

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCIÓN**

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

54. TÍTULO \_\_\_\_\_  
NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CD38 PARA EL TRATAMIENTO DEL  
CANCER  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL \_\_\_\_\_

71. SOLICITANTE \_\_\_\_\_  
SANOFI AVENTIS

DOMICILIO \_\_\_\_\_  
PARIS, FRANCIA

74. APODERADO \_\_\_\_\_  
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ  
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., \_\_\_\_\_



4.

Datos del trámite

CONVERSION

Expediente \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
De: \_\_\_\_\_  
A: \_\_\_\_\_

DIVISION

Expediente : 09.039.181  
De: \_\_\_\_\_  
A: \_\_\_\_\_

FUSION

Expediente \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
De: \_\_\_\_\_  
A: \_\_\_\_\_

5.

Comprobante de Pago No 13-0062687

Comprobante de Pago No 13-0067101

Fecha: 2013/06/26

Fecha: 2013/07/08

6.

Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000.

☒

Comprobante de pago por 8 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$240.000

☒

Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☒

Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐

Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

|                            |                                                                                      |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 7. Firma                   |                                                                                      |
| Nombre y apellidos         | Firma                                                                                |
| LUZ CLEMENCIA DE PAEZ      |  |
| C.C. 35.456.344 DE Usaquén | Tarjeta Profesional 23.555                                                           |

**NOTA:** Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 09.039.181. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio de la resolución No. 38313 notificado por fijación en lista del 02 de julio de 2013. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 17 de abril de 2009 y la prioridad que allí se reivindica el 19 de octubre de 2006.

**Nota:** La copia básica original se encuentra en el expediente No. 09.039.181

## NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CD38 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La CD38 es una glucoproteína transmembranal tipo II de 45kD con un largo dominio extracelular C-terminal y un corto dominio citoplásmico N-terminal. La proteína CD38 es una ectoenzima bifuncional que puede catalizar la conversión de  $\text{NAD}^+$  en ADP-ribosa cíclica (cADPR) y también hidrolizar la cADPR hasta ADP-ribosa. Durante la ontogenia, la CD38 aparece sobre las células madres comprometidas con  $\text{CD34}^+$  y los progenitores comprometidos con la línea de las células linfoides, eritroides y mieloides. La expresión de CD38 persiste principalmente en la línea linfoide con niveles variables de expresión a diferentes fases de desarrollo de las células T y B.

La CD38 está aumentada en muchas neoplasias hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diferentes neoplasias hematopoyéticas, incluyendo el 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 peludas (HCL), linfoma Hodgkin (HL), y leucemia mieloide crónica (CML). Por otro lado, las células madres pluripotentes más primitivas del sistema hematopoyético son las  $\text{CD38}^-$ . La expresión de CD38 en las neoplasias hematopoyéticas y su correlación con la progresión de la enfermedad hace de CD38 una diana atractiva para la terapia con anticuerpos.

Se ha publicado que la CD38 está implicada en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  (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, incluyendo la fosfolipasa C- $\gamma$ , ZAP-70, syk, y c-cbl, en las células o líneas de células 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 U S A*, **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). Basándose en estas observaciones, se ha presentado a CD38 como una importante molécula de señalización en la maduración y activación de las células linfoides y mieloides durante su desarrollo normal.

El papel exacto de la CD38 en la transducción de señales y en la hematopoyesis todavía no está claro, especialmente porque la mayor parte de estos estudios de transducción de señales han utilizado líneas de células que sobreexpresan ectópicamente CD38 y anticuerpos monoclonales anti-CD38, que son ligandos no

fisiológicos. Debido a que la proteína CD38 tiene una actividad enzimática que produce cADPR, una molécula que puede inducir la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  (H. C. Lee *et al.*, 1989, *J Biol Chem*, **264**: 1608-1615; H. C. Lee and R. Aarhus, 1991, *Cell Regul*, **2**: 203-209), se ha pensado que el ligamiento de CD38 por anticuerpos monoclonales provoca la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  y la transducción de señales en los linfocitos mediante el aumento de producción de cADPR (H. C. Lee *et al.*, 1997, *Adv Exp Med Biol*, **419**: 411-419). Contrariamente a esta hipótesis, el análisis por truncamiento y mutación puntual de la proteína CD38 ha demostrado que ni su tallo citoplásmico ni su actividad enzimática son necesarios para la señalización mediada por los 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).

Las mejores pruebas de la función de CD38 vienen de los ratones transgénicos privados de CD38<sup>-/-</sup>, 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 las células dendríticas (S. Partida-Sanchez *et al.*, 2004, *Immunity*, **20**: 279-291; S. Partida-Sanchez *et al.*, 2001, *Nat Med*, **7**: 1209-1216). Sin embargo, no está claro si la función de CD38 en los ratones es idéntica a la que tiene en los seres humanos puesto que el patrón de expresión de CD38 durante la hematopoyesis difiere en gran medida entre el ser humano y el ratón: a) a diferencia de las células madres progenitoras inmaduras de los seres humanos, las células madres progenitoras similares de los 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 las células B humanas, se encuentran altos niveles de expresión de CD38 en las células B germinales centrales y en las células del plasma (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 correspondientes células 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).

En la bibliografía han sido descritos varios anticuerpos anti-CD38 humano con diferentes propiedades proliferativas sobre diferentes células tumorales y líneas celulares. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico OKT10 con Fab de ratón y IgG1 Fc humano media en la citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo (ADCC) de manera muy eficaz frente a las células de linfoma en presencia de células efectoras mononucleares de la sangre periférica procedente o de pacientes MM (mieloma múltiple), o de individuos normales (F. K. Stevenson *et al.* 1991, *Blood*, **77**: 1071-1079). Se ha demostrado que una versión humanizada de injerto CDR del anticuerpo AT13/5 anti-CD38 tiene una potente actividad ADCC frente a las líneas de células CD38-positivas (US 09/797.941 A1). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD38 median en la destrucción *in vitro* de líneas de células

CD38-positivas por la ADCC y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y retrasan el crecimiento tumoral en los ratones SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa) portadores de la línea celular de MM, RPMI-8226 (WO2005/103083 A2). Por otro lado, varios anticuerpos anti-CD38, IB4, SUN-4B7, y OKT10, pero no IB6, AT1, o AT2, inducen la proliferación de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) en individuos normales (C. M. Ausiello *et al.* 2000, *Tissue Antigens*, **56**: 539-547).

Algunos de los anticuerpos de la técnica anterior han demostrado ser capaces de provocar la apoptosis en las células B CD38<sup>+</sup>. Sin embargo, sólo pueden hacer esto en presencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. Ha sido descrito un anticuerpo anti-CD38 antagonista (IB4) que evita la apoptosis de las células B del centro germinal humano (GC) (S. Zupo *et al.* 1994, *Eur J Immunol*, **24**: 1218-1222), y que induce la proliferación de las células KG-1 y HL-60 AML (M. Konopleva *et al.* 1998, *J Immunol*, **161**: 4702-4708), pero induce la apoptosis en las células linfoblásticas T de Jurkat (M. Morra *et al.* 1998, *FASEB J*, **12**: 581-592). Otro anticuerpo T16 anti-CD38 indujo la apoptosis de células linfoides inmaduras y de células linfoblásticas leucémicas de un paciente ALL (leucemia linfoblástica aguda) (M. Kumagai *et al.* 1995, *J Exp Med*, **181**: 1101-1110), y de células mieloblásticas leucémicas de pacientes AML (leucemia mieloide aguda) (E. Todisco *et al.* 2000, *Blood*, **95**: 535-542), pero T16 indujo la apoptosis solamente en presencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma (IL-7, IL-3, factor de célula madre).

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

Puesto que CD38 es una atractiva diana para la terapia con anticuerpos para diferentes neoplasias hematopoyéticas, se han generado y cribado un gran número de anticuerpos anti-CD38 humano en cuanto a alta potencia en las tres siguientes actividades citotóxicas frente a las células hematopoyéticas malignas CD38-positivas: inducción de apoptosis, ADCC, y CDC. La presente invención describe nuevos anticuerpos anti-CD38 capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por tres mecanismos citotóxicos diferentes: inducción de apoptosis, ADCC, y CDC. De forma sorprendente, la presente invención describe los primeros anticuerpos anti-CD38 que son capaces de inducir directamente la apoptosis de las células CD38<sup>+</sup>, incluso sin la presencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objetivo de la invención proporcionar anticuerpos que se unen específicamente con CD38, y que son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis. Mientras que algunos anticuerpos de la técnica anterior son capaces de provocar apoptosis solo

cuando se reticulan, pero de otra forma carecen de cualquier actividad apoptótica, los anticuerpos de la invención son capaces de inducir la muerte celular apoptótica de las células CD38<sup>+</sup> incluso cuando se incuban solos. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la invención son capaces de destruir las células B CD38<sup>+</sup> por ADCC o CDC. En otro aspecto más, los anticuerpos de la invención son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> mediante al menos dos de los mecanismos mencionados antes, esto es, apoptosis, ADCC, y CDC. De forma sorprendente, los anticuerpos de la invención son los primeros anticuerpos anti-CD38 de los que se ha demostrado que destruyen las células B CD38<sup>+</sup> mediante los tres mecanismos diferentes: apoptosis, ADCC, y CDC. En una realización adicional de la invención, dichos anticuerpos son capaces de destruir las células B CD38<sup>+</sup> por apoptosis incluso en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma.

Los anticuerpos de la invención son capaces en particular de destruir células malignas B CD38<sup>+</sup>, incluyendo las células de linfoma, las células de leucemia, y las células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula B CD38<sup>+</sup> 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 destruir al menos el 24 % de células Daudi de linfoma y/o al menos el 7 % de células Ramos de linfoma y/o el 11 % de células MOLP-8 de mieloma múltiple y/o el 36 % de células SU-DHL-8 de linfoma y/o el 62 % de células DND-41 de leucemia y/o el 27 % de células NU-DUL-1 de linfoma y/o el 9 % de células JVM-13 de leucemia y/o el 4 % de células HC-1 de la leucemia por apoptosis en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma.

Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Se prefieren los anticuerpos monoclonales anti-CD38. En una realización más preferida, se proporcionan anticuerpos murinos seleccionados entre 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39, que se caracterizan aquí completamente con respecto a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, las secuencias de cDNA de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de sus CDR (regiones determinantes de complementariedad), la identificación de sus aminoácidos de superficie, y los medios para su expresión en forma recombinante.

La presente invención incluye versiones quiméricas del anticuerpo monoclonal anti-CD38 murino seleccionado entre 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39. También se incluyen versiones de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 con la superficie modificada o humanizados en los que los residuos expuestos a la superficie de los marcos de la región variable de los anticuerpos, o sus fragmentos que se unen al epítipo, están reemplazados tanto en las

cadena ligera como en las pesadas por superficies de anticuerpos humanos conocidos más parecidas. Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de éstos que se unen al epítipo, de la presente invención, presentan propiedades mejoradas ya que son menos inmunogénicos (o totalmente no inmunogénicos) que las versiones murinas en sujetos humanos a los que se administran. De este modo, las diferentes versiones de anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 y los fragmentos de estos que se unen al epítipo, de la presente invención, reconocen específicamente a CD38 aunque no son inmunogénicos para un ser humano.

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 de la presente invención se caracterizan completamente en la presente memoria con respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, las secuencias de DNA de los genes de las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), la identificación de sus residuos de aminoácidos de superficie del marco de la región variable, y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante.

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

En una realización preferida, el agente de unión a las células es un anticuerpo anti-CD38 (por ejemplo, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39) o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo, más preferiblemente un anticuerpo humanizado anti-CD38 (por ejemplo, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39) o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo, en el que un agente citotóxico se une covalentemente, directamente o a través de un conector escindible o no escindible, al anticuerpo o al fragmento de éste que se une al epítipo. En las realizaciones más preferidas, los agentes de unión a las células son los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo, 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, los agentes de unión a las células son los anticuerpos humanizados anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39, y el agente citotóxico es un compuesto maitansina, tal como DM1 o DM4.

La presente invención engloba también el uso de fragmentos de anticuerpos anti-CD38 que retienen la capacidad de unirse a CD38. En otro aspecto de la invención, se

contempla el uso de equivalentes funcionales de los anticuerpos anti-CD38.

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

La presente invención proporciona también una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CD38 o un conjugado de anticuerpo anti-CD38 y 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 elegir del grupo que comprende los antagonistas de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante 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 tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante de macrófagos (MSP), o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluyendo el receptor HER2, receptor HER3, c-MET, u otro receptor de tirosina-cinasas. Este segundo agente terapéutico se puede elegir también del grupo compuesto de anticuerpos que se dirigen a antígenos de conjuntos de diferenciación (CD), incluyendo 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 segundo agente terapéutico se puede elegir también del grupo de agentes quimioterapéuticos o inmunomoduladores.

La presente invención incluye además un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer o una enfermedad inflamatoria, incluyendo las enfermedades autoinmunes utilizando la composición terapéutica. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de un grupo que consiste en NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, y CML. En otra realización, la enfermedad autoinmune se selecciona de un grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, 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 en adultos y juvenil, polimiositis en adultos, urticaria crónica, cirrosis biliar primaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neuromielitis óptica, enfermedad distiroidea de Graves, penfigoide ampolloso, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Churg-Strauss, y asma. En las realizaciones

preferidas, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo anti-CD38 y un agente citotóxico. En las realizaciones más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado de anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 con DM1, anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 con DM4 o un conjugado de anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 con taxano, y el conjugado se administra junto con un vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto de la invención, se utilizan los anticuerpos anti-CD38 para detectar la proteína CD38 en una muestra biológica. En una realización preferida, se utilizan dichos anticuerpos para determinar los niveles de CD38 en un tejido tumoral.

La presente invención incluye también un kit que comprende un anticuerpo anti-CD38 o un conjugado de anticuerpo anti-CD38 y agente citotóxico e instrucciones de uso. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-CD38 son los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39, el agente citotóxico es un compuesto maitansina, tal como DM1 o DM4, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, o un taxano, y las instrucciones son para el uso de los conjugados en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El kit puede incluir también 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.

A no ser que se indique otra cosa, todas las referencias y patentes citadas en la presente memoria se incorporan como referencia.

#### 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 con las células 300-19 que expresan CD38 humano y con las células Ramos de linfoma CD38-positivas.

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

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

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

La Fig. 4A muestra los porcentajes medios de las células Ramos que sufren 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 representó el porcentaje medio de células anexina V-positivas (eje de las y; incluye tanto las células positivas a TO-PRO-3 como las negativas) a partir de muestras duplicadas.

La Fig. 4B muestra los porcentajes medios de células Daudi que sufren 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 medios de células Molp-8 que sufren 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.

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 tanto hu38SB19LC como hu38SB19HC.

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

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

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

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

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

La Fig. 8B muestra actividades ADCC mediadas por el anticuerpo ch38SB19 y por el anticuerpo control IgG1 humano quimérico no reactivo, hacia las células MOLT-4 T-ALL.

La Fig. 9A muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, y ch38SB39 hacia las células Raji-IMG.

La Fig. 9B muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19 y ch38SB31 hacia las células Raji-IMG.

La Fig. 10 muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB18, ch38SB19, ch38SB31, y por el anticuerpo control IgG1 humano quimérico no reactivo, hacia las células LP-1 de mieloma múltiple.

La Fig. 11A muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB13, ch38SB19, y ch38SB39 hacia las células Daudi.

La Fig. 11B muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB18 y ch38SB30 hacia las células Daudi.

La Fig. 11C muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19 y ch38SB31 hacia las células Daudi.

La Fig. 12A muestra las de curvas de titulación de la unión de ch38SB19, hu38SB19 v1.00, y hu38SB19 v1.20 para la unión a las células Ramos.

La Fig. 12B muestra las curvas de unión que comparan ch38SB19, hu38SB19 v1.00, y hu38SB19 v1.00 en cuanto a su capacidad para competir con la unión del anticuerpo murino biotinilado 38SB19 a las células Ramos.

La Fig. 13 muestra los porcentajes medios de las células Daudi que sufren apoptosis después de 24 h de incubación con anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, o hu38SB19 v1.20.

La Fig. 14 muestra actividades ADCC mediadas por los anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20, y por el anticuerpo control IgG1 humano quimérico no reactivo, hacia las células LP-1 de mieloma múltiple.

La Fig. 15A muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, y hu38SB19 v1.20 hacia las células Raji-IMG de linfoma.

La Fig. 15B muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, y hu38SB19 v1.20 hacia las células LP-1 de mieloma múltiple.

La Fig. 15C muestra actividades CDC mediadas por los anticuerpos ch38SB19, hu38SB19 v1.00, y hu38SB19 v1.20 hacia las células DND-41 de leucemia fibroblástica aguda de células T.

La Fig. 16 muestra los porcentajes medios de las células anexina V-positivas después de 24 h de incubación con anticuerpo hu38SB19 v1.00 para las células SU-DHL-8 de linfoma de células B grandes difusas, células NU-DUL-1 de linfoma de células B, células DND-41 de leucemia fibroblástica aguda de células T, células JVM-13 de leucemia linfocítica crónica de células B y células HC-1 de leucemia de células peludas.

La Fig. 17 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID que tienen establecidos tumores Ramos humanos diseminados. Los ratones fueron tratados con anticuerpos murinos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 o PBS según se indica.

La Fig. 18 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID que tienen establecidos tumores Daudi humanos diseminados. Los ratones fueron tratados con anticuerpos hu38SB19 o mu38SB19 o PBS según se indica.

La Fig. 19 muestra el volumen medio del tumor de ratones SCID que tienen tumores por xenoinjerto de NCI-H929 de mieloma múltiple. Los ratones fueron tratados con anticuerpos hu38SB19, un anticuerpo control IgG1 no reactivo o PBS según se indica.

La Fig. 20 muestra el volumen medio del tumor de ratones SCID que tienen tumores por xenoinjerto de MOLP-8 de mieloma múltiple. Los ratones fueron tratados con

anticuerpos hu38SB19, mu38SB19, un anticuerpo control IgG1 no reactivo o PBS según se indica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan aquí nuevos anticuerpos capaces de unirse específicamente a CD38. En particular, en la presente invención se han descubierto nuevos anticuerpos que se unen específicamente con CD38 sobre la superficie celular y destruyen las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis. En un aspecto de la invención, los anticuerpos anti-CD38 son capaces también de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por la citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC). En otro aspecto, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En otro aspecto más, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por al menos dos de los mecanismos mencionados antes, apoptosis, ADCC, y CDC. En particular, en una realización preferida, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por apoptosis, ADCC, y CDC. La invención proporciona de este modo los primeros anticuerpos anti-CD38 capaces de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por tres mecanismos diferentes.

Anticuerpos capaces de unirse a CD38 y de provocar la muerte apoptótica de la célula en las células CD38<sup>+</sup> han sido descritos 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 que se ha demostrado una actividad apoptótica en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. El término "estroma" como se usa en esta memoria se refiere al tejido 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, incluyendo citocinas, que pueden influir en el comportamiento de las células cancerosas. El término "citocina", como se usa en esta memoria, se refiere a pequeñas proteínas segregadas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, y IL-6, IFNg, IL-3, IL-7 y GM-CSF) que median y regulan la inmunidad, inflamación, y hematopoyesis. Se muestra aquí que los anticuerpos de la técnica anterior eran incapaces de producir la destrucción apoptótica de la célula en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. Por contraste, los anticuerpos anti-CD38 de la invención presentan en las mismas condiciones potentes actividades apoptóticas.

