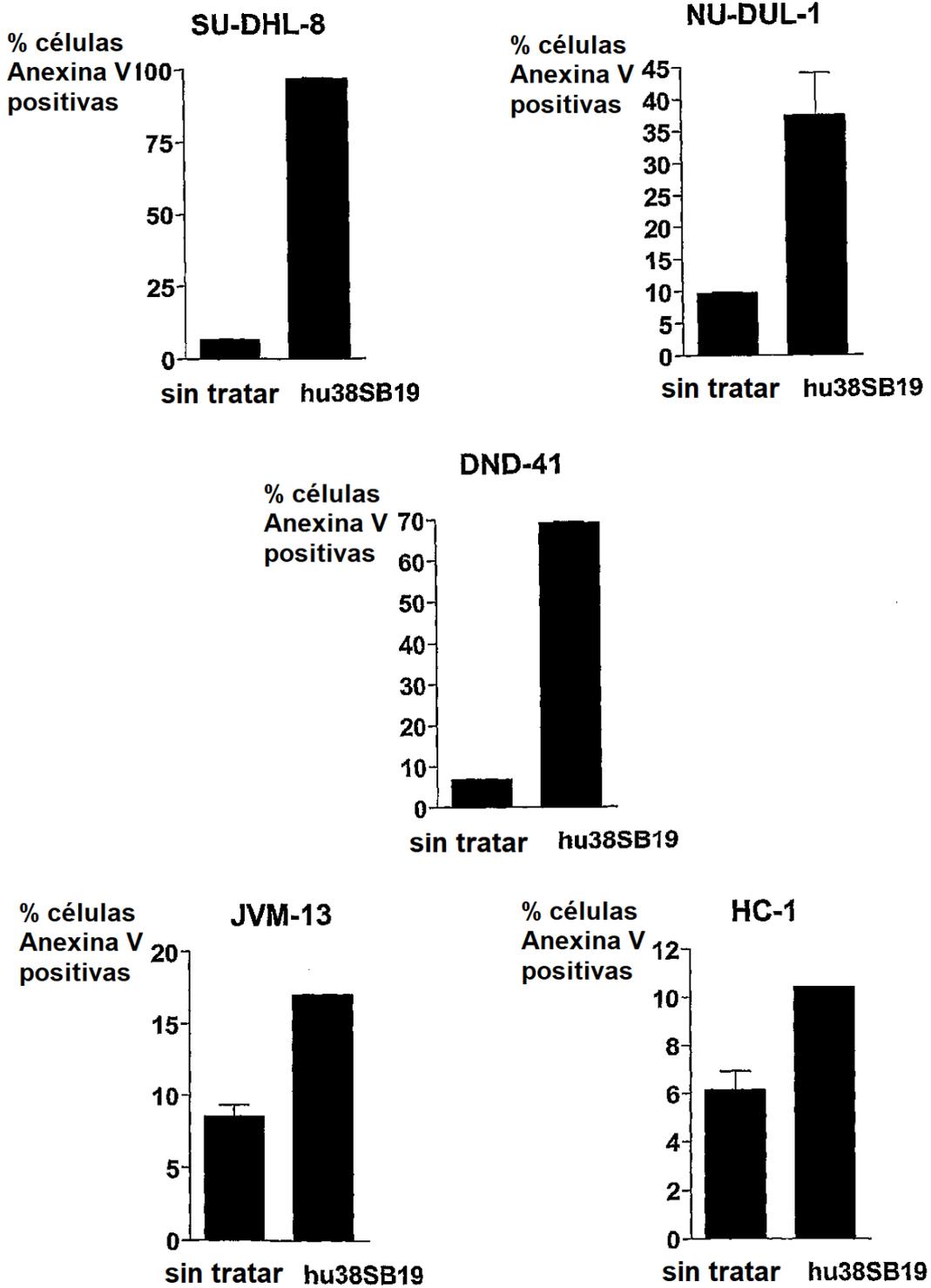
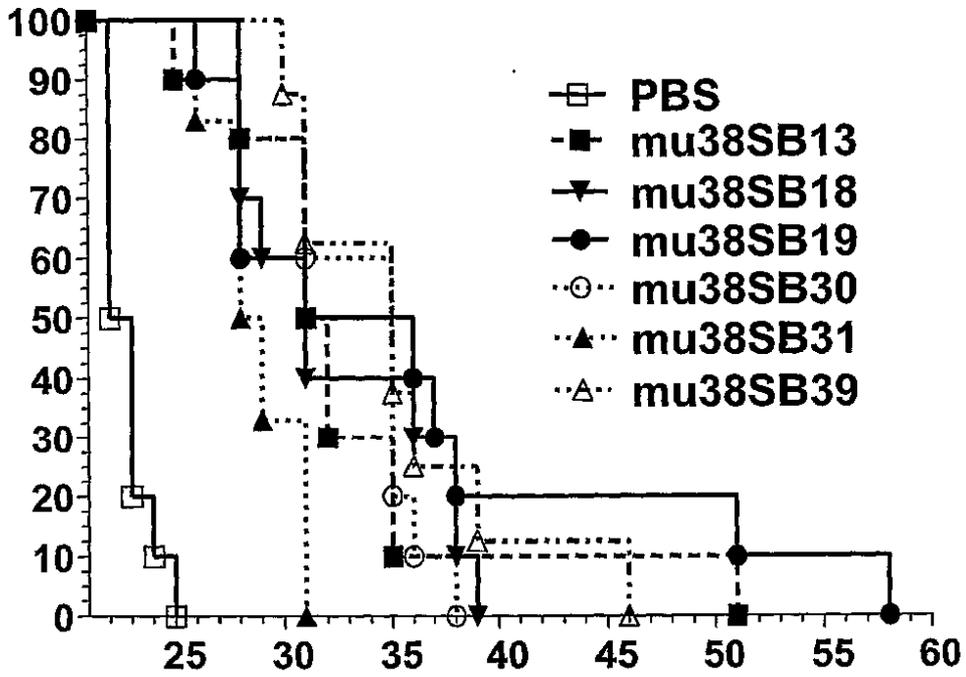


