



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2238168 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.03
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.11
(86)	Europeisk søknadsnr	08863602.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.23
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.10.13
(30)	Prioritet	2007.12.26, US, 16630 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Biotest AG, Landsteinerstr. 5, 63303 Dreieich, DE-Tyskland
(72)	Oppfinner	KRAUS, Elmar, Bahnhofstrasse 51 A, 61118 Bad Vilbel, DE-Tyskland BRUECHER, Christoph, Unter den Tannen 3a, 65760 Eschborn, DE-Tyskland DAELKEN, Benjamin, Eleonore-Sterling-Strasse 40, 60433 Frankfurt am Main, DE-Tyskland GERMER, Matthias, Theodor-Heuss-Strasse 1, 63225 Langen, DE-Tyskland ZENG, Steffen, Albert Einstein Strasse 13, 64839 Muenster, DE-Tyskland OSTERROTH, Frank, Konrad-Adenauer-Allee 22, 63128 Dietzenbach, DE-Tyskland UHEREK, Christoph, Lachenwoerthsweg 6, 63500 Seligenstadt, DE-Tyskland AIGNER, Silke, An der kurzen Gewanne 24, 67227 Frankenthal, DE-Tyskland SCHULZ, Gregor, Rosenstrasse 13, 79224 Umkirch, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	MIDDEL MÅLRETTET MOT CD138 OG ANVENDELSER DERAU
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2007/066109 US-A1- 2005 272 128 US-A1- 2007 183 971 TASSONE PIERFRANCESCO ET AL: "Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells." BLOOD 1 DEC 2004, vol. 104, no. 12, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 3688-3696, XP002521112 ISSN: 0006-4971

MIDDEL MÅLRETTET MOT CD138 OG ANVENDELSER DERAU**KRYSSHENVISNING TIL RELATERTE SØKNADER**

5 Denne søknaden krever prioritet fra den midlertidige US-søknad 61/016,630, innlevert 26. desember 2007.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

10 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører forbedrede målrettede midler for antigenet CD138 så vel som sammensetninger som omfatter de målrettede midlene og fremgangsmåtene for deres anvendelse.

BAKGRUNN

15 CD138, som virker som en reseptor for den ekstracellulære matriks, blir overuttrykt på multippelt myelom-celler (MM-celler) og er vist å påvirke utviklingen og/eller proliferasjonen av MM-celler. CD138 blir også uttrykt på celler i eggstokkarsinom, nyrekarsinom, galleblærekarsinom, brystkarsinom, prostatakreft, lungekreft, kolonkarsinom-celler og celler i Hodgkins og ikke-Hodgkins lymfom, kronisk lymfatisk leukemi (CLL) for å nevne bare noen få.

20 Av praktiske hensyn henvises det til publikasjoner og annet materiale, inkludert patenter, heri, ved forfatter og dato i etterfølgende tekst og/eller alfabetisk etter forfatter i den vedlagte bibliografi.

25 Tassone et al. (2004) har rapportert utmerket binding av det murine IgG1-antistoff B-B4 til CD138-antigen som blir uttrykt på overflaten av MM-celler. Tassone rapporterte også høy cytotoksisk aktivitet av immunkonjugatet B-B4-DM1, som omfatter mytansinoidet DM1 som et effektormolekyl, mot flere myelomceller (se også US-patentsøknad 20070183971).

30 Det er fremdeles behov for et målrettet middel, spesielt et målrettet antistoff basert på B-B4, som er uten visse egenskaper og/eller funksjoner som er relatert til B-B4. Et slikt målrettet antistoff kan omfatte én eller flere antistoffregioner av et humant antistoff. Det er spesielt behov for et kimerisert antistoff basert på B-B4, som binder CD138 like effektivt som B-B4, men som

kan administreres til mennesker uten signifikante bivirkninger. Det er også fremdeles behov for et målrettet middel som har en bindingsaffinitet som overskrider bindingsaffiniteten til B-B4. Det er også behov for et slikt B-B4-basert, målrettet middel som oppviser én eller flere fordelaktige egenskaper i forhold til dets murine motstykke. De egenskapene omfatter forbedret antigenbinding, spesielt av CD138-uttrykkende tumorceller og celler som medvirker til dette, eller mer homogen binding.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et immunkonjugat som omfatter et konstruert, målrettet antistoff som gjenkjenner CD138, og et effektormolekyl for indusering av celledød, hvori det konstruerte, målrettede antistoff omfatter en tungkjede som har minst 90 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 1, og en lettkjede som har minst 90 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 2, hvori (a) tungkjeden omfatter aminosyrerestene 31 til 35(CDR1). 51 til 68 (CDR2) og 99 til 111 (CDR3) av SEQ ID NO:1, og (b) lettkjeden omfatter aminosyrerestene 24 til 34 (CDR1), 50 til 56 (CDR2) og 89 til 97 (CDR3) av SEQ ID NO:2, og hvori det konstruerte, målrettede antistoff er av en IgG4-isotype.

Det konstruerte, målrettede antistoff i immunkonjugatet kan videre omfatte aminosyrerestene 123 til 448 av SEQ ID NO: 1, og mutasjoner derav som (i) opprettholder eller reduserer den antistoffavhengige cytotoxiskitet og/eller komplementavhengige cytotoxiskitet av det konstruerte, målrettede antistoff, og/eller (ii) stabiliserer det konstruerte, målrettede antistoff. Det er mer foretrukket (a) at tungkjeden har minst 95 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 1; og (b) lettkjeden har minst 95 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 2.

Det konstruerte, målrettede antistoff i immunkonjugatet kan være et kimært humant/muse-antistoff.

Det konstruerte, målrettede antistoff i immunkonjugatet kan omfatte en tungkjede som har SEQ ID NO: 1 og en lettkjede som har SEQ ID NO: 2.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre en farmasøytisk sammensetning som omfatter immunkonjugatet som er beskrevet ovenfor, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Videre tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen immunkonjugatet som er beskrevet ovenfor, for bruk i medisin, og spesielt immunkonjugatet for bruk i en behandling rettet mot tumorceller, hvori det konstruerte, målrettede antistoff i

5 immunkonjugatet binder CD138 som er uttrykt på CD138-uttrykkende celler.

Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for homogen binding til CD138 som omfatter:

10 tilveiebringning av et konstruert, målrettet antistoff, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet omfatter

en antigenbindende region mot CD138, hvori den antigenbindende regionen er av et ikke-humant antistoff, og

en ytterligere antistoffregion, hvori minst en del av den ytterligere antistoffregionen er av et humant antistoff, og

15 administrering av det konstruerte, målrettede antistoffet til CD138-uttrykkende celler,

hvori det konstruerte, målrettede antistoffet homogent binder CD138 som er uttrykt på de CD138-uttrykkende cellene.

20 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også et isolert polypeptid som omfatter en aminosyresekvens av tungkjeden eller en del derav, hvori immunglobulin-tungkjeden eller del derav har minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:1, hvori et målrettet middel som omfatter immunglobulin-tungkjeden eller del derav, er

25 rettet mot CD138.

Nevnte immunglobulin-tungkjede eller del derav kan ha minst 80 %, minst 85 %, minst 90 %, minst 95 % sekvensidentitet med restene 31 til 35, restene 51 til 68 og restene 99 til 111 av SEQ ID NO:1 og det målrettede middelet kan

30 være et konstruert, målrettet antistoff.

En konstant region av immunglobulin-tungkjeden eller delen derav kan være en IgG4-isotype konstant region.

35 Det målrettede middelet kan være et kimært humant/muse-antistoff.

Det målrettede middelet eller det konstruerte, målrettede antistoffet kan være et humanisert antistoff.

- 5 Det isolerte polypeptidet kan videre omfatte en aminosyresekvens av en immunglobulin-lettkjede eller del derav, hvori immunglobulin-lettkjeden eller del derav kan ha minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:2.
- 10 Det isolerte polypeptidet kan videre omfatte en aminosyresekvens av en immunglobulin-lettkjede eller del derav, hvori immunglobulin-lettkjeden eller del derav har minst 75 %, minst 85 %, minst 95 % eller minst 97 % sekvensidentitet med restene 24 til 34, restene 50 til 56 og restene 89 til 97 av SEQ ID NO:2.
- 15 Immunglobulin-tungkjeden kan være identisk med sekvensen av SEQ ID NO:1.
- Immunglobulin-lettkjeden kan være identisk med sekvensen av SEQ ID NO:2.
- 20 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også et konstruert, målrettet antistoff som gjenkjenner CD138 og som omfatter en antigenbindende region mot CD138, hvori den antigenbindende regionen er av et ikke-humant antistoff, og en ytterligere antistoffregion, hvori minst en del av den ytterligere antistoffregionen er av et ikke-humant antistoff, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet
- 25 (a) binder CD138 med en bindingsaffinitet som overskrider bindingsaffiniteten til det ikke-humane antistoffet; og/eller (b) tilveiebringer homogen binding til CD138 på CD138-uttrykkende celler.
- 30 Den ytterligere antistoffregionen kan være minst én konstant region som omfatter en konstant tungkjederegion eller en del derav, som er av et humant antistoff, og hvori det konstruerte antistoffet er av en IgG4-isotype.
- 35 Det konstruerte, målrettede antistoffet kan være et kimært antistoff, og det ikke-humane antistoffet kan være B-B4.

Det konstruerte, målrettede antistoffet kan være et humanisert antistoff, og det ikke-humane antistoffet kan være B-B4.

5 Tungkjeden kan ha minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:1.

10 Det konstruerte, målrettede antistoffet kan omfatte minst én lettkjede, hvori lettkjeden har minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:2.

15 Tungkjeden kan ha minst 80 %, minst 85 %, minst 90 %, minst 95 % eller 100 % sekvensidentitet med restene 31 til 35, restene 51 til 68 og/eller restene 99 til 111 av SEQ ID NO:1. Lettkjeden kan ha minst 75 %, minst 85 %, minst 95 %, minst 97 % eller 100 % sekvensidentitet med restene 24 til 34, restene 50 til 56 og/eller restene 89 til 97 av SEQ ID NO:2.