En otro aspecto, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a la proteína CD38 con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o más baja.

El término "CD38" como se usa en esta memoria se refiere a una proteína transmembranal tipo II, que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como se indica en Genbank número de acceso NP\_001766. Una "célula CD38<sup>+</sup>" es una

célula que expresa la proteína CD38. Preferiblemente, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula de mamífero.

En una realización de esta invención, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula maligna. En otra realización, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula B. En una realización preferida, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula tumoral derivada de un tumor hematopoyético. En una realización más preferida, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula de linfoma, una célula de leucemia, o una célula de mieloma múltiple. En una realización adicional preferida, la célula CD38<sup>+</sup> es una célula NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, o CML.

Por tanto, en una realización, esta invención proporciona anticuerpos anti-CD38 capaces de destruir al menos el 24 % de las células Daudi de linfoma en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 7 % de las células Ramos de linfoma en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 11 % de las células MOLP-8 de mieloma múltiple en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 36 % de las células SU-DHL-8 de linfoma en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 27 % de las células NU-DUL-1 de linfoma en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 62 % de las células DND-41 de leucemia en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 9 % de las células JVM-13 de leucemia en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma. En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención son capaces de destruir al menos el 4 % de las células HC-1 de leucemia en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma.

## ANTICUERPOS

El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) de cualquier isotipo tales como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos, los anticuerpos quiméricos, y los fragmentos de anticuerpo. Un anticuerpo reactivo con un antígeno específico se puede generar mediante métodos recombinantes tales como selección de bancos de anticuerpos recombinantes en vectores fagos o similares, o mediante inmunización de un animal con el antígeno o un ácido nucleico que codifica el antígeno.

Un anticuerpo típico IgG comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR") o "regiones hipervariables", que son las principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Se denominan habitualmente CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N terminal. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables se denominan "regiones marco".

Como se usa en esta memoria, " $V_H$ " o "VH" se refiere a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' o F(ab')<sub>2</sub>. La referencia a " $V_L$ " o "VL" se refiere a la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena ligera de un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab', o F(ab')<sub>2</sub>.

Un "anticuerpo policlonal" es un anticuerpo que se ha producido entre o en presencia de uno o más anticuerpos diferentes, no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de otros muchos linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Habitualmente, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

Un "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que forman esta población son esencialmente idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades muy pequeñas. Estos anticuerpos están dirigidos frente a un único epítipo y son, por lo tanto, altamente específicos.

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, se puede formar el epítipo por residuos contiguos o por residuos no contiguos puestos en estrecha proximidad mediante plegamiento de un polímero antigénico. En las proteínas, los epítopos formados por aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por aminoácidos no contiguos típicamente se pierden bajo dicha exposición.

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

La presente invención procede de nuevos anticuerpos anti-CD38 murinos, aquí 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 que están completamente caracterizados con respecto a las secuencias de aminoácidos de cadenas tanto ligeras como pesadas, a la identificación de las CDR, a la identificación de aminoácidos de superficie, y a los medios para su expresión en la forma recombinante. El aminoácido

primario y las secuencias del DNA de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39, y de las versiones humanizadas, se describen aquí.

Las líneas de células de hibridoma que producen los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 murinos han sido depositadas en la American Type Culture Collection (10801 University Bld, Manassas, VA, 20110-2209, USA), el 21 de junio de 2006, con los números de depósito PTA-7667, PTA-7669, PTA-7670, PTA-7666, PTA-7668, y PTA-7671, respectivamente.

El alcance de la presente invención no está limitado a los anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En cambio, todos los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente a CD38 y son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis, ADCC, y/o CDC, están dentro del alcance de la presente invención. Así, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden diferir de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o de los derivados humanizados en las secuencias de aminoácidos de su armazón proteico (scaffold), en las CDR, en la cadena ligera y en la cadena pesada, y aún así están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización, esta invención proporciona anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen al epítipo que comprenden una o más CDR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las 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. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las 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 las SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35, y 36.

En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, y 6. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB13, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 4, 5, y 6.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR

que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11, y 12. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB18, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 10, 11, y 12.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, y 18. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB19, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 16, 17, y 18.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB30, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 19, 20, y 21, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 22, 23, y 24.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOS: 25, 26, 27, 28, 29, y 30. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB31, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 25, 26, y 27, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 28, 29, y 30.

En otra realización más preferida, los anticuerpos de la invención comprenden tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de 31, 32, 33, 34, 35, y 36. En una realización adicional más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB39, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que consisten en las SEQ ID NOS: 31, 32, y 33, y dicha cadena ligera comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos que

consisten en las SEQ ID NOS: 34, 35, y 36.

En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención comprenden una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:  $V_L$  para 38, 40, 42, 44, 46, y 48. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB13 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 38. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB18 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 40. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB19 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 42. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB30 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 44. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB31 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 46. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB39 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 48.

En otra realización preferida, los anticuerpos de la invención comprenden una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 50, 52, 54, 56, 58, y 60. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB13 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 50. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB18 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 52. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB19 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 54. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB30 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 56. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB31 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 58. En una realización más preferida, se proporciona un anticuerpo 38SB39 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 60.

#### **ANTICUERPOS QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 Y 38SB39**

Como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico", es un anticuerpo en el que la región constante, o una porción de ésta, está alterada, reemplazada, o intercambiada, de manera que la región variable está unida a una región constante de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. "Anticuerpo quimérico", se refiere también a un anticuerpo en el que la región variable,

o una porción de ésta, está alterada, reemplazada, o intercambiada, de manera que la región constante está unida a una región variable de una especie diferente, o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science*, **229**: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques*, 4: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods*, **125**: 191-202; Pat. de EEUU Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

En una realización de la invención, se proporcionan versiones quiméricas de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39. En particular, dichas versiones quiméricas contienen al menos una región constante humana. En una realización más preferida, esta región constante humana es la región constante IgG1/Kappa humana.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en esta memoria, se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. El objetivo de la humanización es una reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo murino, para su introducción en un ser humano, a la vez que mantiene intactas la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo frente al antígeno. Los anticuerpos humanizados, o anticuerpos adaptados para evitar el rechazo de otros mamíferos, se pueden producir utilizando varias tecnologías tales como la modificación en superficie y el injerto de CDR. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la tecnología de modificación en 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 del hospedante diana. La tecnología de injerto de CDR implica reemplazar las regiones determinantes de la complementariedad, por ejemplo, por las de un anticuerpo de ratón, en un dominio marco humano, por ejemplo, véase el documento W0 92/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados tienen preferiblemente las regiones constantes y regiones variables aparte de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) obtenidas sustancial o exclusivamente a partir de las correspondientes regiones del anticuerpo humano y las CDR obtenidas sustancial o exclusivamente a partir de un mamífero distinto de un ser humano.

Las estrategias y métodos para la modificación en superficie de los anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos en un hospedante diferente, están descritos en la Patente de EEUU 5.639.641, que se incorpora en la presente memoria en su totalidad como referencia. Brevemente, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posiciones de un agrupamiento de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos para dar lugar a un conjunto de posiciones expuestas a la superficie del marco de la región variable de cadena pesada y ligera, en el que las posiciones de alineamiento para todas las regiones variables son al menos aproximadamente idénticas en un 98 %; (2) se define un conjunto de residuos

de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (o fragmento de éste); (3) se identifica un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de cadena pesada y ligera que es el más idéntico al conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del roedor; (4) el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de cadena pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del marco de la región variable de cadena pesada y ligera definido en la etapa (3), excepto los residuos de aminoácidos que están en el intervalo de 5 Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando varias técnicas diferentes incluyendo injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de EEUU Nos. 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en 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 cambio de cadena (U.S. Pat. No. 5.565.332). Los anticuerpos humanos se pueden obtener por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo los métodos de exposición en fagos. Véanse también las Patentes de EEUU Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las Publicaciones de Solicitud 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 (dichas referencias se incorporan como referencia en su totalidad).

La presente invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos, que reconocen las CD38 y destruyen las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis, ADCC, y/o CDC. En otra realización, los anticuerpos humanizados o los fragmentos de estos que se unen al epítipo tienen la capacidad de destruir dichas células CD38<sup>+</sup> por los tres mecanismos. En otra realización adicional, los anticuerpos humanizados o los fragmentos de estos que se unen al epítipo de la invención son capaces de destruir dichas células CD38<sup>+</sup> por apoptosis incluso en ausencia de células del estroma o de citocinas derivadas del estroma.

Una realización preferida de dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39, o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo.

En realizaciones más preferidas, se proporcionan versiones modificadas en superficie o humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 en las que los residuos expuestos a la superficie del anticuerpo o sus

fragmentos están reemplazados tanto en las cadenas ligeras como en las pesadas por las superficies de anticuerpos humanos conocidos más parecidas. Los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o sus fragmentos que se unen al epítipo, de la presente invención, tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o sus fragmentos que se unen al epítipo reconocen específicamente la proteína CD38. Más preferiblemente, los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o sus fragmentos que se unen al epítipo tienen la capacidad adicional de destruir una célula CD38<sup>+</sup>, por apoptosis, ADCC, y/o CDC.

Las versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 están también aquí completamente caracterizadas en relación con sus respectivas secuencias de aminoácidos de las regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, las secuencias de DNA de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los anticuerpos y fragmentos que comprenden estas secuencias. En cambio, todos los anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente a CD38 y que son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis, ADCC, y/o CDC, están dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente, tales anticuerpos son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por los tres mecanismos. Así, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo que se unen al epítipo de la presente invención pueden diferir de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o de los derivados humanizados de los mismos, en las secuencias de aminoácidos de su armazón proteico (scaffold), en las CDR, en la cadena ligera y en la cadena pesada, y aún así están dentro del alcance de la presente invención.

Las CDR de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 se identifican por modelado y se han predicho sus estructuras moleculares. De nuevo, aunque las CDR son importantes para el reconocimiento del epítipo, no son esenciales para los anticuerpos y fragmentos de la invención. De acuerdo con esto, se proporcionan anticuerpos y fragmentos que tienen propiedades mejoradas producidos, por ejemplo, mediante maduración de la afinidad de un anticuerpo de la presente invención.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena 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 utilizar para producir versiones humanizadas de los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39. Estos anticuerpos humanizados anti-CD38 o sus derivados se pueden utilizar también como el agente de

unión a las células de la presente invención.

Por lo tanto, en una realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o sus fragmentos que se unen al epítipo que comprenden una o más CDR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las 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. En una realización preferida, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, y dicha cadena pesada comprende tres CDR secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las 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 las SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35, y 36. En una realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB13, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 4, 5, y 6. En otra realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB18, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 7, 8, y 9, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 10, 11, y 12. En otra realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB19, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 13, 14, y 15, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 16, 17, y 18. En otra realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB30, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 19, 20, y 21, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que

tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 22, 23, y 24. En otra realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB31, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 25, 26, y 27, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 28, 29, y 30. En otra realización adicional preferida, se proporciona una versión humanizada de 38SB39, que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, en la que dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 31, 32, y 33, y en la que dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 34, 35, y 36.

En una realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que comprenden una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NOS: 66 y 72. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 38SB19 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 38SB31 que comprende una  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 72.

En otra realización, esta invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que comprenden una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NOS: 62, 64, 68, y 70. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 38SB19 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo de las SEQ ID NOS: 62 y 64. En otra realización preferida, se proporciona un anticuerpo humanizado 38SB31 que comprende una  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo de las SEQ ID NOS: 68 y 70.

Los anticuerpos humanizados 38SB19 y los fragmentos de estos que se unen al epítipo de la presente invención pueden incluir también sustituciones en los residuos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada en una o más posiciones definidas por los residuos sombreados en la Tabla 1A y 1B que representan los residuos del marco de superficie murino que han sido cambiados 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 cadena pesada de 38SB19 (SEQ ID NO:65). Los residuos para retromutaciones están próximos a las CDR y se eligieron como se

describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.639,641 o en analogía a la selección de residuos que en esfuerzos previos de humanización habían dado como resultado una disminución de la afinidad de unión al antígeno (Roguska *et al.*, 1996, Publicaciones de Solicitudes de Patentes de Estados Unidos 2003/0235582 y 2005/0118183).

Asimismo, los anticuerpos humanizados 38SB13, 38SB18, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 y los fragmentos de estos que se unen al epítipo de la presente invención pueden incluir también la sustitución en los residuos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada.

### **POLINUCLEÓTIDOS, VECTORES Y CÉLULAS HOSPEDANTES**

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

En otro aspecto de esta invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las 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. En una realización preferida, el polinucleótido de la invención se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, y 71. La invención no está limitada a dichos polinucleótidos per se sino que incluye también todos los polinucleótidos que presentan al menos un 80 % de identidad con dichos polinucleótidos.

La invención proporciona 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 proporciona también vectores que comprenden moléculas de polinucleótido que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos, y sondas de éstos.

Con el fin de expresar la cadena pesada y/o la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD38 de la invención, los polinucleótidos que codifican dichas cadenas pesadas y/o ligeras se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están unidos de manera operativa a 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 sabrá que son convenientes para asegurar

la expresión de dichas cadenas pesadas y/o ligeras. El experto en la técnica se dará cuenta de que los polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden clonarse en diferentes vectores o en el mismo vector. En una realización preferida, dichos polinucleótidos se clonan en el mismo vector.

Los polinucleótidos de la invención y los vectores que comprenden estas moléculas se pueden usar para la transformación de una célula hospedante adecuada de un mamífero. La transformación se puede realizar mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Dichos métodos son muy conocidos para el experto en la técnica e incluyen transformación mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido en liposomas, inyección biolística y microinyección directa de DNA en núcleos.

### **FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS**

Los anticuerpos de la presente invención incluyen tanto los anticuerpos de longitud completa discutidos anteriormente, como los fragmentos de los mismos que se unen al epítipo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "fragmentos de anticuerpo" incluyen cualquier porción de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud completa, denominados de manera general "fragmentos que se unen al epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fv unidos por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden una región VL o VH. Los fragmentos que se unen al epítipo, incluyendo los anticuerpos de cadena única, pueden comprender las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDR del anticuerpo completo, aunque también son funcionales los fragmentos que contienen menos de todas estas regiones tal como tres, cuatro o cinco CDR. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar miembros de una cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de éstas.

Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> se pueden producir mediante escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>).

Los fragmentos "FV de cadena única" ("scFv") son fragmentos que se unen al epítipo que contienen al menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de un

anticuerpo ( $V_H$ ) unida al menos a un fragmento de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo ( $V_L$ ). El conector puede ser un péptido corto, flexible seleccionado para asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de las regiones  $V_L$  y  $V_H$  una vez que se han unido con el fin de mantener la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo completo del que se obtiene el fragmento del anticuerpo de cadena única. El carboxilo terminal de la secuencia  $V_L$  o  $V_H$  se puede unir covalentemente mediante un conector al aminoácido terminal de una secuencia complementaria  $V_L$  o  $V_H$ .

Los fragmentos de anticuerpos de cadena única de la presente invención contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos completos descritos en esta memoria descriptiva, pero carecen de algunos o de 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 anticuerpos de cadena única pueden, por lo tanto, solucionar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte de un dominio constante o todo el dominio. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos de cadena única normalmente están libres de interacciones no deseadas entre las moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica no deseada. Además, los fragmentos de anticuerpos de cadena única son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener, por lo tanto, mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, lo que permite que los fragmentos de anticuerpos de cadena única se localicen y se unan a sitios diana de unión de antígenos más eficazmente. Además, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir en una escala relativamente grande en células procariotas, facilitando así su producción. Es más, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena única hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmune en un receptor que los anticuerpos completos.

Los fragmentos de anticuerpos de cadena única se pueden generar mediante clonación molecular, banco de exposición de anticuerpos en fagos o técnicas similares muy conocidos por el experto en la técnica. Estas proteínas se pueden producir, por ejemplo, en células eucariotas o células procariotas, incluyendo bacterias. Los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención también se pueden generar utilizando diferentes métodos de exposición en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de exposición en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se exponen en la superficie de las partículas del fago que contienen las secuencias de polinucleótido que los codifican. En particular, dicho fago se puede utilizar para exponer dominios de unión al epítipo expresados de un repertorio o de un banco combinado de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de

unión al epítipo que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno usando, por ejemplo, un antígeno marcado unido o capturado en una superficie sólida o en una perla. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con los dominios del anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados por recombinación con la proteína del fago del gen III o gen VIII.

Los ejemplos de métodos de exposición en fagos que se pueden utilizar para obtener los fragmentos que se unen al epítipo de la presente invención incluyen los 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; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat. de EEUU Nos. 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; cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Después de la selección del fago, las regiones del fago que codifican los fragmentos se pueden aislar y utilizar para generar los fragmentos que se unen al epítipo mediante expresión en un hospedante elegido, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, levaduras, y bacterias, utilizando tecnología de DNA recombinante, por ejemplo, como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la Publicación 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; incorporándose dichas referencias como referencia en su totalidad. Los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir Fv y anticuerpos de cadena única incluyen los descritos en las Pat. de EEUU Nos. 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.

#### **EQUIVALENTES FUNCIONALES**

En el alcance de la invención están incluidos también los equivalentes funcionales del anticuerpo anti-Cd38 y el anticuerpo humanizado anti-receptor CD38. El término "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en los que cada equivalente funcional está definido por su capacidad para unirse a la proteína CD38. El experto en la técnica entenderá que existe una superposición en el grupo de moléculas denominado "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado

“equivalentes funcionales.” Los métodos para producir equivalentes funcionales son conocidos por los expertos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en los documentos WO 93/21319, EP 239.400; WO 89/09622; EP 338.745; y EP 332,424, que se incorporan como referencia en sus totalidades respectivas.

Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD38 y un anticuerpo humanizado anti-CD38 de la presente invención. Preferiblemente, la homología existe con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo anti-CD38 y del anticuerpo humanizado anti-CD38 de la presente invención. “Homología de secuencia” tal como se aplica a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria se define como una secuencia con al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, ó 94 % de homología de secuencia, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ó 99 % de homología de secuencia con otra secuencia de aminoácidos, determinada, por ejemplo, mediante el método de búsqueda FASTA según Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 2444-2448.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, fragmentos bivalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes y mru (véanse las revisiones por Winter, G. and Milstein, C., 1991, *Nature*, **349**: 293-299; Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, **11**: 548-557), cada uno de los cuales tiene capacidad para unirse al antígeno. En el fragmento de cadena única Fv (scFv), los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo están conectados mediante un péptido flexible. Típicamente, este péptido conector tiene una longitud de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos. Si el conector es mucho más pequeño, por ejemplo 5 aminoácidos, se forman fragmentos divalentes, que son dímeros divalentes scFv. Si el conector se reduce a menos de tres residuos de aminoácidos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se denominan fragmentos trivalentes y tetravalentes. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, típicamente la CDR2 de la cadena pesada que tiene un reconocimiento y unión específicas suficientes como para poder utilizarse de manera independiente. Dicho fragmento se denomina unidad de reconocimiento molecular o mru. Varios de estos mru se pueden unir con péptidos conectores cortos, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con una mayor avidéz que un único mru.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud incluyen también anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. La unión covalente no impide al anticuerpo generar una respuesta

anti-idiotípica. Estas modificaciones se pueden realizar mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los equivalentes funcionales se pueden producir intercambiando diferentes CDR en diferentes cadenas dentro de diferentes marcos. Así, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para un conjunto de CDR dado mediante sustitución de diferentes cadenas pesadas, con lo que, por ejemplo, se pueden producir tipos e isotipos de anticuerpos IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, e IgE. De manera similar, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención se pueden producir incluyendo un conjunto de CDR dado en un marco completamente sintético.