Fig. 17

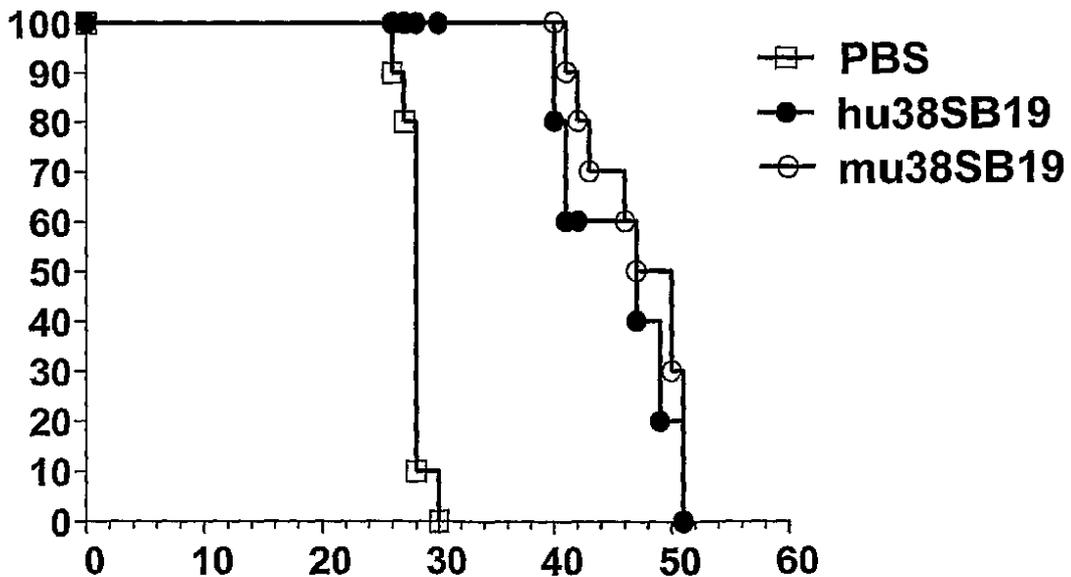
% Supervivencia



Días después de la inoculación iv de las células tumorales

Fig. 18

% Supervivencia



Días después de la inoculación iv de las células tumorales

Fig. 19

Volumen medio del tumor (mm³)

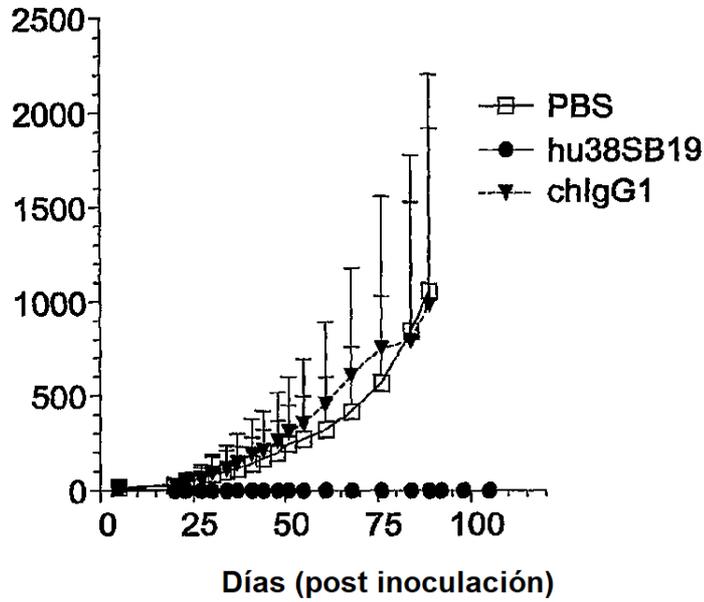


Fig. 20

Volumen medio del tumor (mm³)