Den ytterligere antistoffregionen kan omfatte:

20 (a) aminosyrerestene 123 til 448 av SEQ ID NO: 1, og/eller
(b) aminosyrerestene 108 til 214 av SEQ ID NO: 2, respektivt og mutasjoner derav som opprettholder eller reduserer den antistoffavhengige cytotoxisitet og/eller komplementavhengige cytotoxisitet av de konstruerte, målrettede antistoff-mutasjonene derav, som og/eller stabiliserer det konstruerte, målrettede antistoffet.

25

Den ytterligere antistoffregionen kan være en konstant tung region av et humant antistoff.

30 Det konstruerte, målrettede antistoffet kan binde CD138 med en målvariasjon på mindre enn 150 %, 140 %, 130 %, 120 %, 110 %, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % eller 50 %.

35 Tungkjeden kan ha minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:1.

Det konstruerte, målrettede antistoffet kan omfatte minst én lett kjede, hvori lett kjeden har minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 % eller minst 98 % sekvensidentitet med SEQ ID NO:2.

5 Tungkjeden kan ha minst 80%, minst 85%, minst 90%, minst 95% sekvensidentitet med restene 31 til 35, restene 51 til 68 og restene 99 til 111 av SEQ ID NO:1.

10 Tungkjeden kan ha minst 75%, minst 85%, minst 95% eller minst 97% sekvensidentitet med restene 24 til 34, restene 50 til 56 og restene 89 til 97 av SEQ ID NO:2.

15 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også en farmasøytisk sammensetning som omfatter eller består hovedsakelig av det konstruerte, målrettede antistoffet og en farmasøytisk akseptabelt bærer.

Et hybridom som produserer den konstruerte målrettingen er også en del av den foreliggende beskrivelsen.

20 Den foreliggende beskrivelsen omfatter også en antistoffbasert analyse som omfatter det konstruerte, målrettede antistoffet.

25 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også det konstruerte, målrettede antistoffet som er beskrevet her, for anvendelse i medisin. Spesielt omfatter det konstruerte, målrettede antistoffet:

en antigenbindende region mot CD138, hvori den antigenbindende regionen er av et ikke-humant antistoff, og

en ytterligere antistoffregion, hvori minst en del av den ytterligere antistoffregionen er av et humant antistoff.

30

Mer spesielt er det konstruerte, målrettede antistoffet for anvendelse i en behandling målrettet mot tumorceller.

35 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også anvendelsen av det konstruerte, målrettede antistoff som er beskrevet her, for fremstillingen av et

medikament målrettet mot tumorceller. Spesielt omfatter det konstruerte, målrettede antistoffet:

en antigenbindende region mot CD138, hvori den antigenbindende regionen er av et ikke-humant antistoff, og

5 en ytterligere antistoffregion, hvori minst en del av den ytterligere antistoffregionen er av et humant antistoff.

10 I disse medisinske anvendelsene skal mer spesielt det konstruerte, målrettede antistoffet administreres til et individ med CD138-uttrykkende celler. Videre er det konstruerte, målrettede antistoffet i stand til homogen binding av CD138 som er uttrykt på de CD138-uttrykkende cellene.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

15 **FIG. 1** tilveiebringer en skjematisk fremstilling av nBT062 som har effektormolekyler tilknyttet.

FIG. 2 er en kjemisk fremstilling av BT062.

FIG. 3 viser omdannelsen av ansamitocin P-3 til maytansinol (stereokjemi er for enkelhetens skyld utelatt).

20 **FIG. 4** viser et representativt synteseskjema for DM4.

FIG. 5 er en skjematisk fremstilling av en antistoffkonjugasjon (nBT062 til DM4).

25 **FIG. 6** viser en analyse av bindingen av nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 og nBT062-antistoff til OPM-2-celler. Forskjellige konsentrasjoner av nBT062 og konjugater ble gitt til cellene, og gjennomsnittlig fluorescens ble målt ved FACS-analyse.

30 **FIG. 7(A)-(D)** viser *in vitro* cytotoksisitet av nBT062-DMx-konjugater mot MOLP-8 (CD138⁺) og BJAB (CD138⁻)-celler. Cellene ble dyrket i flatbunnede plater og ble inkubert med de angitte konsentrasjoner av immunkonjugater i 5 døgn. WST-reagens ble tilsatt i ytterligere 3 timer for å vurdere cellenes levedyktighet. I (D) ble cytotoksisk aktivitet av nBT062-SPDB-DM4 analysert i nærvær eller fravær av blokkerende antistoff (1 µM nBT062).

FIG. 8 viser tumorvolum for individuelle mus som var behandlet med (A) PBS, (B) nBT062-antistoff, (C) fritt DM4 eller (D) ikke-målrettet konjugat huC242-DM4 over tid (døgn) etter inokulering med MOLP-8 tumorceller.

5 **FIG. 9** viser tumorvolum for individuelle mus som var behandlet med (A) PBS, (B) nBT062-SPDB-DM4, (C) B-B4-SPP-DM1 eller (D) nBT062-SPP-DM1 over tid (døgn) etter inokulering med MOLP-8 tumorceller.

FIG. 10 viser gjennomsnittlig tumorvolum (+/- SD) av MOLP-8 multippelt myelom-xenografts hos CB.17 SCID-mus over tid (døgn) etter inokulering.

10 **FIG. 11A og B** viser anti-tumor-aktiviteten til nBT062-DMx mot CD138⁺ MOLP-8 tumorceller i en omfattende MOLP-8 tumormodell med SCID-mus. Tumorvolum er oppgitt som gjennomsnitt (+/- SD) for hver gruppe.

DETALJERT BESKRIVELSE AV FORSKJELLIGE OG FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER

15

Den foreliggende beskrivelsen vedrører målrettede midler, spesielt CD138-
rettede antistoffer, mer spesielt konstruerte, CD138-rettede antistoffer.
Immunkonjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter de
konstruerte, CD138-rettede antistoffene som muliggjør avlevering av
20 effektormolekylet/ene til målsteder og den stedsspesifikke frisetting av
effektormolekylet/ene i, på eller nær målceller, -vev og -organer.
Effektormolekylene kan bli aktivert ved spalting/dissosiasjon fra den målrettede
middel-delen av immunkonjugatet ved målstedet.

25

Antistoffene og/eller immunkonjugatene som omfatter samme, kan
administreres til en pasient som har behov for terapeutisk behandling, eller til
celler som er isolert fra en slik pasient som har behov for terapeutisk
behandling. Effektormolekylet eller -molekylene kan frisettes fra
immunkonjugatet ved spalting/dissosiasjon i, på eller nær målcellen, -vevet eller
30 -organet.

35

Som ett eksempel kan antistoffet nBT062 anvendes i en kromografisk analyse.
Formalinfiksert, parafininnstøpt vev fra en pasient blir tilveiebrakt. Antistoffet
nBT062 blir tilsatt som et primært antistoff, og overflateuttrykt CD138 på vevet
binder antistoffet. Et detekterende antistoff blir tilsatt for å binde nBT062. I et

siste trinn blir denne bindingen av det detekterende antistoffet, som omfatter et kromogen, bestemt. Antistoffet nBT062 blir brukt for å identifisere humane plasmocytter blant hemopoietiske celler og muliggjør derved diagnostisering av en rekke hematologiske maligniteter. Fremgangsmåten gjør det også mulig å følge progresjonen av visse karsinomer. En reduksjon av uspesifikk deteksjon på grunn av redusert kryssreaktivitet med Fc-reseptorer er observert når nBT062 benyttes, i motsetning til sitt murine motstykke.

Som et annet eksempel blir nBT062-antistoffet og et immunkonjugat som omfatter antistoffet nBT062 og minst ett svært cytotoxisk legemiddel eller et immuntoksin som et effektormolekyl, tilveiebrakt og administrert til en pasient med kreft. I dette eksemplet beskytter en effektiv mengde av nBT062 CD138-uttrykkende ikke-tumorceller mot en terapeutisk effektiv mengde av immunkonjugatet som senere blir administrert intravenøst til en pasient slik at det blir konsentrert i de cancerøse cellene. Effektormolekylet eller -molekylene frisettes fra antistoffmålet ved bruk av eksterne midler, for å indusere celledød eller kontinuerlig cellesyklusstans i kreftcellene.

CD138 eller syndecan-1 (også beskrevet som SYND1; SYNDECAN; SDC; SCD1; CD138 ANTIGEN, SwissProt tilgangsnummer: P18827 human) er et membranglykoprotein som opprinnelig ble beskrevet å foreligge på celler av epitelial opprinnelse og som senere ble funnet på hematopoietiske celler (Sanderson, 1989). CD138 har et langt ekstracellulært domene som bindes til løselige molekyler (f.eks. vekstfaktorene EGF, FGF, HGF) og til uløselige molekyler (f.eks. til ekstracellulær matriks-komponentene kollagen og fibronectin) gjennom heparansulfatkjeder (Langford, 1998; Yang, 2007) og virker som en reseptor for den ekstracellulære matriks. CD138 medierer også celle til celle-adhesjon gjennom heparinbindende molekyler som blir uttrykt av adherente celler. Det er vist at CD138 har en rolle som en koreseptor for vekstfaktorer for myelomceller (Bisping, 2006). Studier av plasmacelledifferensiering viste at CD138 også må betraktes som et differensieringsantigen (Bataille, 2006).