Los equivalentes funcionales se pueden producir mediante mutación, delección y/o inserción dentro de las secuencias de la región variable y/o constante que flanquean un conjunto particular de CDRs, utilizando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo y los equivalentes funcionales de la presente invención engloban aquellas moléculas con un nivel detectable de unión a CD38, cuando se comparan con el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39. Un nivel detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10-100 %, preferiblemente al menos 50 %, 60 % o 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de la capacidad de unión del anticuerpo murino 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39, a CD38.

#### **ANTICUERPOS MEJORADOS**

Las CDR son muy importantes para el reconocimiento del epítipo y la unión del anticuerpo. Sin embargo, se pueden realizar cambios en los residuos que comprenden las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo de reconocer y unirse a su epítipo correspondiente. Por ejemplo, se pueden realizar cambios que no afectan al reconocimiento del epítipo, pero que incrementan la capacidad de unión del anticuerpo al epítipo.

Así, también están incluidas en el alcance de la presente invención versiones mejoradas tanto de los anticuerpos murinos como de los anticuerpos humanizados, que también reconocen y se unen específicamente a CD38, preferiblemente con una afinidad incrementada.

Varios estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diferentes posiciones en la secuencia de un anticuerpo, tomando como base el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primario, sus propiedades tales como la unión y el nivel de expresión (Yang, W. P. *et al.*, 1995, *J. Mol. Biol.*, **254**: 392-403; Rader, C. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 8910-8915; Vaughan, T. J.

*et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539).

En estos estudios, se han generado equivalentes del anticuerpo primario cambiando las secuencias de los genes de la cadena pesada y ligera en las CDR1, CDR2, CDR3, o regiones del marco, utilizando métodos tales como mutagénesis dirigida a un sitio mediada por oligonucleótidos, mutagénesis en casete, PCR propenso a error, transposición de secuencias de DNA, o cepas mutantes de *E. coli* (Vaughan, T. J. *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539; Adey, N. B. *et al.*, 1996, Capítulo 16, p. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. *et al.*, Academic Press). Estos métodos para cambiar la secuencia del anticuerpo primario han dado como resultado afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 3576-3580; Boder, E. T. *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, **2**: 169-179; Thompson, J. *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, **256**: 77-88; Short, M. K. *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, **277**: 16365-16370; Furukawa, K. *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 27622-27628).

Mediante una estrategia similar dirigida de cambio de uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo, las secuencias del anticuerpo descritas en esta invención se pueden usar para desarrollar anticuerpos anti-CD38 con funciones mejoradas, incluyendo una mejor afinidad para CD38.

Las sustituciones preferidas de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisico-químicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diferentes muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio que forma los contactos intermoleculares). Una sustitución conservadora de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazamiento no debe romper una hélice que está presente en la secuencia parental, o romper otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan a la secuencia parental). Los ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica están descritos en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); y Thornton *et al.*, 1991, *Nature*, **354**: 105, que se incorpora cada una en la presente memoria como referencia.

Los anticuerpos mejorados incluyen también aquellos anticuerpos que tienen

características mejoradas que se preparan mediante técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

Los anticuerpos mejorados según la invención incluyen en particular anticuerpos con mejores propiedades funcionales. Son de especial interés aquellos anticuerpos con mejor capacidad para mediar en las funciones efectoras citotóxicas celulares tal como la ADCC. Se pueden obtener dichos anticuerpos haciendo sustituciones simples o múltiples en el marco constante del anticuerpo, alterando de este modo su interacción con los receptores Fc. Los métodos para diseñar tales mutantes se pueden encontrar por ejemplo en Lazar *et al.* (2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(11): 4005-4010) y Okazaki *et al.* (2004, *J. Mol. Biol.* **336**(5):1239-49). Véanse también los documentos WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447, WO 2006/105338, WO 2007/041635. Es posible también usar líneas celulares preparadas específicamente por ingeniería genética para la producción de anticuerpos mejorados. En particular, estas líneas tienen alterada la regulación de la ruta de glicosilación, dando como resultado anticuerpos que están débilmente fucosilados o incluso totalmente defucosilados. Tales líneas celulares y los métodos para transformarlas por ingeniería genética están descritos, por ejemplo, en Shinkawa *et al.* (2003, *J. Biol. Chem.* **278**(5): 3466-3473), Ferrara *et al.* (2006, *J. Biol. Chem.* **281**(8): 5032-5036; 2006, *Biotechnol. Bioeng.* **93**(5): 851-61), EP 1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987, y WO 99/54342.

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

Como se usa en esta memoria, el término "agente de unión a las células" se refiere a un agente que reconoce y se une específicamente con las proteínas CD38 en la superficie de la célula. En una realización, el agente de unión a las células reconoce específicamente a CD38 de modo que permite a los conjugados actuar de una manera dirigida con pocos efectos secundarios que resultan de la unión no específica.

En otra realización, el agente de unión a las células de la presente invención también reconoce específicamente la proteína CD38 de manera que los conjugados estarán en contacto con la célula diana durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir que la porción del fármaco citotóxico del conjugado actúe en la célula, y/o para proporcionar a los conjugados un tiempo suficiente como para ser internalizados por la célula.

En una realización preferida, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo anti-CD38 como el agente de unión a las células, más preferiblemente el anticuerpo monoclonal murino anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39.

En otra realización preferida, el agente de unión a las células es una versión quimérica de dicho anticuerpo anti-CD38. En una realización más preferida, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo humanizado 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo. El anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 es capaz de reconocer específicamente la CD38, y dirige el agente citotóxico hacia una célula o un tejido anormal, tal como las células cancerosas, en una forma señalada.

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

En las realizaciones preferidas, el agente citotóxico es un fármaco pequeño, un profármaco, un taxoide, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un derivado de tomamicina, un derivado de leptomicina, CC-1065 o un análogo de CC-1065. En las realizaciones preferidas, los agentes de unión a las células de la presente invención están unidos covalentemente, directamente o a través de un conector escindible o no escindible, al agente citotóxico.

Los agentes de unión a las células, agentes citotóxicos, y conectores se discuten con más detalle a continuación.

#### **AGENTES DE UNIÓN A LAS CÉLULAS**

La eficacia de los compuestos de la presente invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente apropiado de unión a las células. Los agentes de unión a las células pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que llegue a conocerse, e incluyen péptidos y no péptidos. El agente de unión a las células puede ser cualquier compuesto que se pueda unir a una célula, de manera específica o no específica. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia que se une a las células.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a las células que se pueden usar incluyen:

- a) anticuerpos policlonales;
- b) anticuerpos monoclonales;
- c) fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')<sub>2</sub>, 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 utilizar como un agente de

unión a las células según la presente invención. Asimismo, dicho agente de unión a las células puede ser una versión quimérica de uno de los anticuerpos monoclonales 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39. Preferiblemente, se utiliza un anticuerpo humanizado anti-CD38 como el agente de unión a las células de la presente invención. Más preferiblemente el anticuerpo humanizado anti-CD38 se selecciona de los anticuerpos humanizados o con la superficie modificada 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39.

### **AGENTES CITOTÓXICOS**

En otra realización, el anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos que se unen al epítipo se puede conjugar con un fármaco, tal como un maitansinoide, para formar un profármaco que tiene una citotoxicidad específica frente a las células que expresan el antígeno dirigiendo el fármaco hacia la proteína CD38. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un pequeño fármaco, altamente tóxico (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, derivados de tomamicina, derivados de leptomicina, y análogos de CC-1065) se pueden utilizar como un producto 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 cualquier compuesto que da como resultado la muerte celular, o induce la muerte celular, o de alguna manera 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 dolastatina, definidos más adelante. Estos agentes citotóxicos se conjugan con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos como se describe en la presente memoria.

Los conjugados citotóxicos se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Con el fin de enlazar un fármaco o profármaco con el anticuerpo, se utiliza un grupo conector. En la técnica son bien conocidos los grupos conectores adecuados e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido-lábiles, grupos foto-lábiles, grupos peptidasa-lábiles y grupos esterasa-lábiles. Los grupos conectores preferidos son los grupos disulfuro y los grupos tioéter. Por ejemplo, se pueden construir conjugados utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o el profármaco.

### **MAITANSINOIDES**

Entre los agentes citotóxicos que se pueden utilizar en la presente invención para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y los 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 que son altamente tóxicos para las células de los mamíferos.

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 están descritos en las Patentes de EEUU Nos. 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.

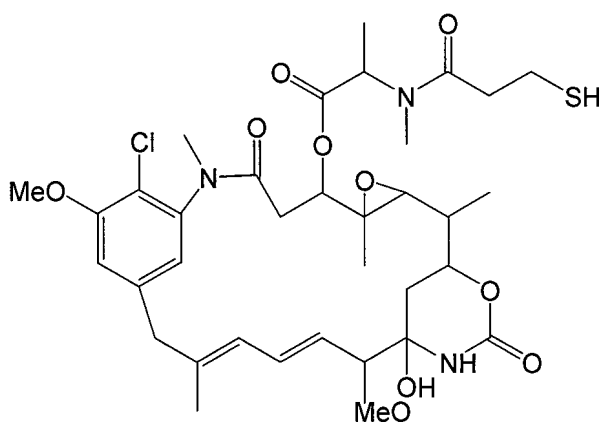
Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

- (1) C-19-descloro (Pat. de EEUU No. 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);
- (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-descloro (Pat. de EEUU Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración utilizando LAH); y
- (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Pat. de EEUU No 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

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

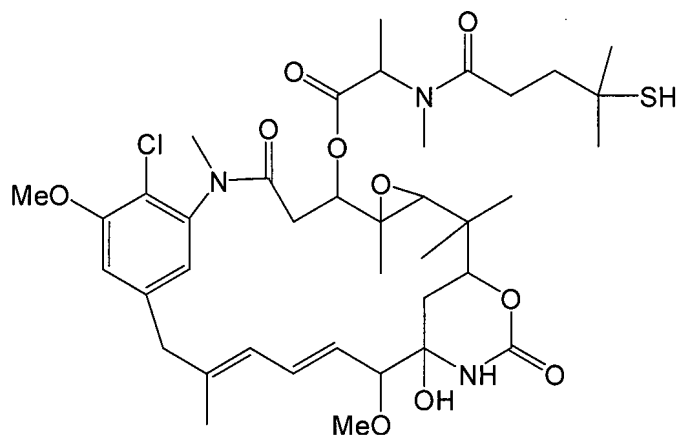
- (1) C-9-SH (Pat. de EEUU No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);
- (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (Pat. de EEUU No. 4.331.598);
- (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (Pat. de EEUU No. 4.450.254) (preparado de *Nocardia*);
- (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Pat. de EEUU No. 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);
- (5) C-15-metoxi (Pat. de EEUU Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);
- (6) C-18-N-desmetil (Pat. de EEUU Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y
- (7) 4,5-desoxi (Pat. de EEUU No 4.371.533) (preparado mediante la reducción de maitansinol por tricloruro de titanio/LAH).

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



(I)

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

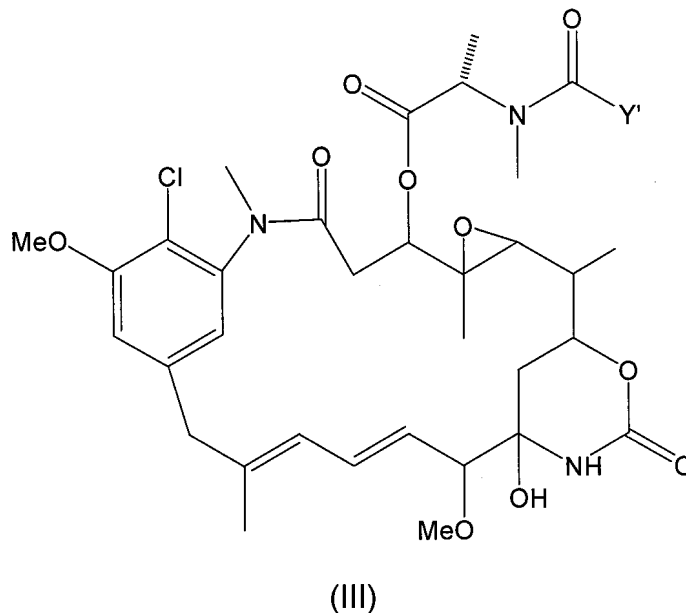


(II)

En realizaciones adicionales de la invención, se pueden utilizar otras maitansinas, incluyendo maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que presentan una sustitución con mono- o di-alquilo en el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre. Éstos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14-hidroximetil, C-15-hidroxi, o C-20-desmetil, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que presenta un grupo sulfhidrilo con impedimento estérico, en el que el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo estos sustituyentes  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además en el que uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la

funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

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



en la que:  
Y' representa

$(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2$   
SZ,

en la que:

$\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  son cada uno independientemente  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además  $\text{R}_2$  puede ser H;

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

$\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{R}_7$ ,  $\text{R}_8$ ,  $\text{R}_9$ ,  $\text{R}_{11}$ , y  $\text{R}_{12}$  son cada uno independientemente H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y.

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

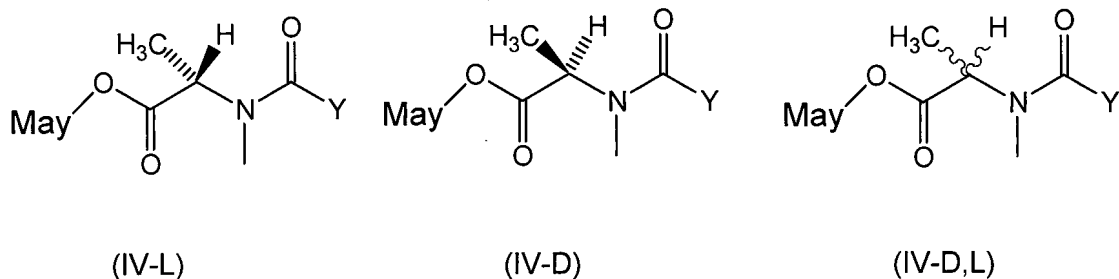
Las realizaciones preferidas de la fórmula (III) incluyen los compuestos de la fórmula (III) en la que:

$\text{R}_1$  es H,  $\text{R}_2$  es metilo y Z es H.  
 $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  son metilo y Z es H.

$R_1$  es H,  $R_2$  es metilo, y Z es  $-\text{SCH}_3$ .

$R_1$  y  $R_2$  son metilo, y Z es  $-\text{SCH}_3$ .

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



en las que:

Y representa  $(\text{CR}_7\text{R}_8)_l(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$ ,  
en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 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 independientemente H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o  $-\text{COR}$ , donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que presenta la cadena lateral en C-3, C-14-hidroxiometil, C-15-hidroxi o C-20-desmetil.

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

$R_1$  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.

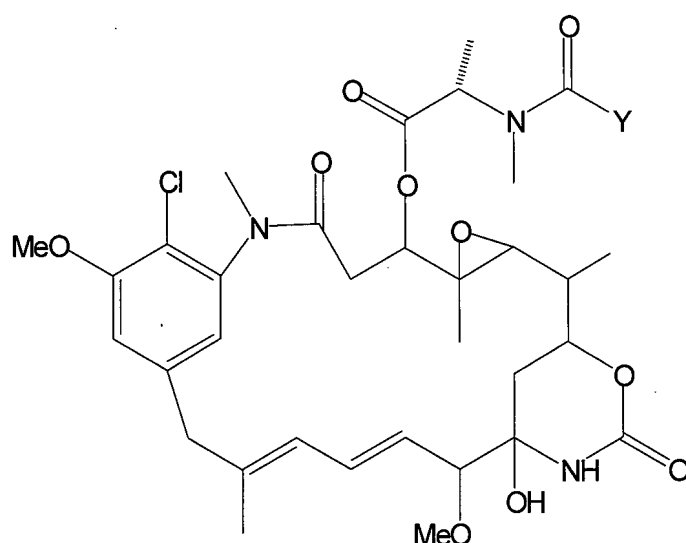
$R_1$  y  $R_2$  son metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$  son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

$R_1$  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  $-\text{SCH}_3$ .

$R_1$  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  $-\text{SCH}_3$ .

Preferiblemente el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

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



(V)

en la que:

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

en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 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 independientemente H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

$l$ ,  $m$  y  $n$  son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además  $n$  puede ser 0; y

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

Las realizaciones preferidas de la fórmula (V) incluyen los compuestos de la fórmula (V)

en la que:

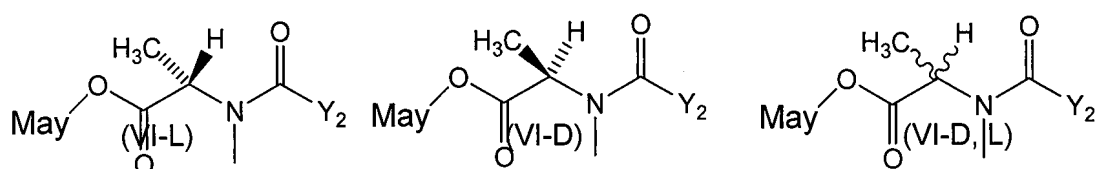
$R_1$  es H,  $R_2$  es metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son cada uno H;  $l$  y  $m$  son cada uno 1;  $n$  es 0; y  $Z$  es H.

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

$R_1$  es H,  $R_2$  es metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son cada uno H,  $l$  y  $m$  son cada uno 1,  $n$  es 0, y  $Z$  es  $-SCH_3$ .

$R_1$  y  $R_2$  son metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son cada uno H,  $l$  y  $m$  son 1,  $n$  es 0, y  $Z$  es  $-SCH_3$ .

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



en las que:

$Y_2$  representa  $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ,

en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además  $R_2$  puede ser H;

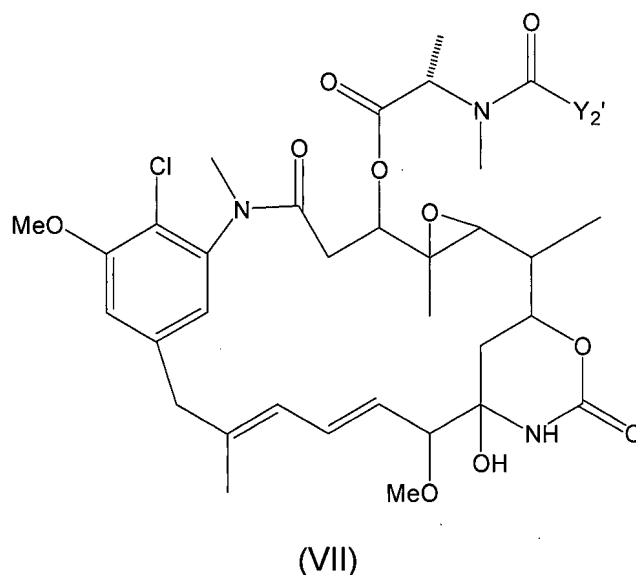
$R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  son cada uno independientemente H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

$l$ ,  $m$  y  $n$  son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además  $n$  puede ser 0;

$Z_2$  es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide.