Ved malign hematopoiese blir CD138 kraftig uttrykt på de fleste MM-celler, eggstokkarsinom-, nyrekarsinom-, galleblærekarsinom-, brystkarsinom-, prostatakraft-, lungekreft-, kolonkarsinomceller og celler fra Hodgkins og ikke-Hodgkins lymfomer, kronisk lymfatisk leukemi (CLL) (Horvathova, 1995), akutt

lymfoblastisk leukemi (ALL), akutt myeloblastisk leukemi (AML) (Seftalioglu, 2003 (a); Seftalioglu, 2003 (b)), fastvevsarkomer, kolonkarsinomer samt andre hematologiske maligniteter og faste tumorer som uttrykker CD138 (Carbone et al., 1999; Sebestyen et al., 1999; Han et al., 2004; Charnaux et al., 2004; O'Connell et al., 2004; Orosz og Kopper, 2001).

Andre krefttyper som er påvist å være positive for CD138-ekspresjon, er mange eggstokk-adenokarsinomer, overgangscelle-blærekarsinomer, clear cell-nyrekarsinomer, plateepitelcelle-lungekarsinomer; brystkarsinomer og livmorkrefttyper (se for eksempel, Davies et al., 2004; Barbareschi et al., 2003; Mennerich et al., 2004; Anttonen et al., 2001; Wijdenes, 2002).

I det normale humane hematopoietiske kompartment er CD138-ekspresjon begrenset til plasmaceller (Wijdenes, 1996; Chilosì, 1999), og CD138 blir ikke uttrykt på perifere blodlymfocytter, monocytter, granulocytter og røde blodceller. Spesielt CD34⁺ stam- og progenitorceller uttrykker ikke CD138, og anti-CD138 mAbs påvirker ikke antallet kolonidannende enheter i hematopoietiske stamcellekulturer (Wijdenes, 1996). I ikke-hematopoietiske kamre blir CD138 hovedsakelig uttrykt på enkelt og stratifisert epitel i lunge, lever, hud, nyre og tarm. Kun svak farging ble sett på endotelceller (Bernfield, 1992; Vooijs, 1996). Det er rapportert at CD138 foreligger i polymorfe former i humane lymfomceller (Gattei, 1999).

Monoklonale antistoffer B-B4, BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2, og spesielt B-B4, er rapportert å være spesifikke for CD138. Av disse gjenkjente B-B4, 1D4 og MI15 både det intakte molekylet og kjerneproteinet til CD138 og ble påvist å gjenkjenne enten de samme eller nært beslektede epitopene (Gattei, 1999). Fra tidligere studier er det rapportert at B-B4 ikke gjenkjente løselig CD138, men kun CD138 i membranbundet form (Wijdenes, 2002).

B-B4, en murin IgG1 mAb, bindes til en lineær epitope mellom restene 90-95 på kjerneproteinet til human syndecan-1 (CD138) (Wijdenes, 1996; Dore, 1998). I samsvar med ekspresjonsmønsteret til CD138, ble det vist at B-B4 reagerer kraftig med plasmacellelinje RPMI8226, men ikke reagerer med endotelceller. Det er også i samsvar med ekspresjonsmønsteret til CD138, at B-B4 også reagerte med epitelcellelinjer A431 (keratinocyttderivert) og HepG2

(hepatocyttderivert). Immuntoksinet B-B4-saporin var også svært toksisk mot plasmacellelinjen RPMI8226, faktisk betraktelig mer toksisk enn fritt saporin. På bakgrunn av de to testede epitelcellelinjene oppviste imidlertid B-B4-saporin toksisitet kun mot cellelinje A431, selv om B-B4-saporin i en klonogen analyse ikke viste noen hemmende effekt på utvekst av A431-celler (Vooijs, 1996). Andre forskere har rapportert manglende spesifisitet av MM-assosierte antigener mot tumorer (Couturier, 1999).

Et antistoff "som består hovedsakelig av" visse komponenter betyr i sammenheng med foreliggende beskrivelse at antistoffet består av de spesifiserte komponenter og eventuelt ytterligere materialer eller komponenter som ikke materielt påvirker de grunnleggende karakteristika til antistoffet.

IDen foreliggende oppfinnelse benytter betegnelsen "tumorcelle" slik at det omfatter kreftceller så vel som precancerøse celler som eventuelt kan utgjøre en del av en fast tumor.

Et "målrettet middel" ifølge den foreliggende beskrivelsen er i stand til å forenes med et molekyl som blir uttrykt av en målcelle, og omfatter peptider og ikke-peptider. Målrettede midler omfatter spesielt målrettede antistoffer og ikke-immunglobulin målrettede molekyler, som kan være basert på ikke-immunglobulin-proteiner, inkludert, men ikke begrenset til, AFFILIN®-molekyler, ANTICALINS® og AFFIBODIES®. Ikke-immunglobulin-målrettede molekyler omfatter også ikke-peptidiske, målrettede molekyler som målrettede DNA- og RNA-oligonukleotider (aptamerer), men også fysiologiske ligander, spesielt ligander av det aktuelle antigenet, som CD138.

Et "målrettet antistoff" er eller er basert på et naturlig antistoff eller er fremstilt syntetisk eller ved genetisk konstruksjon og bindes til et antigen på en celle eller celler (målcelle(r)) av interesse. Et målrettet antistoff omfatter et monoklonalt antistoff, et polyklonalt antistoff, et multispesifikt antistoff (for eksempel et bispesifikt antistoff), eller et antistoffragment. Det målrettede antistoffet kan være konstruert for eksempel for å forbedre dets affinitet for målcellene (Ross, 2003) eller minske dets immunogenitet. Det målrettede antistoffet kan være tilføyd en liposomal formulering som omfatter effektormolekyler (Carter, 2003). Et antistoffragment omfatter en del av et intakt antistoff, fortrinnsvis den antigenbindende eller variable region av det intakte antistoffet. Eksempler på

antistoff-fragmenter omfatter Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter, men også diastoffer; domene-antistoffer (dAb) (Ward, 1989; US-patent 6.005.079); lineære antistoffer; enkeltkjedede antistoffmolekyler; og multispesifikke antistoffer dannet fra antistoff-fragmenter. I et enkeltkjedet variabelt fragment-antistoff (scFv) kan de tunge og lette kjeder (VH og VL) være koblet av en kort aminosyrekobler som har for eksempel sekvensen (glysin₄serin)_n og som har tilstrekkelig fleksibilitet til at de to domenene samles til en funksjonell antigenbindende lomme. Addisjon av forskjellige signalsekvenser kan muliggjøre mer presis målretting av det målrettede antistoff. Addisjon i lettkjedens konstante region (CL) kan muliggjøre dimerisering via disulfidbindinger, hvilket gir økt stabilitet og aviditet. Variable regioner for konstruksjon av scFv kan, dersom en mAb mot et interessant mål er tilgjengelig, oppnås med RT-PCR som kloner ut de variable regionene fra mRNA ekstrahert fra det opprinnelige hybridom. Alternativt kan scFv genereres de novo ved phage display-teknologi (Smith, 2001). Slik den er brukt her skal betegnelsen "funksjonelt fragment" ved henvisning til et målrettet antistoff, vise til en del av det målrettede antistoffet som er i stand til spesifikk binding av et antigen som er spesifikt bundet av antistoffet henvisningen gjelder. Et bispesifikt antistoff kan for eksempel ha minst én gruppe som er reaktiv mot et målvev, og én gruppe som er reaktiv mot en koblergruppe (US-patentsøknad 20020006379). Et bispesifikt antistoff kan også bindes til flere enn ett antigen på en målcelle (Carter, 2003). Et antistoff kan være modifisert ved for eksempel innføring av cysteinrester for å innføre tiolgrupper (Olafsen, 2004).

Det målrettede antistoffet kan være avledet fra en hvilken som helst kilde og kan være, men er ikke begrenset til, et kamel-antistoff, et murint antistoff, et kimært humant/muse-antistoff eller et kimært humant/ape-antistoff, spesielt et kimært humant/muse-antistoff som nBT062.

Humaniserte antistoffer er antistoffer som inneholder sekvenser som er derivert fra et humant antistoff og fra et ikke-humant antistoff. Egnede fremgangsmåter for humanisering av antistoffer omfatter CDR-grafting ("complementarity determining region grafting") (EP 0 239 400; WO 91/09967; US-patenter 5,530,101; og 5,585,089), "veneering" eller overflatemodifisering (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 199; Studnicka et al., 1994; Roguska et al., 1994), kjedebytting ("shuffling") (US-patent 5,565,332) og Delimmunisation (Biovation, LTD). Ved CDR-grafting blir muse-CDRs (complementarity-determining regions)

fra for eksempel mAb B-B4, graftet til humane variable strukturer ("frameworks"), som deretter blir koblet til humane konstante regioner, for å skape et humant B-B4-antistoff (hB-B4). Flere antistoffer som er humanisert ved CDR-grafting, er nå i klinisk bruk, inkludert MYLOTARG (Sievers et al., 2001) og HECEPTIN (Pegram et al, 1998).

Ved overflatemodifiseringsteknologi anvendes en kombinasjon av molekylmodellering, statistisk analyse og mutagenese for å endre ikke-CDR-overflatene av antistoffets variable regioner slik at de ligner overflatene til kjente antistoffer hos målverten. Strategier og fremgangsmåter for overflatemodifisering av antistoffer, og andre fremgangsmåter for å redusere immunogeniteten av antistoffer i en annen vert, er beskrevet i for eksempel US-patent 5,639,641. Humane antistoffer kan fremstilles ved en rekke fremgangsmåter som er kjente innen faget, inkludert phage display-fremgangsmåter. Se også US-patenter 4,444,887, 4.716.111, 5.545.806, og 5.814.318; og publiserte internasjonale patentsøknader WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, og WO 91/10741.

Målrettede antistoffer som har gjennomgått en hvilken som helst ikke-naturlig modifisering, som kimære humane/muse-antistoffer eller kimære humane/ape-antistoffer, humaniserte antistoffer eller antistoffer som ble konstruert for eksempel for å forbedre deres affinitet for målcellene eller for å minske deres immunogenitet, men også antistoffragmenter, spesielt funksjonelle fragmenter av slike målrettede antistoffer som har gjennomgått en hvilken som helst ikke-naturlig modifisering, diastoffer; domene-antistoffer; lineære antistoffer; enkeltkjedede antistoffmolekyler; og multispesifikke antistoffer er her kalt **konstruerte, målrettede antistoffer**.