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



en la que:

$Y_2'$  representa

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

en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además  $R_2$  puede ser H;

A, B y D son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

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

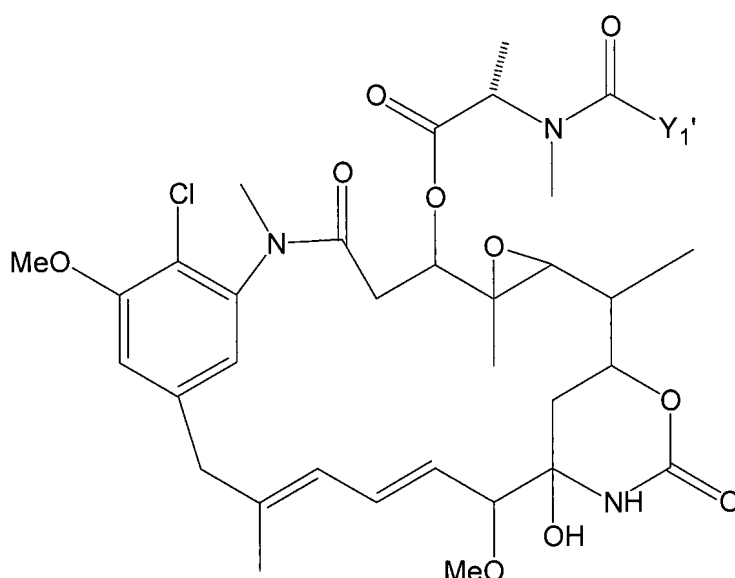
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

$Z_2$  es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Las realizaciones preferidas de la fórmula (VII) incluyen los compuestos de la fórmula (VII) en la que:  $R_1$  es H y  $R_2$  es metilo.

Los maitansinoides mencionados anteriormente se pueden conjugar con un anticuerpo anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 o un homólogo o fragmento de éste, en el que el anticuerpo se enlaza con el maitansinoide utilizando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilado que se encuentra en C-3, C-14-hidroximetil, C-15-hidroxi o C-20-desmetil del maitansinoide, y en el que el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilado tiene su funcionalidad tiol o disulfuro localizada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en el que el grupo acilo tiene una cadena lineal con una longitud de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Un conjugado preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de la fórmula (VIII):



(VIII)

en la que:

$Y_1'$  representa

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

en la que:

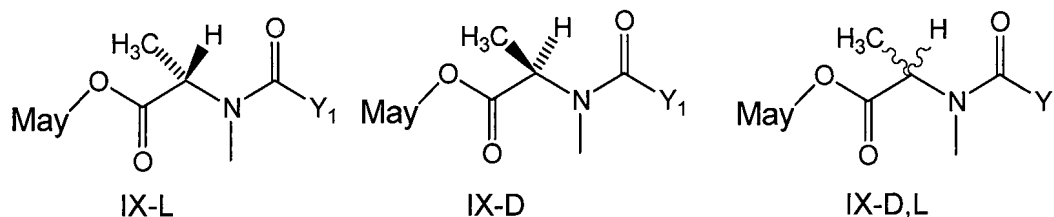
A, B y D, son cada uno independientemente cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

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

$l, m, n, o, p, q, r, s,$  y  $t$  son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de  $l, m, n, o, p, q, r, s$  y  $t$  no son cero en ningún momento.

Preferiblemente,  $R_1$  es H y  $R_2$  es metilo o  $R_1$  y  $R_2$  son metilo.

Un conjugado aún más preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de la fórmula (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):



en las que:

$Y_1$  representa  $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$

en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, 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 independientemente H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

$l$ ,  $m$  y  $n$  son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además  $n$  puede ser 0; y

May representa un maitansinol que lleva la cadena lateral en C-3, C-14-hidroxiometil, C-15-hidroxi o C-20-desmetil.

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

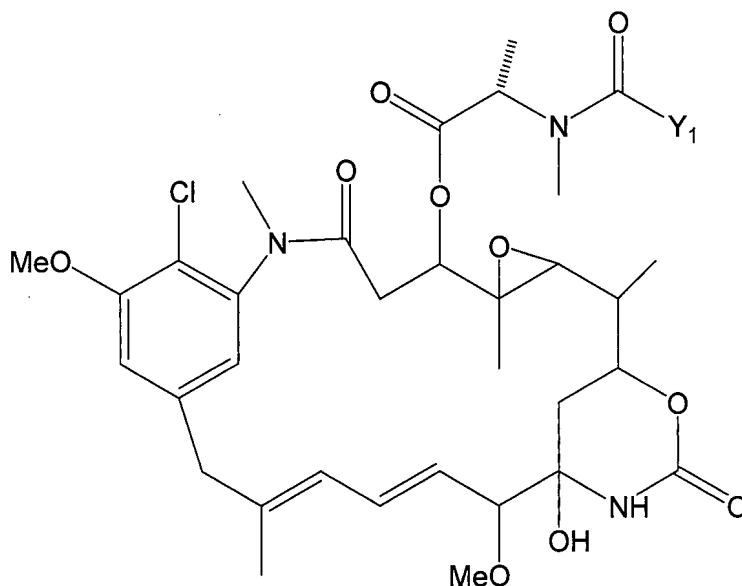
$R_1$  es H y  $R_2$  es metilo o  $R_1$  y  $R_2$  son metilo,

$R_1$  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,

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

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

Otro conjugado preferido de la presente invención es aquel que comprende el anticuerpo anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 o un homólogo o fragmento de éste, conjugado con un maitansinoide de la fórmula (X):



(X)

en la que los sustituyentes son como se han definido para la fórmula (IX) anterior.

Especialmente preferidos son cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, en los que  $R_1$  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, y  $n$  es 0.

Además son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, en los que  $R_1$  y  $R_2$  son metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  son cada uno H, I y m son 1, y n es 0.

Además, se prefiere el estereoisómero L-aminoácido.

Cada uno de los maitansinoides mostrados en la Solicitud de Patente de EEUU en tramitación número 10/849.136, presentada el 20 de mayo de 2004, se pueden utilizar también en el conjugado citotóxico de la presente invención. La descripción completa de la Solicitud de Patente de EEUU número 10/849.136 se incorpora en la presente memoria como referencia.

### **GRUPOS CONECTORES QUE CONTIENEN DISULFURO**

Con el fin de enlazar el maitansinoide con el agente de unión a las células, tal como el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39, el maitansinoide comprende un resto conector. El resto conector contiene un enlace químico que permite la liberación de los maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces ácido-lábiles, enlaces foto-lábiles, enlaces peptidasa-lábiles y enlaces esterasa-lábiles. Se prefieren los enlaces disulfuro.

El resto conector comprende también un grupo químico reactivo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo puede estar unido covalentemente al maitansinoide a través de un resto conector con enlace disulfuro.

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

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto conector que contiene un grupo químico reactivo son ésteres en C-3 de maitansinol y sus análogos en los que el resto conector contiene un enlace disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un N-succinimidil- o N-sulfosuccinimidil-éster.

Muchas posiciones de los maitansinoides pueden servir como la posición para unir químicamente el resto conector. Por ejemplo, es de esperar que sean útiles la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetil, la posición C-15 modificada con hidroxil y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxil. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida.

Aunque la síntesis de ésteres de maitansinol que tienen un resto conector se describe en términos de restos conectores con enlace disulfuro, un experto en la técnica entenderá que los restos conectores con otros enlaces químicos (como se ha descrito anteriormente) se pueden utilizar también con la presente invención, así como otros

maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces ácido-lábiles, enlaces foto-lábiles, enlaces peptidasa-lábiles y enlaces esterasa-lábiles. La descripción de la Patente de EEUU No. 5.208.020, incorporada en la presente memoria, muestra la producción de maitansinoides que presentan dichos enlaces.

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que presenta un grupo reactivo está descrita en las Patentes de EEUU Nos. 6.441.163 y 6.333.410, y en la Solicitud de EEUU No. 10/161.651, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia.

Los maitansinoides que contienen el grupo reactivo, tal como DM1, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39, para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados se pueden purificar mediante HPLC o mediante filtración en gel.

Numerosos esquemas excelentes para producir dichos conjugados anticuerpo-maitansinoide se proporcionan en la Patente de EEUU No. 6.333.410, y en las Solicitudes de EEUU Nos. 09/867.598, 10/161.651 y 10/024.290, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

En general, una solución de un anticuerpo en tampón acuoso se puede incubar con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que presenta un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede inactivar mediante la adición de amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado maitansinoide-anticuerpo se puede purificar entonces mediante filtración en gel.

El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo espectrofotométricamente la proporción de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere una media de 1-10 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo.

Los conjugados de los anticuerpos con fármacos maitansinoides se pueden evaluar en cuanto a su capacidad de deprimir la proliferación de varias líneas celulares no deseadas *in vitro*. Por ejemplo, se pueden utilizar fácilmente líneas de células tales como la línea de células Daudi del linfoma humano, la línea de células Ramos del linfoma humano, la línea de células MOLP-8 del mieloma múltiple humano, y la línea MOLT-4 de la leucemia linfocítica aguda T humana, para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células a ser evaluadas se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y las fracciones de células supervivientes se pueden medir en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de IC50 se pueden calcular después a partir de los resultados de los ensayos.

#### **GRUPOS CONECTORES QUE CONTIENEN PEG**

Los maitansinoides se pueden enlazar también con los agentes de unión a las células

utilizando grupos conectores PEG, como se expone en la Solicitud de EEUU No. 10/024.290. Estos grupos conectores PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y se pueden utilizar para enlazar uno o más agentes citotóxicos con un agente de unión a las células. Los ejemplos de grupos conectores PEG incluyen los conectores PEG hetero-bifuncionales que se unen a los agentes citotóxicos y a los agentes de unión a las células en extremos opuestos de los conectores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo, y un éster activo en el otro extremo.

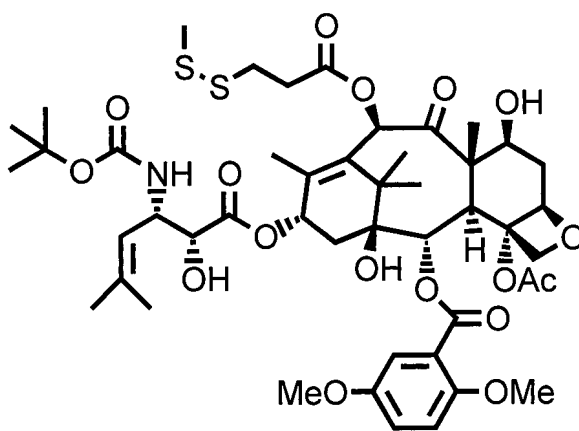
Como ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico utilizando un grupo conector PEG, se hace referencia de nuevo a la Solicitud de EEUU No. 10/024.290 para detalles específicos. La síntesis empieza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo con un agente de unión a las células, lo que da como resultado el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto PEG reactivo por un residuo de aminoácido del agente de unión a las células, para dar un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a las células a través de un grupo conector PEG.

## **TAXANOS**

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos según la presente invención puede ser también un taxano o un derivado de éste.

Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (taxol), un producto citotóxico natural, y docetaxel (Taxotere), un derivado semi-sintético, dos compuestos que se utilizan ampliamente en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son tóxicos para el huso mitótico que inhiben la despolimerización de la tubulina, lo que da como resultado la muerte celular. Aunque el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica frente a las células normales. Además, los compuestos como el paclitaxel y el docetaxel por sí mismos no son suficientemente potentes para ser usados en conjugados con agentes de unión a las células.

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



(XI)

Los métodos para sintetizar taxanos que se pueden usar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los taxanos con los agentes de unión a las células tales como anticuerpos, están descritos en detalle en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, y en las Solicitudes de Estados Unidos Nos. 10/024.290, 10/144.042, 10/207.814, 10/210.112 y 10/369.563.

#### DERIVADOS DE TOMAIMICINA

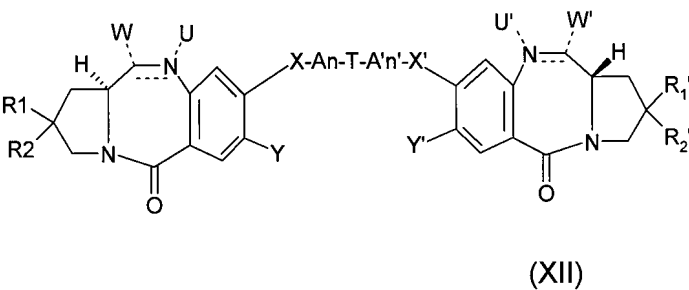
El agente citotóxico según la presente invención puede ser también un derivado de tomaimicina. Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas mediante la unión covalente al N2 de la guanina en el surco menor del DNA. Las PBD incluyen una serie de compuestos de unión con el surco menor tales como antramycin, neotramycin y DC-81.

Nuevos derivados de tomaimicina que retienen una alta citotoxicidad y que se pueden enlazar de forma efectiva con los agentes de unión a las células están descritos en la Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000142, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria como referencia. Los complejos del agente de unión a las células y el derivado de tomaimicina permiten la medida completa de la acción citotóxica de los derivados de tomaimicina que se aplican en una forma dirigida solamente frente a las células no deseadas, evitando por tanto los efectos secundarios debidos al daño producido a las células sanas que no son objetivo.

El agente citotóxico según la presente invención comprende uno o más derivados de tomaimicina, enlazados con un agente de unión a las células, tal como el anticuerpo

38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39, mediante un grupo conector. El grupo conector es parte de un resto químico que se une covalentemente a un derivado de tomaimicina a través de métodos convencionales. En una realización preferida, el resto químico puede estar unido covalentemente al derivado de tomaimicina mediante un enlace disulfuro.

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



en la que

---- representa un enlace sencillo opcional;

----

representa un enlace sencillo o un enlace doble;

----

con la condición de que cuando ---- representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, independientemente representan H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo, un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, de tal manera que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico, de tal manera 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 una amina cíclica de tal manera 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 trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácidos; Preferiblemente W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH<sub>2</sub>, SMe;

y cuando

----

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

- R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre haluro o alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, OR, arilo, Het, S(O)<sub>q</sub>R, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un enlace doble que contiene el grupo =B y =B' respectivamente.

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

- B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alqueno que está opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, OR, arilo, Het, S(O)<sub>q</sub>R o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= =CH<sub>2</sub> o =CH-CH<sub>3</sub>.

- X, X' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre uno o más -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)<sub>q</sub>-.

Preferiblemente, X=X'.

Más preferiblemente, X=X'=O.

- A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alquilo o alqueno que opcionalmente contienen un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre, estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, OR, S(O)<sub>q</sub>R, arilo, Het, alquilo, alqueno.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'= alquilo lineal no sustituido.

- Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

Preferiblemente, Y=Y'.

Más preferiblemente, Y=Y'=Oalquilo, más preferiblemente Ometilo.

- T es -NR-, -O-, -S(O)<sub>q</sub>-, o un arilo de 4 a 10 miembros, cicloalquilo, radical heterocíclico o heteroarilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, R, OR, S(O)<sub>q</sub>R, y/o un conector o conectores, o un alquilo ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, OR, S(O)<sub>q</sub>R y/o un conector o conectores, o un alquilo lineal sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, OR, S(O)<sub>q</sub>R y/o un conector o conectores.

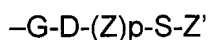
Preferiblemente, T es un arilo o heteroarilo de 4 a 10-miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo, opcionalmente sustituido con uno o más conectores.

Dicho conector comprende un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados son

bien conocidos en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido-lábiles, grupos foto-lábiles, grupos peptidasa-lábiles y grupos esterasa-lábiles. Los grupos preferidos son los grupos disulfuro y tioéter.

Cuando el grupo conector es un grupo que contiene tiol-, sulfuro (o el llamado tioéter –S-) o disulfuro (-S-S-), la cadena lateral que lleva el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas.

Preferiblemente, dicho conector tiene la fórmula:



donde

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

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-;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre  
 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>alquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -alquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-alquil-, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-,  
 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>cicloalquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>heterocíclico(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-,  
 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>aril(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>heteroaril(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -alquil-  
 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>alquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -alquil-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-, -alquil-  
 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>cicloalquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -alquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>heterocíclico(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-,  
 alquil-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>aril(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, -alquil(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>heteroaril(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-,  
 cicloalquil-alquil-, -alquil-cicloalquil-, -heterocíclico-alquil-, -alquil-heterocíclico-,  
 alquil-aril-, -aril-alquil-, -alquil-heteroaril-, -heteroaril-alquil-, lineales o ramificados;

donde i y j, idénticos o diferentes son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -alquil- lineal o ramificado;

p es 0 o 1;

Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R<sub>20</sub> o SR<sub>20</sub>, donde R<sub>20</sub> representa H, metilo, alquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o radical heterocíclico, con la condición de que cuando Z' es H, dicho compuesto está en equilibrio con el correspondiente compuesto formado por ciclación intramolecular que resulta de la adición del grupo tiol -SH sobre el enlace imina -NH= de uno de los restos PBD.

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

▪ q es 0, 1 o 2.

▪ R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, alquilo, arilo,

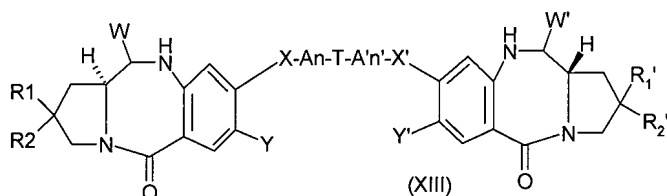
estando cada uno opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF<sub>3</sub>, R, OR, S(O)<sub>q</sub>R, arilo, Het;

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

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

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

Así, los derivados reversibles de los derivados de tomamicina de la fórmula general (XIII) pueden ser también usados en la presente invención:



donde A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>' se definen como 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 (por ejemplo, un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como -OCONRR', un carbamato cíclico, de tal manera que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como -NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico de tal manera 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 -SO<sub>3</sub>-, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como -NRR', opcionalmente una amina cíclica de tal manera que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como -N<sub>3</sub>, un ciano, un halo, un trialkilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácidos. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, NHCONH<sub>2</sub>, SMe.

Los compuestos de la fórmula (XIII) pueden por tanto ser considerados como solvatos, incluyendo agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser especialmente útiles.

En una realización preferida, los derivados de tomamicina de la invención se

seleccionan del grupo que consiste en:

- 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-*terc*-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridindiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-3-*terc*-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[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)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- éster *terc*-butilico del ácido bis-{2-[(S)-2-metilen-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-

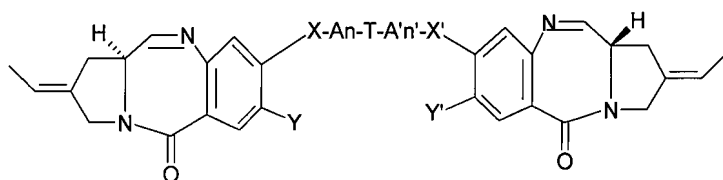
bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenoxi))-bis[7-metoxi-2-metilen-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-metilen-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

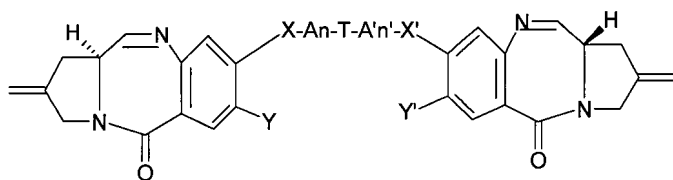
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

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

Los compuestos preferidos son los de la fórmula:



o



donde X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' son como se han definido antes.