Kimeriserte antistoffer beholder den antistoffbindende region (ABR- eller Fab-region) av det ikke-humane antistoffet, f.eks. det murine antistoffet de er basert på, mens eventuelle konstante regioner tilveiebringes av f.eks. et humant antistoff. Generelt vil kimerisering og/eller endringen av konstante regioner i et antistoff ikke påvirke affiniteten til antistoffet fordi regionene i antistoffet som bidrar til antigenbinding, ikke blir påvirket av denne endringen. I en foretrukket utførelsesform kan det konstruerte, spesielt kimeriserte, antistoffet ha en høyere bindingsaffinitet (uttrykt som K_D -verdier) enn det respektive ikke-humane

antistoffet det er basert på. Spesielt kan nBT062-antistoffet og antistoffer basert på dette, ha høyere antistoffaffinitet enn det murine B-B4. I en annen foretrukket utførelsesform oppviser immunkonjugater som omfatter disse konstruerte/kimeriserte antistoffene, også denne høyere antistoffaffiniteten.

5 Disse immunkonjugatene kan i visse utførelsesformer også oppvise andre fordelaktige egenskaper, som en høyere reduksjon av tumorbelastning enn deres B-B4-holdige motstykker. I en foretrukket utførelsesform, oppviser de konstruerte, spesielt kimeriserte, målrettede antistoffer bindingsaffiniteter som er karakterisert ved dissosiasjonskonstanter K_D (nM) som er mindre enn 1,6, 10 mindre enn 1,5, eller som er omtrent eller mindre enn 1,4, mens deres murine motstykker er karakterisert ved dissosiasjonskonstanter K_D (nM) som er omtrent eller høyere enn 1,6. Immunkonjugater som omfatter målrettede midler, som målrettede antistoffer, kan være karakterisert ved dissosiasjonskonstanter K_D (nM) som er mindre enn 2,6, mindre enn 2,5, mindre enn 2,4, mindre enn 2,3, 15 mindre enn 2,2, mindre enn 2,1, mindre enn 2,0, mindre enn eller ca. 1,9 er foretrukket, mens immunkonjugater som omfatter antistoffer som er murine motstykker, kan være karakterisert ved dissosiasjonskonstanter K_D (nM) som er omtrent eller høyere enn 2,6 (sammenlign Tabell 3, Materialer og fremgangsmåter).

20 Fullstendig humane antistoffer kan også anvendes. Disse antistoffene kan være utvalgt ved phage display-fremgangsmåten, hvor CD138 eller en antigendeterminant derav blir brukt for å selektivt binde phage-ekspresjon, for eksempel B-B4 variable regioner (se Krebs, 2001). Denne fremgangsmåten kan 25 med fordel kombineres med en affinitetsmaturingsteknikk for å forbedre antistoffets affinitet. Alle antistoffer det henvises til her, er isolerte antistoffer.

I én utførelsesform er det målrettede antistoffet, i dets ukonjugerte form, moderat eller dårlig internalisert. Moderat internalisering innebærer ca. 30 % til 30 ca. 75 % internalisering av antistoff, dårlig internalisering innebærer ca. 0,01 % til opptil ca. 30 % internalisering etter 3 timers inkubering ved 37 °C. I en annen foretrukket utførelsesform bindes det målrettede antistoffet til CD138, for eksempel antistoffene B-B4, BC/B-B4, B-B2, DL-101, 1 D4, MI15, 1.BB.210, 2Q1484, 5F7, 104-9, 281-2, spesielt B-B4. Hybridomceller, som ble generert ved 35 hybridisering av SP02/0-myelomceller med miltceller fra Balb/c-mus, ble 11. desember 2007 deponert hos DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig.

Identifikasjonsnummeret til disse B-B4-uttrykkende hybridomcellene er DSM ACC2874. I en annen utførelsesform gir det målrettede antistoffet ikke vesentlig binding av ikke-celleoverflate-uttrykt CD138. Når navnet til et spesifikt antistoff er kombinert med betegnelsen "målrettet antistoff" som "nBT062-målrettet antistoff," betyr dette at dette målrettede antistoffet har bindingsspesifisitet for antistoffet nBT062. Dersom et målrettet antistoff er nevnt å være "basert på" et spesifisert antistoff, betyr dette at dette målrettede antistoffet har bindingsspesifisiteten til dette antistoffet, men kan ta en hvilken som helst form som er i samsvar med den ovennevnte beskrivelse av et målrettet antistoff. Når navnet til et spesifikt antigen i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen blir kombinert med betegnelsen "målrettet antistoff", som "CD138-målrettet antistoff," betyr dette at dette målrettede antistoffet har bindingsspesifisitet for CD138. Dersom for eksempel et målrettet antistoff er nevnt å gjøre noe "selektivt", som "selektivt målrettet mot celleoverflate-uttrykt CD138" eller å være "selektivt" for noe, betyr dette at det er en signifikant selektivitet (dvs. en høyere affinitet for CD138-positive celler enn for CD138-negative celler) for, i dette gitte eksemplet, celleoverflate-uttrykt CD138, sammenlignet med hvilke som helst andre antigener. Negative bivirkninger i gitte omgivelser blir vesentlig redusert eller til og med unngått på grunn av denne selektiviteten.

"Ikke-immunglobulin målrettede molekyler" omfatter målrettede molekyler som er avledet fra ikke-immunglobulin-proteiner så vel som ikke-peptidiske, målrettede molekyler. Små ikke-immunglobulin-proteiner som er inkludert i denne definisjonen, er utformet for å ha spesifikke affiniteter overfor spesielt overflateuttrykt CD138. Disse små ikke-immunglobulin-proteinene omfatter skaffoldbaserte, konstruerte, molekyler som Affilin®-molekyler som har en relativt lav molekylvekt, f.eks. mellom 10 kDa og 20 kDa. Passende skaffolder omfatter for eksempel gammakrystallin. De molekylene har, i sin naturlige tilstand, ingen spesifikk binding overfor mål-molekylene. Ved konstruksjon av proteinoverflatene gjennom lokalt definert randomisering av løsningsmiddeleksponerte aminosyrer, blir fullstendig nye bindingssteder skapt. Tidligere ikke-bindende proteiner blir derved forvandlet til spesifikke bindingsproteiner. Slike molekyler kan være spesifikt utformet for å binde et mål, som CD138, og muliggjør spesifikk avlevering av ett eller flere effektormolekyler (se scil Proteins GmbH på www.scilproteins.com, 2004). En annen type ikke-immunglobulin-målrettede molekyler er avledet fra lipokaliner og omfatter for eksempel ANTICALINS®, som i struktur ligner noe på

immunglobuliner. Lipokaliner er imidlertid sammensatt av en enkelt polypeptidkjede med 160 til 180 aminosyrerester. Bindingslommen til lipokaliner kan være omformet for å gjenkjenne et interessant molekyl med høy affinitet og spesifisitet (se for eksempel, Beste et al., 1999). Syntetiske bakterielle reseptorer, så som de som er markedsført under handelsnavnet Affibody® (Affibody AB), omfattes også av den foreliggende beskrivelsen. Disse syntetiske bakterielle reseptormolekylene er små, enkle proteiner og kan være sammensatt av en tre-heliks-bunt som er basert på skaffoldet i én av de IgG-bindende domener i Protein A (*Staphylococcus aureus*). Disse molekylene har tilsvarende bindingsegenskaper som mange immunglobuliner, men er vesentlig mindre og har en molekylvekt som ofte ikke overskrider 10kDa, og har også sammenlignbar stabilitet. Egnede syntetiske bakterielle reseptormolekyler er for eksempel beskrevet i US-patentene 5,831,012; 6,534,628 og 6,740,734.

Et "effektormolekyl" ifølge den foreliggende oppfinnelsen er et molekyl eller et derivat, eller en analog derav, som er festet til et målrettet middel, spesielt et målrettet antistoff og/eller et konstruert, målrettet antistoff, og som utøver en ønsket effekt, for eksempel apoptose eller en annen type celledød, eller en kontinuerlig cellyklusstans hos målcellen eller målcellene. Effektormolekyler ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter molekyler som kan utøve ønskede effekter i en målcelle og omfatter, men er ikke begrenset til, toksiner, legemidler, spesielt lavmolekylære cytotoksiske legemidler, radionuklider, biologiske responsmodifikatorer, poredannende midler, ribonukleaser, proteiner i apoptosesignal-kaskader med apoptose-induserende virkninger, cytotoksiske enzymer, prodrug-aktiverende enzymer, antisense-oligonukleotider, antistoffer eller cytokiner, så vel som funksjonelle derivater eller analoger/fragmenter derav. Toksiner kan omfatte bakterielle toksiner, som, men ikke begrenset til, difteritoksin eller Exotoksin A, plantetoksiner, som, men ikke begrenset til, ricin. Proteiner i apoptotiske signalkaskader med apoptose-induserende virkninger, omfatter, men er ikke begrenset til, Granzyme B, Granzyme A, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8, Caspase-9, trunkert Bid (tBid), Bax og Bak.