Los compuestos de la fórmula (XII) se pueden preparar de una serie de maneras bien conocidas por los expertos en la técnica. Se pueden sintetizar los compuestos, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos descritos más adelante, o variaciones de los mismos que sean apreciadas por el experto en la técnica. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán fácilmente obvias y bien conocidas o fácilmente obtenibles de las publicaciones científicas por los expertos en la técnica. En

particular, dichos métodos se pueden encontrar en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Los métodos para sintetizar los derivados de tomaimicina que se pueden utilizar en la invención están descritos en la Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000142. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por una variedad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están comercialmente disponibles, o se pueden sintetizar fácilmente por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, 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).

Las moléculas del conjugado de la invención se pueden formar utilizando cualquier técnica. Los derivados de tomaimicina de la invención pueden estar enlazados con un anticuerpo u otro agente de unión a las células mediante un conector ácido-lábil, o mediante un conector foto-lábil. Los derivados se pueden condensar con un péptido que tiene una secuencia adecuada y posteriormente se pueden enlazar con un agente de unión a las células para producir un conector peptidasa-lábil. Los conjugados se pueden preparar para contener un grupo hidroxilo primario, que puede ser succinilado y enlazado con agente de unión a las células para producir un conjugado que puede ser escindido mediante esterasas intracelulares para dejar libre el derivado. Preferiblemente, los derivados se sintetizan para contener un grupo tiol libre o protegido, y después uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol, se enlazan cada uno covalentemente con el agente de unión a las células mediante un enlace disulfuro o un conector de tioéter.

Numerosos métodos de conjugación se muestran en los documentos USP 5,416,064 y USP 5,475,092. Los derivados de tomaimicina se pueden modificar para dar un grupo amino libre y se pueden enlazar después con un anticuerpo u otro agente de unión a las células mediante un conector ácido-lábil, o mediante un conector foto-lábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo amino o carboxilo libre, se pueden condensar con un péptido y posteriormente se pueden enlazar con un agente de unión a las células para producir un conector peptidasa-lábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo hidroxilo libre sobre el conector pueden ser succinilados y enlazados con un agente de unión a las células para producir un conjugado que puede ser escindido mediante esterasas intracelulares para dejar libre el fármaco. Lo más preferiblemente, los derivados de tomaimicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido, y después los dímeros de tomaimicina que contienen disulfuro- o tiol se enlazan con el agente de unión a las células mediante enlaces disulfuro.

Preferiblemente, los conjugados de anticuerpo monoclonal o agente de unión a las células y derivado de tomaimicina son los que están unidos mediante un enlace disulfuro, como se ha discutido antes, que son capaces de dejar libres los derivados de

tomaimicina. Dichos conjugados de unión a las células se preparan por métodos conocidos tales como por la modificación de los anticuerpos monoclonales con succinimidil-piridil-ditiopropionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, 1978, *Biochem. J.*, **173**: 723-737). El grupo tiopiridilo resultante se desplaza entonces por tratamiento con derivados de tomaimicina que contienen tiol para producir conjugados enlazados con disulfuro. Alternativamente, en el caso de los derivados de arilditio-tomaimicina, la formación del conjugado de unión a las células se efectúa por desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomaimicina mediante grupos sulfhidrido introducidos previamente en las moléculas de anticuerpo. Los conjugados que contienen 1 a 10 fármacos derivados de tomaimicina enlazados mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

Más específicamente, una solución del anticuerpo modificado con ditio-nitropiridilo a 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 tomaimicina que contiene tiol (1,3 equivalentes molares/grupo ditiopiridilo). La liberación de tio-nitropiridina a partir del anticuerpo modificado se monitoriza espectrofotométricamente a 325 nm y es completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado de anticuerpo y derivado de tomaimicina se purifica y se separa del fármaco sin reaccionar y de otros materiales de bajo peso molecular mediante filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacril S300. Se puede determinar el número de restos de derivado de tomaimicina unidos por molécula de anticuerpo midiendo la relación de la absorbancia a 230 nm y 275 nm. Una media de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina por molécula de anticuerpo pueden ser enlazadas mediante enlaces disulfuro por este método.

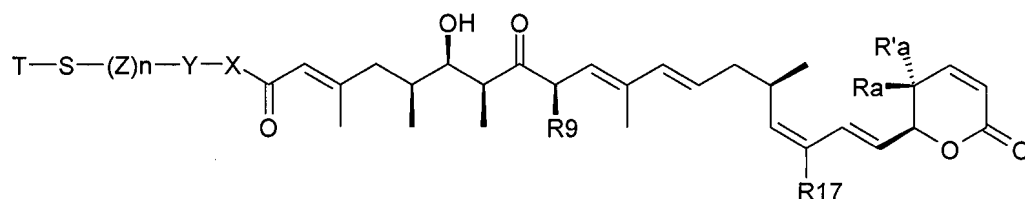
El efecto de la conjugación sobre la afinidad de unión hacia las células que expresan antígeno se puede determinar utilizando los métodos previamente descritos por Liu *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 8618-8623. Se puede medir la citotoxicidad de los derivados de tomaimicina y sus conjugados con anticuerpo para las líneas celulares mediante 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 para las líneas celulares adherentes se puede determinar mediante ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher *et al.*, 1986, *J. Cell Biol.*, **102**: 1312-1319.

#### DERIVADOS DE LEPTOMICINA

El agente citotóxico según la presente invención puede ser también un derivado de leptomicina. Según la presente invención, "derivados de leptomicina" se refiere a miembros de la familia de las leptomicinas como se define en Kalesse *et al.* (2002, *Synthesis* **8**: 981-1003), e incluye: leptomicinas, tales como leptomicina A y leptomicina B, callistatinas, ratjadones tales como ratjadone A y ratjadone 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 específicamente, los derivados de la invención son de la fórmula (I):



(I)

en la que

Ra y Ra' son H o -Alk; preferiblemente Ra es -Alk, 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-;

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

donde U se elige entre -Alk- lineal o ramificado, -Alk(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Alk-, -Alk(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Alk-, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -cicloalquil-, -heterocíclico-, -cicloalquil-Alk-, -Alk-cicloalquil-, -heterocíclico-Alk-, -Alk-heterocíclico-;

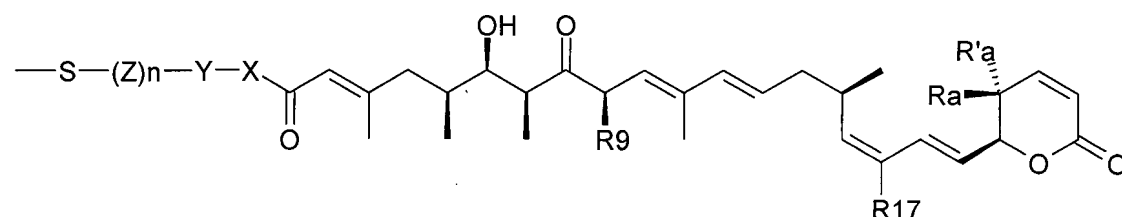
donde m es un número entero elegido de 1 a 2000;

preferiblemente, U es -Alk- lineal o ramificado,

Z es -Alk-;

n es 0 o 1; preferiblemente n es 0;

T representa H, un grupo protector de tiol tal como Ac, R<sub>1</sub> o SR<sub>1</sub>, donde R<sub>1</sub> representa H, metilo, Alk, cicloalquilo, arilo o heterocíclico opcionalmente sustituido, o T representa



donde:

Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n son como se ha definido antes;

preferiblemente, T es H o  $SR_1$ , donde  $R_1$  representa Alk, más preferiblemente metilo;

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

Alk representa un alquilo lineal o ramificado; preferiblemente Alk representa  $-(CH_2)_q(CH_3)_p-$  donde p representa un número entero de 1 a 10; y q representa un número entero de 0 a 2; preferiblemente, Alk representa  $-(CH_2)-$  o  $-C(CH_3)_2-$ ,

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

Los compuestos preferidos se pueden elegir entre:

- (2-metilsulfanil-etil)-amida del 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)-amida del 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-etil)-amida del 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)-amida del 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-metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del 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)-amida del 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 polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

Con el fin de enlazar el derivado con un agente de unión a las células, el derivado debe incluir un resto (grupo de enlace) que permite que los derivados sean enlazados con un agente de unión a las células mediante un enlace tal como un enlace disulfuro, un enlace sulfuro (o llamado aquí tioéter), un grupo ácido-lábil, un grupo foto-lábil, un grupo peptidasa-lábil o un grupo esterasa-lábil. Los derivados se preparan de forma que

contienen un resto necesario para enlazar el derivado de leptomicina con un agente de unión a las células mediante, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un grupo ácido-lábil, un grupo foto-lábil, un grupo peptidasa-lábil o un grupo esterasa-lábil. Con el fin de mejorar adicionalmente la solubilidad en soluciones acuosas, el grupo conector puede contener un polietilenglicol espaciador. Preferiblemente, se utiliza un puente sulfuro o disulfuro porque el ambiente reductor de la célula diana da como resultado la escisión del sulfuro o disulfuro y la liberación de los derivados con un incremento asociado de la citotoxicidad.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por una variedad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están comercialmente disponibles, o se pueden sintetizar fácilmente por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos para sintetizar los derivados de leptomicina que se pueden utilizar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar dichos derivados de leptomicina con los agentes de unión a las células tal como anticuerpos, están descritos en detalle en la Solicitud de Patente Europea No. 06290948.6, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria como referencia.

#### **ANÁLOGOS DE CC-1065**

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos según la presente invención también puede ser CC-1065 o un derivado de éste.

CC-1065 es un antibiótico anti-tumoral potente aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es alrededor de 1000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cáncer comúnmente usados tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, **42**, 3532-3537). CC-1065 y sus análogos están descritos en las Patentes de EEUU Nos. 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 y 5.585.499.

La potencia citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad alquilante y su actividad de unión al DNA o de intercalamiento en el DNA. Estas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Así, la actividad alquilante está contenida en la subunidad de ciclopropapirrolindol (CPI) y la actividad de unión al DNA reside en las dos subunidades de pirroloindol.

Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones produjo un retraso de la hepatotoxicidad que llevó a la mortalidad 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 ha estimulado los esfuerzos para desarrollar análogos que no producen retraso en la toxicidad, y se ha descrito la síntesis de análogos más sencillos modelados sobre CC-1065 (M.A. Warpehoski et al., 1988, *J Med. Chem.*, **31**: 590-603).

En otra serie de análogos, el resto CPI fue reemplazado por 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 elevada potencia *in vitro* del fármaco parental sin causar toxicidad retardada en los ratones. Como el CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del DNA de un modo covalente para causar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesin y Carzelesin, ha producido resultados decepcionantes (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 presentan efectos terapéuticos deficientes a causa de su elevada toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar mucho cambiando la distribución *in vivo* mediante liberación dirigida al sitio del tumor, que da por resultado una toxicidad más baja para los tejidos que no son diana y así una menor toxicidad sistémica. Con el fin de lograr este objetivo se han descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a las células que específicamente se dirigen a las células tumorales {Patentes de EEUU; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545}. Estos conjugados presentan típicamente *in vitro* una alta citotoxicidad específica de la diana, y una actividad anti-tumoral excepcional en los modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones (R.V. J. Chari *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, **55**: 4079-4084).

Recientemente, han sido descritos profármacos de análogos de CC-1065 con solubilidad mejorada en medio acuoso (Solicitud de Patente Europea No. 06290379.4). En estos profármacos, el grupo fenólico de la porción alquilante de la molécula está protegido con una funcionalidad que hace al fármaco estable durante el almacenamiento en solución acuosa ácida, y confiere al fármaco un aumento de la solubilidad en agua en comparación con un análogo no protegido. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* a pH fisiológico para dar el correspondiente fármaco activo. En los profármacos descritos en la Patente Europea 06290379.4, el sustituyente fenólico está protegido como un carbamato de fenilo que contiene ácido sulfónico que posee una carga a pH fisiológico, y de este modo ha mejorado la solubilidad en agua. Con el fin de mejorar adicionalmente la solubilidad en agua, se puede introducir un espaciador opcional de polietilenglicol en el conector 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.

Los métodos para sintetizar análogos de CC-1065 que se pueden usar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los análogos con los agentes de unión a las células tales como anticuerpos, están descritos en detalle en la Patente Europea 06290379.4 (cuyo contenido se incorpora a

la presente memoria como referencia) y las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499, 6.534.660 y 6.586.618 y en las Solicitudes de Estados Unidos Nos. 10/116.053 y 10/265.452.

### **OTROS FÁRMACOS**

Los fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también son adecuados para la preparación de los conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco se pueden enlazar también con las moléculas de anticuerpo mediante una molécula transportadora intermedia tal como la albúmina sérica. Los compuestos de Doxarrubicina y Danorrubicina, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EEUU No. de serie 09740991, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

### **COMPOSICIÓN TERAPÉUTICA**

La invención se refiere también 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, incluyendo (pero sin limitarse a ellos) los siguientes: carcinomas, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovarios, páncreas, estómago, cuello de útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de línea celular linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de línea celular mieloide, incluyendo las leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres en los que aún está por determinar que CD38 se exprese predominantemente. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se utilizan para el tratamiento de un cáncer tal como linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemia de células peludas, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, o leucemia linfocítica aguda, en el cual se expresa CD38, y otros cánceres en los que aún está por

determinar que CD38 se exprese predominantemente. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se puede usar para tratar enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, 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 en adultos y juvenil, polimiositis en adultos, urticaria crónica, cirrosis biliar primaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neuromielitis óptica, enfermedad distiroidea de Graves, penfigoide ampolloso, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Churg-Strauss y asma. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a otros trastornos tales como, por ejemplo, rechazos a trasplantes, tales como rechazo a trasplante renal, rechazo a trasplante de hígado, rechazo a trasplante de pulmón, rechazo a trasplante cardiaco, y rechazo a trasplante de médula ósea; enfermedad del injerto frente al hospedante; infecciones virales tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras que pueda determinar un experto en la técnica.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

- a) una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

Como se utiliza en la presente memoria, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye todos 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 entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como una combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro de sodio. En particular, los ejemplos relevantes de vehículo adecuado incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, conteniendo o no aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0,9 % (cloruro de sodio al 0,9 % p/v (NaCl)), y (3) dextrosa al 5 % (p/v); y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

Las composiciones de esta invención pueden contener también un agente terapéutico adicional, según sea necesario para el trastorno particular que se está tratando. Preferiblemente, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, y el compuesto activo adicional tendrán actividades complementarias, que no se perjudiquen entre sí. En una realización preferida, el

agente terapéutico suplementario es un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante 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 tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante de macrófagos (MSP), o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluyendo el receptor HER2, receptor HER3, c-MET, u otro receptor de tirosina-quinasas. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente que se dirige a los antígenos de conjuntos de diferenciación (CD), incluyendo 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 agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o inmunomodulador.

Las composiciones de la invención pueden estar en diferentes formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semi-sólidas, y sólidas, aunque la forma preferida depende del modo de administración pretendido y de la aplicación terapéutica. Las composiciones típicamente preferidas están en la forma de soluciones inyectables o para perfusión. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran por vía intravenosa como un bolo o mediante perfusión continua durante un periodo de tiempo. En otra realización preferida, se inyectan por vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

Las composiciones estériles para la administración parenteral se pueden preparar incorporando el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, seguido de esterilización mediante microfiltración. Como disolvente o vehículo, se puede utilizar agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como una combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro de sodio. Estas composiciones pueden contener también adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonizantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para la administración parenteral también se pueden preparar en la forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en el momento de su utilización en agua estéril o en cualquier otro medio inyectable.

estéril.

El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención también se puede administrar oralmente. Como composiciones sólidas para la administración oral se pueden utilizar comprimidos, pastillas, polvos (cápsulas de gelatina, sobres) o gránulos. En estas composiciones, el ingrediente activo según la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes tales como almidón, celulosa, sacarosa, lactosa o sílice, bajo una corriente de argón. Estas composiciones también pueden comprender otras sustancias aparte de los diluyentes, por ejemplo, uno o más lubricantes tales como estearato de magnesio o talco, un colorante, un recubrimiento (comprimidos recubiertos con azúcar) o un barniz.

Como composiciones líquidas para la administración oral, se pueden utilizar soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender otras sustancias aparte de los diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saporíferos o estabilizantes.

Las dosis dependen del efecto deseado, de la duración del tratamiento y de la vía de administración utilizada; generalmente están entre 5 mg y 1000 mg al día oralmente para un adulto con dosis unitarias que varían de 1 mg a 250 mg de la sustancia activa.

En general, el médico determinará la dosis adecuada dependiendo de la edad, peso y cualquier otro factor específico del sujeto que se va a tratar.

## **MÉTODOS TERAPÉUTICOS DE USO**

En otra realización, la presente invención proporciona un método para destruir una célula CD38<sup>+</sup> mediante la administración a un paciente que lo necesite de un anticuerpo que se une con dicha CD38 y es capaz de destruir dicha célula CD38<sup>+</sup> por apoptosis, ADCC, y/o CDC. Cualquiera de los tipos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, o conjugados citotóxicos de la invención, se pueden utilizar terapéuticamente. La invención incluye por tanto el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD38, fragmentos de los mismos, o conjugados citotóxicos de los mismos como medicamentos.

En una realización preferida, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, 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, fragmento de 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 un cáncer. En particular, el cáncer es un cáncer metastásico.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres, incluyendo (pero sin limitarse a ellos) los siguientes: carcinomas, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovarios, páncreas, estómago, cuello de útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de línea celular linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de línea celular mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, y otros cánceres en los que aún está por determinar que CD38 se exprese predominantemente. Preferiblemente, el trastorno es NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, o CML, en el que se expresa CD38, y otros cánceres en los que aún está por determinar que CD38 se exprese predominantemente. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se puede usar para tratar enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, 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 en adultos y juvenil, polimiositis en adultos, urticaria crónica, cirrosis biliar primaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neuromielitis óptica, enfermedad distiroidea de Graves, penfigoide ampolloso, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Churg-Strauss, y asma. En otra realización, dicha composición farmacéutica se refiere a otros trastornos tales como, por ejemplo, rechazos a trasplantes, tales como rechazo a trasplante renal, rechazo a trasplante de hígado, rechazo a trasplante de pulmón, rechazo a trasplante cardíaco, y rechazo a trasplante de médula ósea; enfermedad del injerto frente al hospedante; infecciones virales tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA etc.; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras que pueda determinar un experto en la técnica.

De manera similar, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto las células diana, o el tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente terapéutico que

comprende un conjugado citotóxico, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante 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 tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante de macrófagos (MSP), o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluyendo el receptor HER2, receptor HER3, c-MET, u otro receptor de tirosina-cinasas. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente que se dirige a los antígenos de conjuntos de diferenciación (CD), incluyendo 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 agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o inmunomodulador.

El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Como se utiliza en la presente memoria, "inhibir el crecimiento" significa ralentizar el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, producir la muerte de una célula, lisar una célula e inducir la muerte celular, ya sea en un periodo de tiempo corto o largo.

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

Las condiciones de la utilización no clínica *in vitro* se determinan fácilmente por un experto en la técnica.

Los ejemplos de utilización clínica *ex vivo* son para eliminar células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para eliminar células T y otras células linfoides de la médula ósea autóloga o alogénica o de tejidos antes del trasplante con el fin de prevenir la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD). El tratamiento se puede realizar como sigue. Se recoge la médula ósea del paciente o de

otro individuo y se incuba después en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10  $\mu$ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 °C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, las determinará fácilmente un experto en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por perfusión i.v. según 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 momento de la recolección de la médula y la reperfusión de las células tratadas, las células de médula ósea tratadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

Para la utilización clínica *in vivo*, el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo que se une al epítipo, o el conjugado citotóxico de la invención se proporcionarán como soluciones que se analizan para determinar su esterilidad y niveles de endotoxinas. Ejemplos de protocolos adecuados para la administración de los conjugados citotóxicos son los siguientes. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como un bolo i.v. cada semana. Las dosis del bolo se proporcionan en 50 a 100 ml de solución salina normal a la que se pueden añadir 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán de 10  $\mu$ g a 100 mg por administración, i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg al día). Más preferiblemente, las dosis variarán de 50  $\mu$ g a 30 mg. Lo más preferiblemente, las dosis variarán de 1 mg a 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento semanalmente. El especialista en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo permita la situación clínica.

## DIAGNÓSTICO

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden utilizar también para detectar CD38 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, los anticuerpos anti-CD38 de la invención se usan para determinar el nivel de CD38 en un tejido o en células obtenidas del tejido. En una realización preferida, el tejido es un tejido enfermo. En una realización preferida del método, el tejido es un tumor o una biopsia de éste. En una realización preferida del método, en primer lugar se extirpa un tejido o una biopsia de éste de un paciente, y se pueden determinar entonces los niveles de CD38 en el tejido o en la biopsia en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. En otra realización preferida, el nivel de CD38 se determina en una muestra de tejido o biopsia de éste, que puede ser congelada o fijada. Se puede utilizar el mismo método para determinar otras

propiedades de la proteína CD38, tales como sus niveles en la superficie de la célula, o su localización celular.

El método descrito anteriormente se puede utilizar para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o sospecha que tiene un cáncer, en el que el nivel de CD36 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto normal de referencia o estándar. Dicho método se puede utilizar entonces para determinar si un tumor expresa o no CD38, lo que puede sugerir que el tumor responderá bien al tratamiento con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o conjugados de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el tumor es un NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, o CML, en el que se expresa CD38, y otros cánceres en los que aún está por determinar que CD38 se exprese predominantemente.

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de éstos que se unen al epítipo que se marcan además para uso en aplicaciones de investigación o de diagnóstico. En las realizaciones preferidas, el marcaje es un marcaje radiactivo, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de imagen o un ion metálico.

También se proporciona un método para el diagnóstico en el que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen al epítipo, marcados, se administran a un sujeto sospechoso de tener un cáncer o una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune, y se mide o monitoriza la distribución de la marca dentro del cuerpo del sujeto.

## KIT

La presente invención incluye también kits que comprenden, por ejemplo, un conjugado citotóxico descrito e instrucciones para la utilización del conjugado citotóxico para destruir tipos celulares particulares. Las instrucciones pueden incluir directrices para utilizar los conjugados citotóxicos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, forma líquida, o en otra forma adecuada para ser incluida en un kit. El kit puede contener también elementos adicionales necesarios para llevar a la práctica el método descrito en las instrucciones del kit, tales como una solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinarse con el conjugado citotóxico antes de administrarlo a un paciente, y medios que faciliten la administración del conjugado a un paciente.

## EJEMPLOS

La invención se describe ahora por referencia a los siguientes ejemplos, que son solamente ilustrativos, y que no pretenden limitar la presente invención.

## Ejemplo 1

### Anticuerpos CD38 de ratón

Para la inmunización de ratones Balb/c VAF, se usaron células 300-19, una línea de células pre-B derivada de un ratón Balb/c (M. G. Reth *et al.* 1985, *Nature*, **317**: 353-355), que expresan establemente un alto nivel de CD38 humana. Se inmunizaron los ratones subcutáneamente con aproximadamente  $5 \times 10^6$  células 300-19 que expresan CD38 por ratón cada 2-3 semanas mediante protocolos estándar de inmunización usados en ImmunoGen, Inc. Los ratones inmunizados se reforzaron con otra dosis de antígeno tres días antes de ser sacrificados para la generación de hibridoma. Se recogió el bazo del ratón según protocolos estándar para animales y se trituró entre dos portaobjetos microscópicos esmerilados estériles, para obtener una suspensión de células separadas en medio RPMI-1640. Las células del bazo se sedimentaron, se lavaron, y se fusionaron con células P3X63Ag8.653 de mieloma murino (J. F. Kearney *et al.* 1979, *J Immunol*, **123**: 1548-1550) utilizando polietilenglicol 1500 (Roche 783 641). Las células fusionadas se resuspendieron en medio de selección RPMI-1640 que contiene hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262) y se seleccionaron para crecimiento en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Corning-Costar 3596, 200  $\mu$ l de suspensión de células por pocillo) a 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>). Después de 5 días de incubación, se separaron de cada pocillo 100  $\mu$ l de cultivo sobrenadante y se reemplazaron con 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 que contiene suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). Se continuó la incubación a 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>) hasta que los clones de hibridoma estuvieron listos para el cribado de anticuerpos. Se pueden usar otras técnicas de inmunización y producción de hibridoma, incluyendo las descritas en J. Langone and H. Vunakis (Eds., *Methods in Enzymology*, Vol. **121**, "Immunochemical Techniques, Part I"; Academic Press, Florida) y E. Harlow and D. Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un Becton Dickinson FACSCalibur o una máquina FACSArray, se cribaron los sobrenadantes de cultivo procedente del hibridoma (con antisuero IgG anti-ratón conjugado con FITC o PE) para secreción 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 resultaron positivos se subclonaron, y el isotipo de cada anticuerpo anti-CD38 segregado se identificó usando reactivos comerciales de isotipificación (Roche 1493027). Un total de 29 anticuerpos que fueron positivos para la unión con CD38 se purificaron mediante cromatografía de proteína A o G usando un protocolo estándar y después se caracterizaron adicionalmente.

## Ejemplo 2

### Caracterización de la unión de anticuerpos anti-CD38

Los histogramas FACS que demuestran la unión de los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 con las células 300-19 que expresan CD38 y la ausencia de unión con las células 300-19 parentales se muestran en la FIG.

1. Se incubó el anticuerpo 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 (10 nM) durante 3 h o con las células 300-19 que expresan CD38 o con las células 300-19 parentales ( $1-2 \times 10^5$  células por muestra) en 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 enfriado en hielo suplementado con suero normal de cabra al 2 %. Después, se sedimentaron las células, se lavaron, y se incubaron durante 1 h en hielo con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (Jackson Laboratory, 100  $\mu$ l, 6  $\mu$ g/ml en medio RPMI-1640 frío suplementado con suero normal de cabra al 2 %). Se sedimentaron de nuevo las células, se lavaron, se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS que contiene 1 % de formaldehído, y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con programa CellQuest (BD Biosciences).

Los histogramas FACS de las células 300-19 que expresan CD38 incubadas con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 mostraron un fuerte cambio de la fluorescencia, en comparación con la del correspondiente control negativo (células incubadas solamente con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC) (FIG. 1). Además, no se detectó ningún cambio significativo de fluorescencia cuando las células 300-19 parentales se incubaron con cualquiera de estos anticuerpos. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó el control positivo anticuerpo anti-CD38, AT13/5 (Serotec, MCA1019).

Se observó también un fuerte cambio de la fluorescencia cuando se incubaron células Ramos (ATCC CRL 1596) de linfoma con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 (FIG. 1). Los valores para las constantes de disociación aparente (KD) de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 para la unión con las células Ramos se estimaron a partir de las curvas de análisis FACS mostradas en la FIG. 2, usando el método de regresión no lineal para curvas sigmoidales de dosis-respuesta (GraphPad Prism, version 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.

## Ejemplo 3

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

Los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 indujeron la apoptosis de las líneas de células Ramos y Daudi (ATCC CCL-213) de linfoma y de la línea de células MOLP-8 de mieloma múltiple (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 con la fosfatidilserina en el exterior pero no en el interior de la bicapa membranal celular de las células intactas. En las células normales, sanas, la fosfatidilserina se expresa en el interior de la bicapa membranal, y la transición de fosfatidilserina desde el interior a la hoja exterior de la membrana plasmática es una de las señales más tempranamente detectables de apoptosis. La unión de la anexina V es por tanto una señal de inducción de apoptosis. El TO-PRO-3 es un colorante monomérico de ácido nucleico con cianina que solo puede penetrar la membrana plasmática cuando la integridad de la membrana está rota, como ocurre en las últimas etapas de apoptosis.

Las células que crecen exponencialmente se pusieron en placas a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml en placas de 24 pocillos en medio RMPI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS), L-glutamina 2 mM, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina (indicado más adelante como medio RMPI-1640 completo). En general, las células se cultivaron en medio RMPI-1640 completo, a menos que se indique otra cosa. Se incubaron las células con anticuerpos anti-CD38 (10 nM) durante 24 h a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub>. Se sedimentaron entonces las células, se lavaron dos veces con 500  $\mu$ l de PBS, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de unión (proporcionado en el kit de anexina V-FITC), que contiene 5  $\mu$ l de anexina V-FITC, y se incubaron durante 15 min sobre hielo. Después, se añadieron a la mezcla 400  $\mu$ l de tampón de unión y TO-PRO-3 (hasta una concentración final de 1  $\mu$ M), y se midió inmediatamente, mediante FACS, la fluorescencia de FITC y TO-PRO-3 asociada a la célula. Se recogieron cuatrocientos casos para cada muestra. Los gráficos de puntos para la fluorescencia de TO-PRO-3 (FL4-H; eje de las y) y para la fluorescencia de anexina V-FITC (FL1-H; eje de las x) se generaron usando el programa CellQuest.

Los resultados se muestran en las FIG. 3 y 4. La FIG. 3 da un ejemplo de tal gráfico de puntos para las células Daudi después de una incubación de 24 h con diferentes anticuerpos anti-CD38. Los porcentajes medios de células positivas a la anexina V (incluye tanto las células TO-PRO-3-positivas como las negativas) de muestras duplicadas se determinaron a partir de estos gráficos y se muestran en la FIG. 4. De forma inesperada, los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 mostraron fuertes actividades apoptóticas. Por encima del 30 % de las células Daudi expuestas a cualquiera de estos anticuerpos fueron anexina V-positivas, en comparación con solamente aproximadamente 6 % de las células no tratadas (FIG. 3 y 4A). Los anticuerpos 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 mostraron

actividades apoptóticas al menos 2,4 veces más fuertes (24 % después de restar el valor del control no tratado) que los anticuerpos CD38 murinos de la técnica anterior ensayados a la misma concentración 10 nM, (AT13/5, OKT10, IB4, y SUN-4B7, menos de 10 % de células anexina V-positivas después de restar el valor del control no tratado) y otros dos anticuerpos anti-CD38 generados en el laboratorio de esta invención, (38SB7 y 38SB23, no más altos que el control no tratado, esto es aproximadamente 6 % de células anexina V-positivas) (FIG. 4A). El AT13/5 se compró a Serotec (MCA1019), y el OKT10 se produjo y se purificó de hibridoma (ATCC CRL-8022). Los IB4 y SUN-4B7 fueron un regalo del Prof. F. Malavasi, University de Turin, Italy. Similarmente, los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 presentaron una actividad pro-apoptótica al menos 3,5 veces más fuerte sobre otra línea celular de linfoma, Ramos (7 % o más de células anexina-V-positivas después de restar el valor del control no tratado) que o bien los anticuerpos CD38 murinos de la técnica anterior, AT13/5, OKT10, IB4, y SUN-4B7, u otros dos nuevos anticuerpos anti-CD38, 38SB7 y 38SB23 (menos de 2 % de células anexina V-positivas después de restar el valor del control no tratado) (FIG. 4B). Finalmente, los anticuerpos anti-CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 presentaron una fuerte actividad pro-apoptótica sobre la línea de células MOLP-8 de mieloma múltiple (FIG. 4C). Aproximadamente 50 % de las células MOLP-8 tratadas con estos anticuerpos fueron anexina V-positivas, comparadas con aproximadamente 39 % de las células no tratadas. En contraste, el tratamiento con cualquiera de los anticuerpos CD38 murinos de la técnica anterior, AT13/5, OKT10, IB4, y SUN-4B7, u otros dos nuevos anticuerpos anti-CD38, 38SB7 y 38SB23 no produjeron ningún aumento de la porción de células apoptóticas.

#### **Ejemplo 4**

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

Anticuerpo 38SB19.

**Preparación de RNA a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo 38SB19**

Las preparaciones de RNA total se obtuvieron a partir de  $5 \times 10^6$  células de hibridoma, que producen el anticuerpo 38SB19, utilizando el kit RNeasy miniprep de Qiagen. Brevemente,  $5 \times 10^6$  células se sedimentaron y se resuspendieron en 350  $\mu$ l de tampón RLT (que contiene 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol). La suspensión se homogeneizó pasándola a través de una aguja y jeringa de 21,5 G aproximadamente 10 – 20 veces o hasta que dejó de ser viscosa. Se añadió etanol (350  $\mu$ l de etanol acuoso al 70 %) al homogenato, que se mezcló bien. La solución se transfirió a una columna de centrifugado, se puso en un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó a  $>8000 \times g$

durante 15 segundos. Se lavó la columna dos veces con 500 µl de tampón RPE, se transfirió entonces a un tubo nuevo y se eluyó con 30 µl de agua sin RNasa y una centrifugación de 1 minuto. El eluato (30 µl) se puso de nuevo en la columna para un segundo centrifugado de la elución de 1 minuto. Una alícuota de los 30 µl del eluato se diluyó con agua y se usó para medir la absorción UV a 260 nm para la cuantificación del RNA.

#### Preparación de cDNA con la reacción de la transcriptasa inversa (RT)

El cDNA de la región variable del anticuerpo 38SB19 se generó a partir del RNA total usando el kit SuperscriptII de Invitrogen. Se siguieron exactamente los protocolos del kit, utilizando hasta 5 µg de RNA total de las minipreparaciones de Qianeasy. Brevemente, el RNA, 1 µl de cebadores aleatorios, y 1 µl de mezcla de dNTP se llevaron hasta 12 µl con agua destilada estéril sin RNasa y se incubaron a 65 °C durante 5 minutos. Se puso entonces la mezcla en hielo durante al menos 1 minuto. Se añadieron después 4 µl de tampón de reacción 5 x, 2 µl de DTT 0,1 M, y 1 µl de RNaseOUT y se incubó la mezcla a 25 °C durante 2 minutos en un ciclador térmico MJ Research. El ciclador térmico se detuvo de manera que se pudo añadir 1 µl de enzima SuperscriptII y después se volvió a poner en marcha durante 10 minutos adicionales a 25 °C antes de cambiar a 55 °C durante 50 minutos. La reacción se inactivó con calor calentando a 70 °C durante 15 min y eliminó la RNasa mediante la adición de 1 µl de RNasa H e incubando a 37 °C durante 20 minutos.

#### Reacciones de PCR degenerada

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

Los componentes de la reacción de PCR (Tabla 3) se mezclaron en hielo en tubos de PCR de pared fina y después se transfirieron a un ciclador térmico MJ Research precalentado y detenido a 94 °C. Las reacciones se realizaron utilizando un programa obtenido de Wang *et al.* 2000 como sigue;

Nombre: Wang45

94 °C 3:00 min

94 °C 0:15 s

45 °C 1:00 min

72 °C 2:00 min

Ir a 2 29 veces

72 °C 6:00 min

4 °C para siempre

final

Las mezclas de la reacción de PCR se hicieron correr entonces en un gel de agarosa al 1 %, de bajo punto de fusión, se cortaron las bandas de 300 a 400 pb, se purificaron utilizando minicolumnas de DNA de Zymo, y se mandaron a Agencourt biosciences

para la secuenciación. Los cebadores de PCR 5' y 3' respectivos se utilizaron como cebadores de secuenciación para generar los cDNA de la región variable de 38SB19 desde ambas direcciones.

#### Clonación de la secuencia del extremo 5'

Debido a que los cebadores degenerados utilizados para clonar las secuencias de cDNA de cadena ligera y pesada de la región variable de 38SB19 alteran las secuencias del extremo 5', se necesitaron trabajos de secuenciación adicionales para descifrar las secuencias completas. La secuencia de cDNA preliminar obtenida mediante los métodos descritos anteriormente se utilizó para buscar en el sitio NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) las secuencias de la línea germinal murina de las que se obtiene la secuencia de 38SB19. Se diseñaron cebadores de PCR (Tabla 3) para hibridar con la secuencia líder del anticuerpo murino de manera que una nueva reacción de PCR pudiera proporcionar el cDNA completo de la región variable, sin alteraciones debidas a los cebadores de PCR. Las reacciones de PCR, las purificaciones de las bandas, y la secuenciación se realizaron como se ha descrito anteriormente.

#### Análisis peptídico para la confirmación de la secuencia

La información de la secuencia de cDNA de la región variable se combinó con la secuencia de la región constante de la línea germinal para obtener secuencias de cDNA del anticuerpo de longitud completa. Los pesos moleculares de la cadena pesada y de la cadena ligera se calcularon entonces y se compararon con los pesos moleculares obtenidos mediante análisis LC/MS del anticuerpo murino 38SB19.

La Tabla 4 proporciona la masa calculada de las secuencias de cDNA de 38SB19 LC y HC junto con los valores medidos por LC/MS. Las medidas del peso molecular son consistentes con las secuencias de cDNA tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de 38SB19.

### **Ejemplo 5**

#### Expresión recombinante de anticuerpos hu38SB19

Las secuencias de la región variable de hu38SB19 fueron optimizadas en codones y sintetizadas por Blue Heron Biotechnology. Las secuencias están flanqueadas por sitios de la enzima de restricción para clonar en marco con las respectivas secuencias constantes tanto en cadena sencilla como en cadena dual en tándem en plásmidos de expresión de mamíferos. La región variable de la cadena ligera es clonada en los sitios EcoRI y BsiWI tanto en los plásmidos ps38SB19LCZv1.0 como en los plásmidos ps38SB19v1.00 (FIG. 5A y 5C). La región variable de cadena pesada es clonada en los

sitios HindIII y ApaI tanto en los plásmidos ps38SB19HCNv1.0 como en los ps38SB19v1.00 (FIG. 5B y 5C). Estos plásmidos se pueden usar para expresar hu38SB19 en transfecciones transitorias o estables en las células de mamíferos. Se usaron construcciones de vectores de expresión similares para producir otros anticuerpos quiméricos y humanizados.