I en foretrukket utførelsesform øker effectoren intern effektoravlevering av immunkonjugatet, spesielt når den naturlige formen av antistoffet som det målrettede antistoffet i immunkonjugatet er basert på, er dårlig internaliserbart. I en annen foretrukket utførelsesform er effectoren, i sin opprinnelige form, ikke-selektiv. I visse utførelsesformer har effectoren høy ikke-selektiv toksisitet,

inkludert systemisk toksisitet, i sin opprinnelige form. Den "opprinnelige formen" av et effektormolekyl ifølge den foreliggende oppfinnelsen, er et effektormolekyl før det ble festet til det målrettede midlet for å danne et immunkonjugat. I en annen foretrukket utførelsesform blir den ikke-selektive toksisitet av effektormolekylet hovedsakelig eliminert ved konjugering til det målrettede midlet. I en annen foretrukket utførelsesform forårsaker effektormolekylet, når det når målcellen, død eller kontinuerlig cellesyklusstans i målcellen. Et legemiddel/effektor-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, et legemiddel som omfatter for eksempel små, svært cytotoxiske legemidler som virker som hemmere av tubulinpolymerisering, som maytansinoider, dolastatiner, auristatin og kryptofycin; DNA-alkylerende midler som CC-1065-analoger eller derivater (US-patentene 5,475,092; 5,585,499; 6,716,821) og duokarmycin; enediyn-antibiotika som kalikeamicin og esperamicin; og potente taxoid-legemidler (taxaner) (Payne, 2003). Maytansinoider og kalikeamiciner er spesielt foretrukne. Et effektor-maytansinoid omfatter maytansinoider av hvilken som helst opprinnelse, inkludert, men ikke begrenset til syntetisk maytansinol og maytansinol-analog og -derivat. Doksorubicin, daunomycin, metotreksat, vinblastin, neokarzinostatin, makromycin, trenimon og α -amanitin er noen andre effektormolekyler som omfattes av den foreliggende oppfinnelsen. Antisense-DNA-molekyler som effektormolekyler omfattes også av den foreliggende oppfinnelsen. Når navnet til for eksempel et spesifikt legemiddel eller en legemiddelklasse her blir kombinert med betegnelsen "effektor" eller "effektormolekyl," vises det til en effektor av et immunkonjugat ifølge den foreliggende oppfinnelsen, som er basert på det spesifiserte legemidlet eller legemiddelklassen.

Maytansin er et naturlig produkt som opprinnelig er utvunnet fra den etiopiske busken *Maytenus serrata* (Remillard, 1975; US-patent 3,896,111). Dette legemidlet hemmer tubulinpolymerisering, hvilket fører til mitoseblokk og celledød (Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978). Cytotoksiteteten til maytansin er 200–1000 ganger høyere enn cytotoksiteteten til anti-cancer-legemidler i klinisk bruk som påvirker tubulinpolymerisering, som vinka-alkaloider eller taxol. Kliniske studier av maytansin indikerte imidlertid at det manglet et terapeutisk vindu på grunn av den høye systemiske toksisiteten. Maytansin og maytansinoider er svært cytotoxiske, men deres kliniske bruk i kreftbehandling har vært svært begrenset av deres alvorlige systemiske bivirkninger som hovedsakelig skyldes deres lave selektivitet for tumorer.

Kliniske studier av maytansin viste alvorlige bivirkninger på sentralnervesystemet og det gastrointestinale systemet.

5 Maytansinoider er også isolert fra andre planter, deriblant frø fra *Trewia nudiflora* (US-patent 4,418,064)

Også visse mikrober produserer maytansinoider, som maytansinol og C-3-maytansinol-estere (US-patent 4,151,042).

10 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører maytansinoider av hvilken som helst opprinnelse, inkludert syntetisk maytansinol og maytansinol-analoger som er beskrevet for eksempel i US-patentene 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 15 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,371,533; 4,424,219 og 4,151,042.

I en foretrukket utførelsesform er maytansinoidet et tiolholdig maytansinoid, og det er mer foretrukket at det er fremstilt i henhold til prosessene som er beskrevet i US-patent 6,333,410 til Chari et al eller i Chari et al.(Chari, 1992).

20 DM-1 (N^2 -deacetyl- N^2 -(3-merkapt-1-oksopropyl)-maytansin) er et foretrukket effektormolekyl i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen. DM1 er 3 til 10 ganger mer cytotoksisk enn maytansin og har vært konvertert til et prodrug ved å koble det via én eller flere disulfidbindinger til et monoklonalt antistoff som 25 er rettet mot et tumorrelatert antigen. Noen av disse konjugatene (kalles noen ganger "tumoraktiverte prodrugs" - "tumor activated prodrugs"/TAPs)) er ikke cytotoksiske i blodets kompartment, siden de blir aktivert ved forening med målcellen og internalisert, og derved frisetter legemidlet (Blattler, 2001). Flere antistoff-DM1-konjugater er blitt utviklet (Payne, 2003) og evaluert i kliniske 30 forsøk. For eksempel ble huC242-DM1-behandling mot kolorektal kreft godt tolerert av pasientene, induserte ikke noen påvisbar immunrespons og hadde lang sirkulasjonstid (Tolcher, 2003).

35 Andre spesielt foretrukne maytansinoider omfatter en sidekjede som inneholder en sterisk hindret tiolbinding, så som, men ikke begrenset til, maytansinoider N^2 -deacetyl- N^2 -(4-merkapt-1-oksopentyl)-maytansin, også kalt "DM3," og N^2 -deacetyl- N^2 -(4-metyl-4-merkapt-1-oksopentyl)-maytansin, også kalt "DM4."

Syntesen av DM4 er vist i figur 3 og 4 og er beskrevet andre steder i denne beskrivelsen. DM4 avviker fra DM1 og DM3 ved at det har metylgrupper ved [alfa]C. Dette fører til en sterisk hindring når DM4 er festet via en kobler, spesielt, men ikke begrenset til, en kobler som omfatter en disulfidbinding, til et målrettet middel som nBT062. Et bredt spekter av maytansinoider som har en sterisk hindret tiolgruppe (som har én eller to substituent, spesielt alkylsubstituent, som metylsubstituentene i DM4) er beskrevet i US-patentsøknad 2004/0235840, publisert 25. nov. 2004. Som rapportert av Goldmahker et al. i US patentsøknad 2006/0233814, induserer en slik hindring alkylering (f.eks. metylering) av det frie legemidlet når legemidlet blir frisatt ved målet. Alkyleringen kan øke stabiliteten av legemidlet og muliggjøre den såkalte "bystander"-effekten. Fagkyndige vil imidlertid forstå at andre effektormolekyler som omfatter substituent som alkylgrupper, i stillinger som medfører en sterisk hindring når effectoren er festet til et målrettet middel via en kobler, er en del av den foreliggende oppfinnelsen. Det er foretrukket at denne hindringen induserer en kjemisk modifisering, så som alkylering av det frie legemidlet, for å øke dets totale stabilitet, hvilket muliggjør at legemidlet ikke bare induserer celledød eller kontinuerlig cellyklusstans hos CD138-uttrykkende tumorceller, men eventuelt også påvirker hjelpeceller som f.eks. støtter eller beskytter tumoren mot legemidler, spesielt celler i tumor stroma og tumor vasculature, og som generelt ikke uttrykker CD138, slik at de minsker eller mister sin støttende eller beskyttende funksjon.

DNA-alkylerende midler er også spesielt foretrukket som effektormolekyler og omfatter, men er ikke begrenset til, CC-1065-analoger eller -derivater. CC-1065 er et potent antitumor-antibiotikum som blir isolert fra kulturer av *Streptomyces zelensis* og som er vist å være eksepsjonelt cytotoxisk in vitro (US-patent 4,169,888). Den foreliggende oppfinnelsen omfatter for eksempel CC-1065-analogene eller -derivatene som er beskrevet i US-patentene 5,475,092, 5,585,499 og 5,739,350. Som fagkyndige lett vil forstå, omfatter den foreliggende oppfinnelsen også modifiserte CC-1065-analoger eller -derivater som beskrevet i US-patent 5,846,545 og prodrugs av CC-1065-analoger eller derivater som beskrevet for eksempel i US-patent 6,756,397. I visse utførelsesformer av oppfinnelsen kan CC-1065-analoger eller -derivater være syntetisert for eksempel som beskrevet i US-patent 6,534,660.

En annen gruppe av forbindelser som utgjør foretrukne effektormolekyler, er taxaner, spesielt de svært potente og de som inneholder tiol- eller disulfidgrupper. Taxaner er mitosespindel-gifter som hemmer depolymeriseringen av tubulin, fører til økt hastighet av mikrotubulisammenstilling og celledød. Taxaner som omfattes av den foreliggende oppfinnelsen, er for eksempel beskrevet i US-patentene 6,436,931; 6,340,701; 6,706,708 og US-patentsøknadene 20040087649; 20040024049 og 20030004210. Andre taxaner er beskrevet for eksempel i US-patent 6,002,023, US-patent 5,998,656, US-patent 5,892,063, US-patent 5,763,477, US-patent 5,705,508, US-patent 5,703,247 og US-patent 5,367,086. Som fagkyndige vil forstå, omfatter den foreliggende oppfinnelsen også PEGylerte taxaner, så som de som er beskrevet i US-patent 6,596,757.

Kalikeamicin-effektormolekyler ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter gamma 1I, N-acetyl-kalikeamicin og andre derivater av kalikeamicin. Kalikeamicin bindes på en sekvensspesifikk måte til mindre groper i DNA, gjennomgår omarrangering og eksponerer frie radikaler, noe som fører til brudd i dobbelttrådet DNA og resulterer i celleapoptose og celledød. Ett eksempel på et kalikeamicin-effektormolekyl som kan anvendes i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen, er beskrevet i US-patent 5,053,394.