Se realizaron transfecciones transitorias para expresar hu38SB19 en células HEK-293T usando reactivos  $\text{CaPO}_4$  de BD biosciences. Los protocolos suministrados fueron modificados ligeramente para mejorar los rendimientos de la expresión. Brevemente, se pusieron en placas  $2 \times 10^6$  células HEK-293T sobre placas de cultivo de tejidos de 10 cm recubiertas con polietilenimina (PEI) 24 h antes de la transfección. La transfección empezó lavando las células con PBS y reemplazando el medio con 10 ml de DMEM (Invitrogen) con 1 % de Ultra Low IgG FBS (Hyclone). La solución A (10  $\mu\text{g}$  de DNA, 86,8  $\mu\text{l}$  de solución de  $\text{Ca}^{2+}$ , y hasta 500  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ ) se añadió gota a gota a la solución B mientras se agitaba en vórtex. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 min y se añadió 1 ml de la mezcla gota a gota a cada placa de 10 cm. Aproximadamente 16 h post-transfección, se reemplazó el medio con 10 ml de DMEM fresco con 1 % de Ultra Low IgG FBS. Aproximadamente 24 horas más tarde se añadió butirato de sodio 2 mM a cada placa de 10 cm. La transfección se recogió 4 días más tarde.

Se preparó el sobrenadante para la cromatografía de afinidad de proteína A por la adición de 1/10 de volumen de tampón Tris 1 M/HCl, pH 8,0. Se filtró el sobrenadante con pH ajustado a través de una membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  y se cargó sobre una columna de sefarosa-proteína A (HiTrap proteína A HP, 1 ml, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón de unión (PBS, pH 7,3). Se conectó una precolumna de Q-sefarosa (10 ml) hacia arriba de la columna de proteína A durante la carga de la muestra para reducir la contaminación con material celular tal como DNA. Después de la carga de la muestra, se separó la precolumna y se invirtió la orientación de la columna de proteína A para lavado y elución. Se lavó la columna con tampón de unión hasta que se obtuvo una línea base estable sin absorbancia a 280 nm. Se eluyó el anticuerpo con tampón de ácido acético 0,1 M que contiene 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 por la adición de 1/10 de volumen de Tris 1 M /HCl, pH 8,0. Se dializaron la fracción o fracciones pico durante la noche dos veces frente a PBS y se cuantificó el anticuerpo purificado por la absorbancia a  $\text{OD}_{280}$ . Los anticuerpos humanizados y quiméricos se pueden purificar también usando una columna de proteína G con procedimientos ligeramente diferentes.

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

## Ejemplo 6

### Actividades de citotoxicidad mediada por las células dependiente de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos anti-CD38 quiméricos.

Puesto que se había demostrado previamente que algunos anticuerpos anti-CD38 tenían 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 las versiones quiméricas de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39, que consisten en regiones variables murinas y la región constante IgG1/IgKappa humana, y se analizaron en cuanto a actividades ADCC y/o CDC.

Los anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, y ch38SB39 se analizaron en primer lugar en cuanto a ADCC usando células Ramos como células diana y células destructoras naturales humanas (NK) como células efectoras. Un ensayo de liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH) se utilizó para medir la lisis celular (R. L. Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem*, **276**: 6591-6604).

Las células NK se aislaron en primer lugar de sangre humana (de un donante normal; comprada a Research Blood Components, Inc., Brighton, MA) usando un protocolo modificado para el Kit II de aislamiento de las NK (Miltenyi Biotec). Se diluyó la sangre 2-3 veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Veinticinco ml de sangre diluida se extendieron cuidadosamente sobre 25 ml de Ficoll Paque en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 400 g durante 45 min a 19 °C. Se recogieron las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) a partir de la interfase, 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 después se añadieron a la suspensión celular 500 µl de cocktail biotina-anticuerpo (del kit de aislamiento de NK, 130-091-152, Miltenyi Biotec). El cocktail de biotina-anticuerpo contiene anticuerpos biotinilados que se unen a los linfocitos, excepto a las células NK. Se incubó la mezcla a 4 °C durante 10 min, y después se añadieron 1,5 ml de tampón de aislamiento de NK (PBS, BSA al 0,1 %, EDTA 1 mM) y 1 ml de micro-perlas anti-biotina. La mezcla célula-anticuerpo se incubó durante otros 15 min a 4 °C. A continuación, se lavaron las células una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK y se resuspendieron en 3 ml de tampón de aislamiento de NK. Después, la columna MACS LS (sobre el separador MACS, Miltenyi Biotec) se pre-lavó con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. Se cargó entonces la suspensión celular sobre la columna LS. Se recogió el efluente (fracción con células no marcadas) en un nuevo tubo cónico de 50 ml. Se lavó la

columna 3 veces con 3 ml de tampón de aislamiento de NK. Se recogió todo el efluente en el mismo tubo y se lavó una vez con 50 ml de tampón de aislamiento de NK. Las células NK se pusieron en placas en 30 ml de RPMI-1640 suplementado con 5 % de suero fetal bovino y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina.

Se dividieron en alícuotas (50  $\mu$ l/pocillo) diferentes concentraciones de anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, y ch38SB39 en medio RPMI-1640 suplementado con BSA al 0,1 %, HEPES 20 mM, pH 7,4, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina (indicado más adelante como medio RHBP) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células diana, Ramos, se resuspendieron a  $10^6$  células/ml en medio RHBP y se añadieron a cada pocillo (100  $\mu$ l/pocillo) que contiene las diluciones de anticuerpo. La placa que contiene las células diana y las diluciones de anticuerpo se incubó durante 30 min a 37 °C. Se añadieron entonces las células NK (50  $\mu$ l/pocillo) a los pocillos que contienen las células diana típicamente a una proporción de 1 célula diana para 3-6 células NK. Se añadió medio RHBP (50  $\mu$ l/pocillo) a los pocillos control con células NK. También, se añadieron 20  $\mu$ l de solución de Triton X-100 (medio RPMI-1640, Triton X-100 al 10 %) a los 3 pocillos que contienen solamente células diana sin anticuerpo, para determinar la liberación máxima posible de LDH. Se incubaron las mezclas a 37 °C durante 4 h, se centrifugaron después durante 10 min a 1200 rpm, y se transfirieron cuidadosamente 100  $\mu$ l del sobrenadante a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Se añadió a cada pocillo la mezcla de reacción de LDH (100  $\mu$ l/pocillo) del Kit de detección de citotoxicidad (Roche 1 644 793) y se incubó a temperatura ambiente durante 5-30 min. Se midió la densidad óptica de las muestras a 490 nm ( $OD_{490}$ ). Se determinó el porcentaje de lisis específica de cada muestra asignando una lisis del 100 % al valor  $OD_{490}$  de las muestras tratadas con Triton X-100 y una lisis de 0 % al valor  $OD_{490}$  de la muestra control no tratada que contiene solamente células diana. Las muestras que contienen solamente células NK dieron lecturas  $OD_{490}$  despreciables.

Cuando se ensayaron con células Ramos como diana y células efectoras NK, los anticuerpos anti-CD38 quiméricos presentaron actividades ADCC muy potentes (FIG. 6). Los valores  $EC_{50}$  se estimaron por un método de regresión no lineal con curvas dosis-respuesta sigmoidales y se encontró que eran los siguientes: 0,0013  $\mu$ g/ml para ch38SB13, 0,0013  $\mu$ g/ml para ch38SB18, 0,0018  $\mu$ g/ml para ch38SB19, 0,0022  $\mu$ g/ml para ch38SB30, 0,0012  $\mu$ g/ml para ch38SB31, 0,1132  $\mu$ g/ml para ch38SB39. Los anticuerpos anti-CD38 quiméricos también presentaron una potente actividad ADCC sobre células LP-1 (DSMZ ACC 41) de mieloma múltiple (valores  $EC_{50}$ : 0,00056  $\mu$ g/ml para ch38SB18; 0,00034  $\mu$ g/ml para ch38SB19; 0,00024  $\mu$ g/ml para ch38SB31) (FIG. 7A). El Ch38SB19 también destruyó de forma eficaz las células Daudi de linfoma (FIG. 7B), las células NALM-6 B-ALL (DSMZ ACC 128) (FIG. 8A), y las células MOLT-4 T-

ALL (ATTC CRL-1582) (FIG. 8B) por ADCC, lo que sugiere que los anticuerpos anti-CD38 con una actividad apoptótica inusualmente potente también tienen una potente actividad ADCC frente a diferentes células tumorales derivadas de diferentes neoplasias hematopoyéticas. Además, un anticuerpo control IgG1 no reactivo (rituximab, BiogenIdex) (FIG. 7A, 8A, y 8B) o mu38SB19 (FIG. 7B) en el mismo experimento no tuvo ninguna actividad ADCC significativa.

### Ejemplo 7

#### Actividades CDC de anticuerpos anti-CD38 quiméricos.

Se midieron las actividades CDC de los anticuerpos ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, y ch38SB39 basándose en un método modificado de (H. Gazzano-Santoro *et al.* 1997, *J. Immunol Methods*, **202**: 163-171). El complemento humano fue suero de complemento humano liofilizado (Sigma-Aldrich S1764) que se reconstituyó con agua purificada estéril como indica el fabricante y se diluyó después cinco veces con medio RHBP inmediatamente antes del experimento. Las células diana suspendidas a  $10^6$  células/ml en medio RHBP se distribuyeron en alícuotas a los pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (50  $\mu$ l/pocillo). Después, se añadieron 50  $\mu$ l de diferentes concentraciones (de 10 nM a 0,001 nM) de los anticuerpos anti-CD38 en medio RHBP (un anticuerpo por muestra), lo que fue seguido por 50  $\mu$ l/pocillo de solución de complemento. Se incubó entonces la placa durante 2 h a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub>, después de cuyo tiempo se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de reactivo azul Alamar al 40 % (Biosource DAL1100) diluido en RHBP (10 % al final) para medir la viabilidad de las células. El azul Alamar monitoriza la capacidad reductora de las células viables. Se incubó la placa durante 5-18 h a 37 °C antes de medir la fluorescencia (en unidades de fluorescencia relativa, RFU) a 540/590 nm. El porcentaje de viabilidad específica de las células para cada muestra se determinó en primer lugar corrigiendo los valores experimentales para la fluorescencia de fondo, restando el valor RFU de fondo (pocillos con medio solamente, sin ninguna célula) de los valores RFU para cada muestra, y después, dividiendo los valores RFU corregidos por el valor RFU corregido de las muestras de células no tratadas.

Cuando las actividades CDC de las muestras del anticuerpo anti-CD38 quimérico se ensayaron con células Raji-IMG usando complemento humano a una dilución final de 5 %, los anticuerpos anti-CD38 quiméricos mostraron actividades CDC muy potentes (FIG. 9). Las Raji-IMG son células derivadas de las células Raji (ATCC CCL-86) y expresan niveles más bajos de los inhibidores del complemento membranales CD55 y CD59. Los valores EC<sub>50</sub> se estimaron por regresión no lineal a partir de las curvas dosis-respuesta sigmoidales mostradas en la Fig. 8. y son como sigue: 0,005  $\mu$ g/ml

para ch38SB13, 0,0101  $\mu$ g/ml para ch38SB18, 0,028  $\mu$ g/ml para ch38SB19, 0,020  $\mu$ g/ml para ch38SB30, 0,010  $\mu$ g/ml para ch38SB31, y 0,400  $\mu$ g/ml para ch38SB39. Los anticuerpos anti-CD38 quiméricos también presentaron una potente actividad CDC hacia las células LP-1 de mieloma múltiple (valor  $EC_{50}$ : 0,032  $\mu$ g/ml para ch38SB18; 0,030  $\mu$ g/ml para ch38SB19; 0,043  $\mu$ g/ml para ch38SB31), mientras que una IgG1 control quimérica no reactiva (rituximab, BiogenIdec) no tuvo ninguna actividad CDC (FIG. 10). Cuando los anticuerpos CD38 quiméricos se ensayaron sobre células Daudi de linfoma, los diferentes anticuerpos anti-CD38 difirieron en sus actividades CDC (FIG. 11). Mientras que la viabilidad específica de las células Daudi fue menor de 15 % después de su incubación con 1,25  $\mu$ g/ml de ch38SB19 en presencia de complemento, hubo solamente una disminución marginal en la viabilidad específica de estas células después de su incubación con ch38SB18 o ch38SB39 (1,25  $\mu$ g/ml o concentración más alta) en presencia de complemento ( la viabilidad específica fue 85 % y 91 %, respectivamente). Además, sólo se observó una modesta reducción de la viabilidad específica cuando se incubaron las células Daudi con 1,25  $\mu$ g/ml o una concentración más alta 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 apoptótica, ADCC, y CDC de anticuerpos anti-CD38 humanizados.

Las dos versiones de 38SB19 humanizado (hu38SB19 v1.00 y v1.20) y el 38SB19 quimérico presentaron similares afinidades de unión 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 38SB19 quiméricos y humanizados se compararon también en un ensayo de unión competitivo, en el que se mide su capacidad de competir con la unión del anticuerpo 38SB19 murino biotinilado. El anticuerpo 38SB19 murino marcado con biotina ( $3 \times 10^{-10}$  M) se mezcló con diferentes concentraciones de ch38SB19, hu38SB19 v1.00, o hu38SB19 v1.20. La mezcla de anticuerpos se incubó con células Ramos, y la cantidad del 38SB19 murino biotinilado unido a las células se midió con estreptavidina conjugada a FITC por análisis FACS. Los Hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20, y ch38SB19 compitieron igualmente bien con la unión de 38SB19 murino biotinilado (FIG. 12B), indicando de nuevo que la afinidad de unión no se ha visto afectada por la humanización. Cuando se compararon los ch38SB19, hu38SB19 v1.00 y hu38SB19 v1.20 ( $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  M) en cuanto a su capacidad para inducir la apoptosis de las células Daudi, mostraron similares actividades apoptóticas (FIG. 13). Por otra parte, los hu38SB19 v1.00 y v1.20 también mostraron similar potencia ADCC que el ch38SB19 en las células LP-1 (FIG. 14) y similar potencia CDC que el ch38SB19 en las células Raji-IMG y LP-1 (FIG. 15). El

Hu38SB19 v1.00 también mostró similar actividad CDC que el ch38SB19 en la línea de células DND-41 de leucemia linfoblástica aguda de células T (DSMZ 525) (FIG 15). El Hu38SB19 v1.00 fue ensayado además en cuanto a su capacidad para inducir la apoptosis en un conjunto diverso de líneas de células (FIG. 16). El tratamiento con hu38SB19 v1.00 ( $10^{-8}$  M) dio como resultado un incremento dramático de células anexina V-positivas en las líneas de células de linfoma de células B, SU-DHL-8 (DSMZ ACC 573) (de 7 % en las células control no tratadas a 97 % en las células tratadas con hu38SB19) y NU-DUL-1 (DSMZ ACC 579) (de 10 % en las células control no tratadas a 37 % en las células tratadas con hu38SB19) y la línea de células T-ALL, DND-41 (de 7 % en las células control no tratadas a 69 % en las células tratadas con hu38SB19). En adición, el tratamiento con hu38SB19 v1.00 ( $10^{-8}$  M) aumentó la porción de células anexina V-positivas en la línea de células JVM-13 de leucemia linfocítica de células B (DSMZ ACC 19) (de 8 % en las células control no tratadas a 17 % en las células tratadas con hu38SB19) y en la línea de células HC-1 de leucemia de células peludas (DSMZ ACC 301) (de 6 % en las células control no tratadas a 10 % en las células tratadas con hu38SB19).

Similarmente, dos versiones de 38SB31 humanizado (hu38SB31 v1.1 y v1.2) y el 38SB31 quimérico presentaron afinidades similares de unión 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 38SB31 quiméricos y humanizados se compararon también en un ensayo competitivo de unión, como se ha descrito antes y se comportaron igualmente bien. Se ensayó además el Hu38SB31v1.1 en cuanto a su capacidad para inducir la apoptosis en varias líneas de células. El anticuerpo humanizado mostró similares actividades apoptóticas que ch38SB31 hacia las células Ramos, Daudi, Molp-8 y SU-DHL-8. Por otra parte, el hu38SB31 v1.1 también mostró similares actividades ADCC y CDC que el ch38SB31 en estas líneas de células.

### Ejemplo 9

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

Las actividades anti-tumorales *in vivo* de 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, y 38SB39 se investigaron en un modelo de supervivencia de tumor de xenoinjerto humano en ratones inmunodeficientes (hembras CB.17 SCID) establecido con células Ramos de linfoma. Se inocularon los ratones hembras CB.17 SCID con  $2 \times 10^6$  células Ramos en 0,1 ml de medio libre de suero a través de una vena caudal lateral. Siete días después de la inoculación de las células tumorales, se distribuyeron los ratones aleatoriamente en siete grupos basándose en el peso corporal. Había 10 ratones por grupo, excepto para el grupo tratado con 38SB31, que tenía 6 ratones, y el grupo tratado con 38SB39, que tenía 8 ratones. Se administraron los anticuerpos a los ratones

intravenosamente a una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas, empezando siete días después de la inoculación de las células. Se sacrificaron los ratones cuando una o ambas patas traseras estaban paralizadas, cuando la pérdida de peso corporal fue más del 20 % desde el valor de pre-tratamiento, o cuando el animal estaba demasiado enfermo para alcanzar el alimento y el agua. El tratamiento con 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, o 38SB39 prolongó significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con la de los ratones tratados con PBS (Fig. 17). La mediana de supervivencia de los ratones tratados con PBS fue de 22 días y la de los grupos tratados con anticuerpo varió de 28 a 33 días.

Las actividades anti-tumorales *in vivo* de mu38SB19 y hu38SB19 se investigaron además en modelos adicionales de tumores por xenoinjerto humano en ratones inmunodeficientes. Para un modelo de supervivencia de linfoma Daudi, se inocularon los ratones SCID con  $5 \times 10^6$  células Daudi en 0,1 ml de medio libre de suero a través de una vena caudal lateral. El estudio se llevó a cabo como se ha descrito antes. El tratamiento con mu38SB19 o con hu38SB19 prolongó significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con la de los ratones tratados con PBS (Fig. 18). La mediana de supervivencia de los ratones tratados con PBS fue de 22 días, mientras que la mediana de supervivencia de los ratones tratados con anticuerpo fue de 47 días.

Para un modelo de tumor NCI-H929 de mieloma múltiple, se inocularon ratones SCID subcutáneamente con  $10^7$  células. Cuando los tumores fueron palpables el día 6, se distribuyeron los animales aleatoriamente en grupos de 10 según el peso corporal y se comenzó el tratamiento con anticuerpo. El anticuerpo hu38SB19 o un anticuerpo control IgG1 quimérico no reactivo (rituximab, BiogenIdex) se administraron a los ratones intravenosamente a una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas. Se hizo seguimiento del volumen del tumor y se sacrificaron los animales cuando los tumores alcanzaron un tamaño de  $2000 \text{ mm}^3$  o cuando se necrosaron. El grupo tratado con PBS alcanzó un volumen de tumor medio de  $1000 \text{ mm}^3$  el día 89, el grupo del anticuerpo control IgG1 quimérico el día 84 (Fig. 19). El tratamiento con hu38SB19 evitó completamente el crecimiento del tumor en los 10 animales. Por contraste, solamente dos animales del grupo tratado con PBS y tres animales del grupo del anticuerpo control IgG1 quimérico presentaron regresión del tumor.