Et immunkonjugat ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter et konstruert, målrettet antistoff og et effektormolekyl. Immunkonjugatet kan videre omfatte molekyler for eksempel for stabilisering. For immunkonjugater blir betegnelsen "konjugat" generelt brukt for å definere den operative forbindelse mellom det målrettede middelet og ett eller flere effektormolekyler, og er ikke ment å vise bare til en hvilken som helst type operativ forbindelse, og er spesielt ikke begrenset til kjemisk "konjugering". Så lenge det målrettede middelet er i stand til å bindes til målstedet og den tilkoblede effektorfunksjon fungerer tilfredsstillende slik det er tilsiktet, spesielt når det avleveres til målstedet, kan en hvilken som helst festemåte være egnet. Konjugeringsmåter omfatter, men er ikke begrenset til, direkte festing av effektormolekylet til det målrettede antistoffet, med eller uten foregående modifisering av effektormolekylet og/eller det målrettede antistoffet, eller festing via koblere. Koblere kan være kategorisert funksjonelt i for eksempel syrelabile, fotolabile koblere, enzymspaltbare koblere, så som koblere som kan spaltes av peptidaser. Spaltbare koblere er foretrukket i mange utførelsesformer av oppfinnelsen. Slike

spaltbare koblere kan spaltes under betingelser som foreligger i cellenes miljø, spesielt et intracellulært miljø, som ikke har noen skadelig effekt på legemiddelet som blir frisatt ved spalting. Lave pH-verdier som pH 4 til 5, som foreligger i visse intracellulære områder, vil spalte syrelabile koblere, mens fotolabile koblere kan spaltes med f.eks. infrarødt lys. Koblere som blir spaltet ved/under fysiologiske betingelser som foreligger i de fleste celler, er imidlertid foretrukne og kalles her **fysiologisk spaltbare koblere**. I samsvar med dette er disulfidkoblere foretrukket i mange utførelsesformer av oppfinnelsen. Disse koblerne er spaltbare gjennom disulfidutveksling, som kan forekomme under fysiologiske betingelser. Foretrukne heterobifunksjonelle disulfidkoblere omfatter, men er ikke begrenset til, N-succinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) (se f.eks. Carlsson et al.(1978)), N-succinimidyl-4-(2-pyridylditio)butanoat (SPDB) (se f.eks. US-patent nr. 4,563,304), N-succinimidyl-4-(2-pyridylditio)pentanoat (SPP) (se f.eks. CAS-reg.nr. 341498-08-6), N-succinimidyl-4-(N-maleimidometyl)cykloheksan--1-karboksylat (SMCC) (se f.eks. Yoshitake et al., (1979)), og N-succinimidyl-4-metyl-4-[2-(5-nitro-pyridyl)-ditio]pentanoat (SMNP) (se f.eks. US-patent nr. 4,563,304). De mest foretrukne koblermolekyler for anvendelse i sammensetningen ifølge oppfinnelsen, er SPP, SMCC og SPDB.

Andre egnede koblere kan omfatte "ikke-spaltbare" bindinger, så som, men ikke begrenset til, sulfosuccinimidyl-maleimidometyl-cykloheksankarboksylat (SMCC), som er en heterobifunksjonell kobler som er i stand til å koble forbindelser med SH-holdige forbindelser. Bifunksjonelle og heterobifunksjonelle koblermolekyler, så som karbohydratrettede heterobifunksjonelle koblermolekyler, som S-(2-tiopyridyl)-L-cysteinhydrazid (TPCH), omfattes også av den foreliggende oppfinnelsen (Vogel, 2004). Effektermolekylet, så som et maytansinoid, kan være konjugert til det målrettede antistoffet via en to-trinns reaksjonsprosess, inkludert som et første trinn modifisering av det målrettede antistoffet med et kryssbindende reagens som N-succinimidyl-pyridylditiopropionat (SPDP) for å innføre ditiopyridylgrupper i det målrettede antistoffet. I et andre trinn kan et reaktivt maytansinoid som har en tiolgruppe, som DM1, settes til det modifiserte antistoffet, hvilket fører til fortrengning av tiopyridylgruppene i det modifiserte antistoffet, og produksjon av disulfidkoblet, cytotoxisk maytansinoid/antistoff-konjugat (US-patent 5,208,020). Ett-trinns konjugeringsprosesser, så som den som er beskrevet i US-patentsøknad 20030055226 til Chari et al., omfattes imidlertid også av den foreliggende oppfinnelsen. I én utførelsesform av den

foreliggende oppfinnelsen er flere effektormolekyler av samme eller forskjellig type koblet til et målrettet antistoff.

5 CC-1065-analoger eller -derivater kan være konjugert til det målrettede midlet via for eksempel PEG-koblende grupper, som beskrevet i US-patent 6,716,821.

10 Kalikeamiciner kan være konjugert til de målrettede antistoffer via koblere (US-patent 5,877,296 og US-patent 5,773,001) eller i henhold til konjugeringsfremgangsmåtene som er beskrevet i US-patent 5,712,374 og US-patent 5,714,586. En annen foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av kalikeamicin-konjugater, er beskrevet i US-patentsøknad 20040082764. Immunkonjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan ta form av rekombinante fusjonsproteiner.

15 Betegnelsen sekvensidentitet viser til et mål for identiteten av nukleotidsekvenser eller aminosyresekvenser. Generelt er sekvensene sammenstilt slik at beste match (høyeste orden) oppnås. "Identitet" har i og for seg en anerkjent betydning innen faget og kan beregnes ved bruk av publiserte teknikker. (Se f.eks.: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., red., Oxford
20 University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., red., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. og Griffin, H. G., red., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; og Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. og
25 Devereux, J., red., M Stockton Press, New York, 1991). Det finnes en rekke fremgangsmåter for å måle identiteten mellom to polynukleotid- eller polypeptid-sekvenser, men betegnelsen "identitet" er velkjent for fagkyndige (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J påføres Math 48:1073 (1988)).

30 Hvorvidt et spesielt nukleinsyremolekyl er minst 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk med for eksempel nBT062-nukleinsyresekvensen, eller en del derav, kan bestemmes konvensjonelt ved bruk av kjente dataprogrammer som DNAsis software (Hitachi Software, San Bruno, Calif.) for sammenstilling av innledende sekvens, fulgt av ESEE versjon
35 3.0 DNA/protein sequence software (cabot@trog.mbb.sfu.ca) for sammenstilling av multiple sekvenser.

Hvorvidt aminosyresekvensen er minst 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk med for eksempel SEQ ID NO:1 eller SEQ ID NO:2, eller en del derav, kan bestemmes konvensjonelt ved bruk av kjente dataprogrammer, så som programmet BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, versjon 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT bruker den lokale homologialgoritmen til Smith og Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), for å finne det mest homologe segmentet mellom to sekvenser.

Når man bruker DNAsis, ESEE, BESTFIT eller et hvilket som helst annet program for sekvenssammenstilling for å bestemme hvorvidt en spesiell sekvens er for eksempel 95 % identisk med en referansesekvens ifølge den foreliggende oppfinnelsen, er parameterne satt slik at den prosentvise identitet er beregnet for referanse-nukleinsyrens eller aminosyresekvensens fulle lengde, og et gap i homologi på opptil 5 % av det totale antallet nukleotider i referansesekvensen er tillatt.

Dersom det i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen vises til en bestemt sekvensidentitet med en kombinasjon av rester fra en spesiell sekvens, viser denne sekvensidentiteten til summen av alle de spesifiserte rester.

Det grunnleggende antistoffmolekylet er en bifunksjonell struktur hvori de variable regioner binder antigen, mens de resterende konstante regioner kan fremkalle antigenuavhengige responser. De største antistoffklassene, IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, bestemmes ved sine konstante regioner. Disse klassene kan inndeles videre i underklasser (isotyper). For eksempel har IgG-klassen fire isotyper, nærmere bestemt IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4, som bestemmes ved de konstante regioner. Av de forskjellige humane antistoffklasser er bare humane IgG1, IgG2, IgG3 og IgM kjent for effektiv aktivering av komplementærsystemet. De konstante regioner danner ikke antigenbindende steder, men arrangementen av de konstante regioner og hengselregion kan tilføre segmentfleksibilitet for molekylet, hvilket gjør binding mellom det og antigenet mulig.

Forskjellige IgG-isotyper kan bindes til Fc-reseptorer på celler som monocytter, B-celler og NK-celler, og derved aktivere cellene slik at de frigir cytokiner.

Forskjellige isotyper kan også aktivere komplement, hvilket resulterer i lokal eller systemisk inflammasjon. Spesielt kan de forskjellige IgG-isotyper binde FcγR i varierende grad. FcγR er en gruppe overflate-glykoproteiner som tilhører overfamilien Ig og uttrykkes for det meste på leukocytter. FcγR-glykoproteinene er inndelt i tre klasser som kalles FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) og FcγRIII (CD16). IgG1, IgG2 og IgG3 bindes sterkt til flere av disse klassene av FcγR-glykoproteinene, mens IgG4 oppviser mye svakere binding. IgG4 er spesielt en intermediat-binder av FcγRI, hvilket resulterer i relativt lav eller til og med fullstendig mangel på ADCC (antistoffavhengig cellulær cytotoksitet), og bindes ikke til FcγRIIIA eller FcγRIIA. IgG4 er også en svak binder av FcγRIIB, som er en hemmende reseptor. Videre medierer IgG4 kun svak eller ingen komplementfiksering og svak eller ingen komplementavhengig cytotoksitet (CDC). IgG4 kan anvendes spesielt for å hindre Fc-mediert målretting av hepatisk FcR siden det ikke oppviser noen interaksjon med FcγRII på LSECs (liver sinusoidal endothelial cells), ingen eller svak interaksjon med FcγRI-III på Kupffer-celler (makrofager) og ingen interaksjon med FcγRIII på hepatiske NK-celler. Visse mutasjoner som ytterligere reduserer en eventuell CDC, er også en del av den foreliggende oppfinnelsen. For eksempel er det vist at IgG4-restene ved stillingene 327, 330 og 331, reduserer ADCC (antistoffavhengig cellulær cytotoksitet) og CDC (Amour, 1999; Shields, 2001). Én eller flere mutasjoner som stabiliserer antistoffet, er også en del av den foreliggende oppfinnelsen (her kalles det også "stabiliserende mutasjoner"). Disse mutasjonene omfatter spesielt leucin-til-glutaminsyre-mutasjoner i CH2-regionen av IgG4, og serin-til-prolin-endringer i hengselkjernen til IgG4. I visse utførelsesformer av oppfinnelsen reduserer disse mutasjonene mengden av halv-molekyler til mindre enn 10 %, mindre enn 5 % og fortrinnsvis mindre enn 2 % eller 1 %. Videre kan in vivo halveringstid til sådant stabiliserte antistoffer være økt med flere dager, inkludert 1, 2, 3, 4 eller flere enn 5 dager (Schuurman, 1999).

Målrettede midler, inkludert målrettede antistoffer, spesielt konstruerte, målrettede antistoffer, som er beskrevet her, kan også være beskrevet eller spesifisert på bakgrunn av deres **bindingsaffinitet** til antigen, spesielt til CD138. Foretrukne bindingsaffiniteter til målrettede midler, så som målrettede antistoffer, spesielt konstruerte, målrettede antistoffer, er karakterisert ved dissosiasjonskonstanter K_D (nM) på mindre enn 1,6, mindre enn 1,5 eller på omtrent eller mindre enn 1,4. For immunkonjugater som omfatter de målrettede midlene, så som målrettede antistoffer, er det foretrukket med

dissosiasjonskonstanter K_D (nM) på mindre enn 1,6, mindre enn 1,5 eller mindre enn 2,5, mindre enn 2,4, mindre enn 2,3, mindre enn 2,2, mindre enn 2,1, mindre enn 2,0, mindre enn eller omtrent 1,9.

5 En **antigenbindende region** (ABR) ifølge den foreliggende beskrivelsen, vil variere basert på hvilken type av målrettet antistoff eller konstruert, målrettet antistoff som anvendes. I et naturlig forekommende antistoff og i de fleste kimære og humaniserte antistoffer, blir den antigenbindende regionen fremstilt av en lettkjede og de første to domener av en tungkjede. I et antistoff med
10 tungkjede og uten lettkjeder, vil imidlertid den antigenbindende region utgjøre f.eks. de første to domener av bare tungkjeden, mens enkeltkjededede antistoffer (ScFv), hvor de variable domener av den lette og tunge kjede av et antistoffmolekyl, er kombinert i en enkelt polypeptidkjede, er ABR tilveiebrakt med kun ett polypeptidmolekyl. FAB-fragmenter blir vanligvis oppnådd ved
15 papainspalting og har én lettkjede og en del av en tungkjede og omfatter følgelig en ABR med kun ett antigenkombinerende sted. På den annen side er diastoffer små antistoff-fragmenter med to antigenbindende regioner. I sammenheng med den foreliggende beskrivelsen er imidlertid en antigenbindende region av et målrettet antistoff eller konstruert, målrettet antistoff, en hvilken som helst
20 region som hovedsakelig bestemmer **bindingspesifisiteten** til det målrettede antistoffet eller det konstruerte, målrettede antistoffet.

Dersom en ABR eller en annen målrettet antistoffregion er nevnt å være "**av et bestemt antistoff**", f.eks. et humant eller ikke-humant antistoff, betyr dette i
25 sammenheng med den foreliggende beskrivelsen at den antistoffbindende regionen er enten identisk med en tilsvarende naturlig forekommende ABR, eller er basert på en slik. En ABR er basert på en naturlig forekommende ABR dersom den har bindingsspesifisiteten til den naturlig forekommende ABR. En slik ABR kan imidlertid omfatte f.eks. punktmutasjoner, addisjoner, delesjoner eller
30 modifisering etter translasjon, så som glykosylering. En slik ABR kan spesielt ha mer enn 70 %, mer enn 80 %, mer enn 90 %, fortrinnsvis mer enn 95 %, mer enn 98 % eller mer enn 99 % sekvensidentitet med sekvensen i den naturlig forekommende ABR.

35 **Homogen målretting** av et målrettet middel, så som et målrettet antistoff, men spesielt et immunkonjugat som omfatter dette, er i sammenheng med den foreliggende beskrivelsen et mål for variansen relatert til oppnåelsen av det

ønskede resultat for målrettingen av det målrettede midlet. I visse utførelsesformer blir det ønskede resultat oppnådd ved enkel binding til målet. Dette gjelder for eksempel for utførelsesformer der et bestemt målrettet middel tilveiebringer en beskyttelse mot påfølgende binding. Det er imidlertid enkelt å

5 evaluere homogeniteten til et målrettet middel, f.eks. gjennom effekten av et immunkonjugat som omfatter det målrettede middelet. Effekten av immunkonjugatet mot et tumorantigen, så som CD138, som omfatter en effektor som skal ødelegge tumorceller og/eller stanse veksten av en tumor, kan bestemmes for eksempel ved graden av vekstsuppresjon av en tumor som

10 omfatter celler som uttrykker CD138-antigenet. Et slikt immunkonjugat kan oppvise meget variabel effekt. Det kan for eksempel noen ganger være meget effektivt i å stanse tumorvekst, mens det andre ganger har en effekt som knapt overskrider kontrollens. En lav varians i et immunkonjugats effekt viser på den annen side at henholdsvis immunkonjugatet og/eller det målrettede middelet gir

15 det ønskede resultat konsekvent. Én måte å kvantifisere homogeniteten av målretting er å beregne **variasjonen av målrettingen**. I sammenheng med tumorvekststans ved bruk av et immunkonjugat som omfatter et bestemt målrettet middel, kan variasjonen i målretting beregnes ved først å bestemme tiden til en tumor når et forhåndsbestemt volum, f.eks. 300 mm³. Det

20 forhåndsbestemte volum er fortrinnsvis valgt slik at en eventuell tumorvekst før og etter at det forhåndsbestemte volumet er oppnådd, øker jevnt i omtrent samme hastighet. Etter at denne tidsperioden er bestemt for en pasientgruppe, blir gjennomsnittet av disse tidsperiodene beregnet (T_m) for pasientgruppen (f.eks. SCID-mus eller en annen egnet modell som viser homogen tumorvekst).

25 T_m blir deretter korrelert med observasjonene som er gjort hos pasienten i gruppen som oppviser minst effektiv målretting og som derved er assosiert med tumorer som trenger minst tid (T_f) for å nå det forhåndsbestemte volumet, og på den annen side, pasienten i gruppen som oppviste mest effektiv målretting og derved er assosiert med tumorer som trenger mest tid (T_s) til å nå det

30 forhåndsbestemte volumet, ved å beregne variasjonen i målretting ved bruk av følgende formel:

TARGETING VARIATION [%] =

$$T_s - T_f / T_m \times 100$$

I en foretrukket utførelsesform er variasjonen i målretting av det konstruerte, målrettede antistoff mindre enn 150 %, mindre enn 140 %, mindre enn 130 %, 35

mindre enn 120 %, mindre enn 110 %, mindre enn 100 %, mindre enn 90 %, mindre enn 80 %, mindre enn 70 %, mindre enn 60 %, eller mindre enn 50 %, og i visse utførelsesformer til og med mindre enn 45 %. Variasjonen i målretting er fortrinnsvis mellom ca. 10 % og ca. 150 %, fortrinnsvis mellom ca. 10 % og ca. 100 %, ca. 10 % og ca. 80 %, ca. 10 % og ca. 70 %, ca. 10 % og ca. 60 %, ca. 10 % og ca. 50 %.

Homogeniteten av målrettingen (kalles her også homogeniteten av binding til et spesielt antigen) kan også kvantifiseres ved andre fremgangsmåter, så som bestemmelse av forsinket tumorvekst. Fagkyndige vil også enkelt forstå at tumorvolum av en viss størrelse er bare én av parametrene som variasjonen i målretting kan baseres på. Avhengig av det ønskede resultat, kan det anvendes andre parametre, inkludert tid (for f.eks. måling av forsinket tumorvekst) eller prosentvis binding. Fagkyndige kan enkelt bestemme slike andre parametre.

nBT062 (se også **FIG. 1**) er en murin/ human-kimær IgG4 mAb, en kimerisert versjon av B-B4. Denne kimeriserte versjonen av B-B4 ble skapt for å redusere HAMA-responsen (Human Anti-Mouse Antibody), men samtidig beholde funksjonaliteten til den antistoffbindende regionen av B-B4 for CD138. Det ble overraskende funnet at dette kimære antistoffet oppviser bedre bindingsaffiniteter enn B-B4. Det kimære antistoffet har, ganske overraskende, også vært assosiert med homogen målretting, hvilket reduserer variansen i resultater som blir oppnådd ved bruk av antistoffet eller immunkonjugatet som omfatter dette. Protokollen for fremstilling av nBT062 er spesifisert nedenfor. 11. desember 2007 ble eggceller fra kinesisk hamster, som uttrykker nBT062, deponert hos DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig. Identifikasjonsnummeret er DSM ACC2875. Et CD138-spesifikt, kimært antistoff basert på B-B4, er her generisk kalt c-B-B4.

Aminosyresekvensen for både de tunge og lette kjedene har vært predikert ut ifra translasjonen av nukleotidsekvensen for nBT062. Aminosyresekvensene som er predikert for tungkjeden og lettkjeden, er oppgitt i **Tabell 1**. Predikerte variable regioner er i fet skrift, mens predikerte CDRs er understreket.