Para un modelo de tumor MOLP-8 de mieloma múltiple, se inocularon los ratones SCID subcutáneamente con  $10^7$  células. Cuando los tumores fueron palpables el día 4, se distribuyeron los animales aleatoriamente en grupos de 10 según el peso corporal y se comenzó el tratamiento con anticuerpo. Los anticuerpos hu38SB19 y mu38SB19 o un anticuerpo control IgG1 quimérico se administraron a los ratones intravenosamente a una dosis de 40 mg/kg, dos veces por semana, en tres semanas sucesivas. Se hizo

seguimiento del volumen del tumor y se sacrificaron los animales cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm<sup>3</sup> o cuando se necrosaron. El grupo tratado con PBS alcanzó un volumen medio de tumor de 500 mm<sup>3</sup> el día 22, el grupo del anticuerpo control IgG1 quimérico el día 23 (Fig. 20). Ninguno de los tumores en estos grupos sufrió regresión. Por contraste, el tratamiento con hu38SB19 o mu38SB19 dio lugar a la regresión del tumor en 8 de 10 o 6 de 10 animales, respectivamente.

T A B L A S

Tabla 1A:

Los residuos de la superficie del marco de cadena ligera de mu38SB19 y los correspondientes residuos en la misma posición Kabat en el anticuerpo humano 1.69. Los residuos que son diferentes y por tanto cambian en el anticuerpo hu38SB19 están en celdas sombreadas. Los residuos con (\*) están retromutados al residuo mu38SB19 en una o más variantes de hu38SB19.

| Residuos de superficie del marco de cadena ligera de mu38SB19 y los correspondientes residuos 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        | S    |
| 80                                                                                                                         | A        | A    |
| 81                                                                                                                         | E        | E    |
| 107                                                                                                                        | K        | K    |
| 108                                                                                                                        | R        | R    |

Tabla 1B:

Los residuos de la superficie del marco de cadena pesada de mu38SB19 y los correspondientes residuos en la misma posición Kabat en el anticuerpo humano 1.69. Los residuos que son diferentes y por tanto cambian en el anticuerpo hu38SB19 están en celdas sombreadas.

| Residuos de superficie del marco de cadena pesada de mu38SB19 y los correspondientes residuos 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    |
| 82B                                                                                                                        | S        | S    |
| 84                                                                                                                         | S        | S    |
| 85                                                                                                                         | E        | E    |
| 106                                                                                                                        | Q        | Q    |
| 113                                                                                                                        | S        | S    |

Tabla 2.

Los cebadores usados para las reacciones de PCR degenerada se basan en los de Wang *et al.*, 2000 excepto HindKL que se basa en Co *et al.* 1992. Las bases mixtas se definen como sigue: 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                                          |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| BamlgG1<br>(SEQ ID NO.<br>73).  | GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC               |
| IgG2Abam<br>(SEQ ID NO.<br>74). | GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA                   |
| EcoMH1<br>(SEQ ID NO.<br>75).   | CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC                   |
| EcoMH2<br>(SEQ ID NO.<br>76).   | cttccggaattcsargtnmagctgsagsagtcwgg                |
| SacIMK<br>(SEQ ID NO.<br>77).   | GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA                    |
| HindKL<br>(SEQ ID NO.<br>78).   | TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATAC<br>AGTTGGTGC |

**Tabla 3:**

Las mezclas de la reacción de PCR de la cadena ligera y pesada para la clonación de las secuencias de cDNA de la región variable de 38SB19.

| Mezcla de reacción de la cadena ligera                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Mezcla de reacción de la cadena pesada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 µl de tampón de reacción PCR 10 X (Roche)<br>4 µl de mezcla dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno)<br>2 µl Plantilla ( reacción a temperatura ambiente)<br>5 µl de cebador izquierdo Sac1MK 10 µM<br>5 µl de cebador derecho HindKL 10 µM<br><br>5 µl de DMSO<br>0,5 µl de Taq-Polimerasa (Roche)<br>23,5 µl de H <sub>2</sub> O destilada estéril<br>50 µl Total | 5 µl de tampón de reacción PCR 10 X (Roche)<br>4 µl de mezcla dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno)<br>2 µl Plantilla ( reacción a temperatura ambiente)<br>2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH1 10 µM<br>2,5 µl de cebador izquierdo EcoMH2 10 µM<br>5 µl de cebador derecho BamIlgG1 10 µM<br>5 µl de DMSO<br>0,5 µl de Taq-Polimerasa (Roche)<br>23,5 µl de H <sub>2</sub> O destilada estéril<br>50 µl Total |

**Tabla 4:**  
Los cebadores de la secuencia líder murina del extremo 5' utilizados para la segunda ronda de reacciones de PCR de 38SB19. Los cebadores del extremo 3' son idénticos a los utilizados en las reacciones de la primera ronda ya que ceban las secuencias respectivas de la región constante.

| Cebador                                              | Secuencia                        |
|------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Cadena Ligera<br>Líder 38SB19 LC<br>(SEQ ID NO. 79). | ATGGAGTCACAGATTCAGGTC            |
| Cadena Pesada<br>38-19HCLead1<br>(SEQ ID NO. 80).    | TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC |

**Tabla 5:**  
Los pesos moleculares del cDNA calculados y medidos por LC/MS de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino 38SB19.

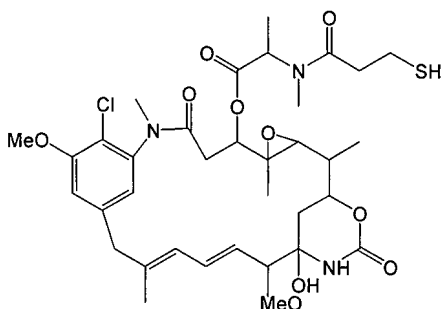
|          | Cadena Ligera |       |            | Cadena Pesada |       |            |
|----------|---------------|-------|------------|---------------|-------|------------|
|          | cDNA          | LC/MS | Diferencia | cDNA          | LC/MS | Diferencia |
| mu38SB19 | 23735         | 23736 | 1          | 48805         | 48826 | 21         |

## REIVINDICACIONES

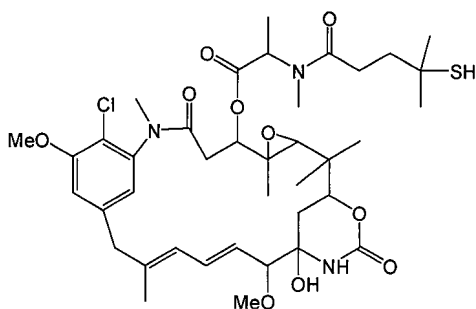
- 1) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada que se une específicamente a CD38, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada es capaz de destruir una célula CD38<sup>+</sup> por apoptosis, citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo (ADCC), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera, donde dicha cadena pesada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 13, 15 y posiciones 50 a 66 de SEQ ID NO:66, y donde dicha cadena ligera comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS: 16, 17, y 18.
- 2) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada es derivado del anticuerpo producido por una línea de células de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection (10801 University Bld, Manassas, VA, 20110-2209, USA), el 21 de junio de 2006, con el número de depósito PTA-7670.
- 3) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada comprende al menos una región constante humana.
- 4) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 3, caracterizado porque dicha región constante es la región constante IgG1/IgKappa humana.
- 5) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66.
- 6) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NOS: 62 y 64.
- 7) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada comprende una región variable de cadena ligera que tiene una

secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62; una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66.

- 8) Un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado o con la superficie modificada es un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fv.
- 9) Un conjugado que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, enlazado con un agente citotóxico.
- 10) El conjugado de la reivindicación 9, caracterizado porque dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, un fármaco pequeño, un derivado de tomaimicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065.
- 11) El conjugado de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de la fórmula:



- 12) El conjugado de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de la fórmula:



- 13) El conjugado de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho agente citotóxico es un derivado de tomaimicina seleccionado del grupo que consiste en:
  - 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
  - 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
  - 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-

5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-*terc*-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridindiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-3-*terc*-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[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)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- éster *terc*-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metilen-7-metoxi-5-oxo-1,3,,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[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-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[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-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrol[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-metilen-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-[2-[2-(2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[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)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].
- 14)** El conjugado de la reivindicación 10, caracterizado porque el agente citotóxico es un derivado de leptomicina seleccionado del grupo que consiste en:
- (2-metilsulfanil-etil)-amida del 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)-amida del 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-etil)-amida del 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)-amida del 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-metil-2-metildisulfanil-propil)-amida del 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)-amida del 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.
- 15)** Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo humanizado o con la superficie modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 16)** La composición farmacéutica de la reivindicación 15, caracterizada porque dicha composición contiene un agente terapéutico adicional.
- 17)** La composición farmacéutica de la reivindicación 16, caracterizada porque el agente terapéutico adicional es un antagonista del factor de crecimiento

epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante 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 tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heregulina, proteína estimulante de macrófagos (MSP), o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), incluyendo el receptor HER2, receptor HER3, c-MET, u otro receptor de tirosina-cinasas.

- 18) La composición farmacéutica de la reivindicación 16, caracterizada porque el agente terapéutico adicional es un anticuerpo dirigido frente a un antígeno de un conjunto de diferenciación seleccionado de un 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.

## Resumen

Anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos con superficie modificada, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos derivatizados, y conjugados de los mismos con agentes citotóxicos, que se unen específicamente a CD38, son capaces de destruir las células CD38<sup>+</sup> por apoptosis, citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo (ADCC), y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Dichos anticuerpos y fragmentos de los mismos se pueden usar en el tratamiento de tumores que expresan niveles elevados de proteína CD38, tales como mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, o leucemia linfocítica aguda, o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, y asma. Dichos anticuerpos derivatizados se pueden usar en la diagnosis y diagnóstico por imagen de tumores que expresan niveles elevados de CD38. También se proporcionan conjugados citotóxicos que comprenden un agente de unión a las células y un agente citotóxico, composiciones terapéuticas que comprenden el conjugado, métodos para usar los conjugados en la inhibición del crecimiento celular y en el tratamiento de la enfermedad, y un kit que comprende el conjugado citotóxico. En particular, el agente de unión a las células es un anticuerpo monoclonal, y los fragmentos de éste que se unen al epítipo, que reconoce y se une a la proteína CD38.

# CAVELIER

ABOGADOS  
EDIFICIO SISKI  
CARRERA 43 N° 72-35  
BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

170

ME-43

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

## REPRESENTACION Y PODER

## REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s) / I (we), the undersigned  
**SANOFI-AVENTIS**

14075  
7604

domiciliado(s) en/of **174, avenue de France**

**F-75013 París, Francia, hereby ratify the patent application No. 05.057,645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and**

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el artículo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first second or third alternates in their turn shall end at such time.

Además, confiero (conférimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mí (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the tutela, the protection of trade secrets, and in general civil, criminal and administrative suits relating to these rights, actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney with their own, whenever



promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney

Dado y firmado hoy/Given and signed this  
en/in  
por/by  
Firma  
Signature  
Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

Vu pour certification  
matérielle de la signature  
de M. Markus Jacobi  
apposée ci-dessous.

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française  
Le présent acte public
2. - a été signé par Mr. Koenig
3. - agissant en qualité de NOTAIRE
4. - est revêtu du sceau de Mr. Koenig

ATTESTE

5. - à Paris le 21 JUIN 2005
6. - Par le Procureur Général près la Cour d'Appel
7. - Sous N° 81902/2005
8. - Sceau

Le signature



CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)



Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :  
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations  
Brevets Europe

De la société sanofi-aventis,  
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français  
que la société est sise 174 avenue de France, 75013 PARIS, France  
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents  
correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris

Le 20 / 06 / 05

Le Notaire  
(signature - cachet)



**APOSTILLE**  
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

|    |                                  |                 |
|----|----------------------------------|-----------------|
| 1. | Pays :                           |                 |
| 2. | Le présent acte public           |                 |
| 3. | a été signé par                  |                 |
| 4. | agissant en qualité de           |                 |
|    | est revêtu du sceau/cachet de/du |                 |
|    | Attesté                          |                 |
| 5. | à                                | 6. le           |
| 7. | par                              |                 |
| 8. | N°                               |                 |
| 9. | Sceau/cachet :                   | 10. Signature : |





(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française

Le présent acte public

2. - a été signé par *M<sup>re</sup> K. K. K.*

3. - agissant en qualité de *Notaire*

4. - est revêtu du sceau de *Act. E. L. D. R.*

ATTESTE

5. - à Paris

le 21 JUIN 2005

7. - Par le Procureur G<sup>al</sup> près la Cour d'Appel

8. - Sous N° *71.203*

9. - Sceau

Le *[Signature]* *[Signature]*

Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLÉS, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

### LEGALIZACIONES

Escritas en FRANCES, al pie de un PODER escrito en ESPAÑOL, otorgado por SANOFI- AVENTIS, a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por EMILIO FERRERO el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)  
Dr. Markus Jacobi  
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.

(Firma Ilegible)  
.L. ASSOCIES  
Notarios  
20, rue de la Paix  
75002 PARIS

Sello del Notario

### CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente de:

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario  
(Firma - sello)

MARIA EUGENIA SANINT  
TRAD. OFICIAL  
RESOL. 171-815  
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT  
TRAD. OFICIAL  
RECIBI EL  
5 DE JUN. DE 2005  
del Ministerio de Justicia



(Ilegible)  
Alain Koenig  
NOTARIO  
20, rue de la Paix, París

**APOSTILLA**  
**(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961).**

1. País: República Francesa  
El presente Documento Público
2. Fue firmado por el Abogado Koenig
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO
4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

5. En París
6. El 21 de junio de 2005

7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia
8. Bajo el Número 81903
9. Sello/Estampilla:



Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.

- 10- Firma: (Ilegible)

**ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA.**

Traductora : Maria Eugenia Sanint  
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT  
TRADUCTORA OFICIAL  
BOGOTÁ, 8 DE JULIO DE 2005  
EN PRESENCIA DE...

*Maria Eugenia Sanint*  
TRADUCTORA OFICIAL  
BOGOTÁ, 8 DE JULIO DE 2005  
del Ministerio de Justicia

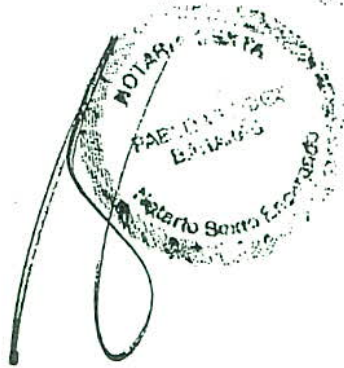
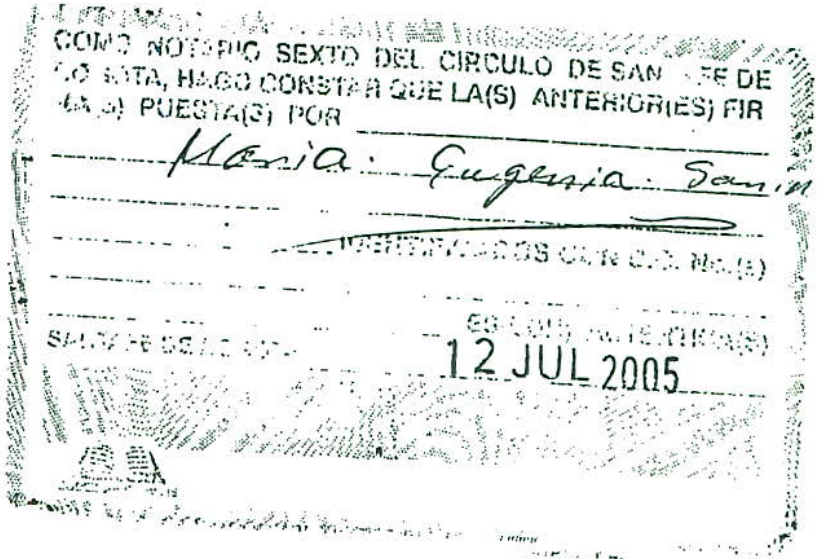
NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUL 12 P 1:28

*ucs*  
JEFE DE LEGALIZACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

449243  
*Maria Fernanda Casas Coll*  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS



# CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com  
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611  
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : SANOFI-AVENTIS

Poder conferido el : 20/06/2005

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

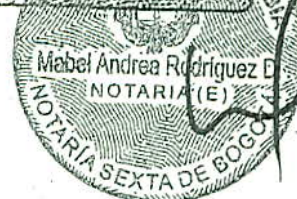
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

  
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



**NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ**  
**RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL**  
 Bogotá, D.C. **22 OCT 2009**  
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,  
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE  
 BOGOTÁ, D.C.  
 Compareció(s) *Emilio Ferrero*  
*Williamson y los Clemente*  
*Sober de Paz*  
 Quien(es) exhibió(ron) la(s) C.C.  
 CC 438019 TP 31929  
 CC 35456344 TP 23555  
 Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que se reco(n)  
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y  
 que el contenido del mismo es cierto.  
 En constancia se firma esta diligencia.

*Emilio Ferrero*  
*Los Clemente Sober*



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

|                                                                                                                                      |                       |                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0062687</b>                  |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Junio 26 de 2013 - 08:14:32 |

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 196847652 | 25/06/2013 | 26.925.000.00 |

|                           |                                                              |                |              |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|--------------|
| *** Conceptos Pagados *** |                                                              |                |              |
| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                                                     | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE | 450.000.00     | 450.000.00   |
|                           |                                                              |                | \$450.000.00 |
| =====                     |                                                              |                |              |

SON: \*\*CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_  
\_\*\*\*\*\*\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
**No. 09-039181- -00019-0000**  
Fecha: 2013-07-08 16:39:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 101

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
**No. 13-161588- -00000-0000**  
Fecha: 2013-07-08 16:39:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101

COLO: 14775-841-181-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

|                                                                                                                                      |                       |                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0067101</b>                  |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Julio 08 de 2013 - 10:21:24 |

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

| *** Soporte del Pago *** |           |        |            |            |            |
|--------------------------|-----------|--------|------------|------------|------------|
| TIPO PAGO                | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR. PAGO   |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 59895  | 18/06/2013 |            | 175.000.00 |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 59896  | 18/06/2013 |            | 175.000.00 |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 59906  | 18/06/2013 |            | 450.000.00 |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 62682  | 26/06/2013 |            | 270.000.00 |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 62726  | 26/06/2013 |            | 60.000.00  |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 62732  | 26/06/2013 |            | 5.000.00   |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 62733  | 26/06/2013 |            | 5.000.00   |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 65459  | 03/07/2013 |            | 15.000.00  |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 65460  | 03/07/2013 |            | 15.000.00  |

| *** Conceptos Pagados *** |                                                              |              |             |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                                                     | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO |
| 8 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00    | 240.000.00  |

SON: \*\*DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRI

Responsable: \_\_\_\_\_  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 09-039181- -00019-0000**

Fecha: 2013-07-08 16:39:04    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 851 DIVISIONAL    Folios: 101

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



**No. 13-161588- -00000-0000**

Fecha: 2013-07-08 16:39:04    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION    Folios: 101

COLO: 14775-841-181-2