Tabell 1. Predikert aminosyresekvens for nBT062

- nBT062 tungkjede-predikert sekvens (SEQ ID NO:1):	
1	QVQLQQSGSE LMPGASVKI SCKATGYTFS <u>NYWIEWVKQR</u> PGHGLEWIGE
51	<u>ILPGTGRTIY</u> <u>NEKFKGKATF</u> TADISSNTVQ <u>MQLSSLTSED</u> <u>SAVIYCARRD</u>
101	<u>YYGNFYIAMD</u> <u>YWGQGTSTVTV</u> SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151	VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201	KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPSPCPAPEFLGGP SVFLFPFKPK
251	DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS
301	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351	YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401	DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG(K)
Det C-terminale lysinet er utsatt for klipping og kan foreligge på grunn av ufullstendig klipping til en viss grad og er ikke en del av SEQ ID NO: 1.	
- nBT062 lettkjede-predikert sekvens (SEQ ID NO:2):	
1	DIQMTQSTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIN <u>NYLNWYQQKP</u> DGTVELLIYY
51	<u>TSTLQSGVPS</u> <u>RFGSGSGTD</u> <u>YSLTISNLEP</u> <u>EDIGTYCQQ</u> <u>YSKLPRTFGG</u>
101	<u>GTKLEIKRTV</u> AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEK

Tabell 2. viser en sammenligning av de generelle CDR-definisjoner av Krabat og Chothia og de predikerte CDR-ene for BT062

Kabats CDR-definisjon		nBT062
Lettkjede	CDR1: restene 24–34	<u>CDR1: restene 24–34</u>
	CDR2: restene 50–56	<u>CDR2: restene 50–56</u>
	CDR3: restene 89–97	<u>CDR3: restene 89–97</u>
Tungkjede	CDR1: restene 31–35	<u>CDR1: restene 31–35</u>
	CDR2: restene 50–56	CDR2: restene 51–68
	CDR3: restene 95–102	CDR3: restene 99–111
Chothias CDR-definisjon		nBT062
Lettkjede	CDR1: restene 26–32	CDR1: restene 24–34
	CDR2: restene 50–52	CDR2: restene 50–56

Kabats CDR-definisjon		nBT062
	CDR3: restene 91–96	CDR3: restene 89–97
Tungkjede	CDR1: restene 26–32	CDR1: restene 31–35
	CDR2: restene 52–56	CDR2: restene 51–68
	CDR3: restene 96–101	CDR3: restene 99–111

BT062 er et immunkonjugat som omfatter det CD138-målrettede, kimære antistoff nBT062, som er festet via en kobler, her SPDB, til det cytostatiske maytansinoid-derivatet DM4. En kjemisk fremstilling av BT062 er gitt i FIG. 1 og 2. Immunkonjugater som omfatter nBT062 og et maytansinoid-effektormolekyl, er ofte karakterisert ved sin kobler og maytansinoid-effektor, f.eks. er nBT062-SMCC-DM1 et immunkonjugat som omfatter nBT062, SMCC (en "ikke-spaltbar" kobler som inneholder en tioesterbinding) og DM1 som en effektor. Mer generisk kan et immunkonjugat som inneholder nBT062 og et effektormolekyl, også beskrives som nBT062-kobler-effektor eller bare som nBT062-effektor (nBT062N, hvori N er en hvilken som helst effektor som er beskrevet her.

Det henvises her til et uhindret motstykke (**UI: uhindret immunkonjugat**) av et immunkonjugat som omfatter et konstruert, målrettet antistoff mot CD138, som er festet til et effektormolekyl via en **spaltbar kobler (CL)** og er beskrevet her som UICL, i motsetning til et immunkonjugat hvor effektormolekylet er sterisk hindret, men inneholder en spaltbar kobler (**HICL**). UICL er et immunkonjugat tilsvarer en HICL som omfatter et konstruert, målrettet antistoff hvor effektormolekylet imidlertid ikke er sterisk hindret. Eksempler på et par av HICL/UICL er BT062 og nBT062-SPP-DM1. Et uhindret motstykke til et slikt immunkonjugat som omfatter en **ikke-spaltbar kobler (UINCL)** viser til det ekvivalente immunkonjugat som omfatter et konstruert, målrettet antistoff hvor effektormolekylet ikke er sterisk hindret og omfatter en ikke-spaltbar kobler. For BT062 utgjør nBT062-SMCC-DM1 et eksempel på et slikt uhindret motstykke som omfatter en ikke-spaltbar kobler.

En økning av en tumorhemmende aktivitet (=tumorveksthemmende aktivitet) av et immunkonjugat, er et relativt mål. Det beskriver den tumorveksthemmende aktivitet av et konjugat i forhold til aktiviteten til immunkonjugatet med best

effekt, som har en aktivitet satt til 100 %. Dersom for eksempel aktiviteten til immunkonjugatet med best effekt, la oss si BT062, som forårsaker en tumorvekstforsinkelse (TGD) på 32 døgn, er satt til 100 %, blir aktiviteten til f.eks. nBT062-DM1, som oppviser en tumorvekstforsinkelse (TGD) på 18 døgn, beregnet på følgende måte:

Tumor Growth Inhibiting Activity=

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

mer generisk:

Tumor Growth Inhibiting Activity=

$$100 \times (TGD_{Sample} / TGD_{Reference}).$$

Tabell 3 tilveiebringer egnede eksempler fra resultatene som er skissert i Fig. 11B:

	TGD* (døgn)	% aktivitet**
PBS	0	0
nBT062-SMCC-DM1	18	56
BT062	32	100
nBT062-SPP-DM1	13	40

Tabell 3: Tumorvekstforsinkelse (TGD) og % aktivitet av nBT062-DMx mot MOLP-8-tumor-xenografter hos i SCID-mus, basert på behandlingsgrupper som får en dose på 450 µg/kg.

(*) Tumorvekstforsinkelse i døgn (TGD) som gjennomsnittlig tid i døgn til behandlingsgruppen når en forhåndsbestemt størrelse (160 mm³), minus gjennomsnittlig tid til kontrollgruppen når denne forhåndsbestemte størrelsen.

(**) Tumorveksthemmende aktivitet = $100 \times (TGD_{prøve} / TGD_{BT062})$. Aktiviteten til BT062 er definert som 100 %.

I eksemplet som er gitt i Tabell 2, tilveiebringer BT062 en økning av en tumorhemmende aktivitet som overskrider økningen med dets uhindrede motstykke (nBT062-SPP-DM1) med 60 %, og en økning av en tumorhemmende aktivitet som overskrider økningen med dets uhindrede motstykke-immunkonjugat som omfatter en ikke-spaltbar kobler (nBT062-SMCC-DM1) med, 44 %.

Det er tidligere rapportert at en spaltbar kobler i et immunkonjugat, tilveiebringer en såkalt "bystander"-effekt. Goldmahker et al. (US-patentsøknad 2006/0233814) beskriver også at "bystander"-effekten er særlig uttalt når effektormolekylet blir utsatt for ytterligere modifisering, spesielt alkylering, ved spalting fra det målrettede midlet. Goldmahker et al. viste også at UICL oppviste bedre TGD enn den respektive UINCL, et faktum som også tilskrives det som blir kalt "bystander"-effekten (se f.eks. Fig. 6 i US-patentsøknad 2006/0233814). Her ble det overraskende funnet at en UICL i et regime med en høy enkeltdose (250 µg/kg) faktisk ikke ga bedre resultater enn UINCL. Den TGD i døgnet som ble observert for en UICL i et slikt regime, var faktisk lavere enn for UINCL. Denne observasjonen ble tydeligere med økende dose (450 µg/kg). Totalt sett var HICL bedre enn UICL i enkeltdose-forsøk, i uventet grad. Dessuten var UINCL uventet bedre enn UICL ved høyere doser.

De målrettede midlene, spesielt målrettede antistoffer og/eller immunkonjugater som er beskrevet her, kan administreres på en hvilken som helst måte, inkludert intravenøst, parenteralt, oralt, intramuskulært, intratekalt eller som en aerosol. Avleveringsmåten avhenger av den ønskede effekten. En fagkyndig vil enkelt vite den beste administreringsmåten for en spesiell behandling, i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen. Den hensiktsmessige dosen avhenger av administreringsmåten og den indiserte behandling og kan enkelt bestemmes av en fagkyndig i lys av dagens behandlingsprotokoller.

Farmasøytiske sammensetninger som inneholder et ukonjugert, målrettet middel som et virkestoff, og farmasøytiske sammensetninger som omfatter immunkonjugatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som et virkestoff, kan fremstilles i henhold til konvensjonelle farmasøytiske synteseteknikker. Se for eksempel Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. utgave. (1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Det er typisk at effektive mengder av virkestoffer blir blandet med en farmasøytisk akseptabel bærer. Bæreren kan ha en rekke former avhengig av hvilken preparatform man ønsker å administrere, for eksempel intravenøs, oral, parenteral, intratekal, transdermal eller som aerosol.

For oral administrering kan det målrettede midlet og/eller immunkonjugatet være formulert som faste eller flytende preparater som kapsler, piller, tabletter, sugetabletter, smeltepreparater, pulvere, suspensjoner eller emulsjoner. Ved fremstilling av sammensetningene i oral doseform kan det anvendes hvilke som

helst av de vanlige farmasøytiske media, for eksempel vann, glykoler, oljer, alkoholer, smakstoffer, konserveringsmidler, fargestoffer, oppslemmingsmidler og lignende for orale flytende preparater (som for eksempel suspensjoner, miksturer og oppløsninger); eller bærere som stivelse, sukkere, 5 fortynningsmidler, granuleringsmidler, fuktemidler, bindemidler, desintegreringsmidler og lignende for orale, faste preparater (som for eksempel pulvere, kapsler og tabletter). Siden de er enkle å administrere, representerer tabletter og kapsler den mest fordelaktige orale enhetsdoseformen, der det selvfølgelig anvendes faste farmasøytiske bærere. Dersom det er ønskelig, kan 10 tabletter sukkerdrasjeres eller enterobelegges ved standard fremgangsmåter. Det aktive midlet må være stabilt nok til å passere gjennom gastrointestinalkanalen. Om nødvendig kan det anvendes egnede midler for stabil passasje, som kan omfatte fosfolipider eller lecitinderivater som er beskrevet i litteraturen, så vel som liposomer, mikropartikler (inkludert 15 mikrokuler og makrokuler).

For parenteral administrering kan det målrettede midlet og/eller immunkonjugatet oppløses i en farmasøytisk bærer og administreres som enten en oppløsning eller en suspensjon. Eksempler på egnede bærere er vann, 20 saltløsning, fosfatbufferløsning (PBS), dekstroseløsninger, fruktoseløsninger, etanol eller oljer som er plantebasert eller av animalsk eller syntetisk opprinnelse. Bæreren kan også inneholde andre ingredienser, for eksempel konserveringsmidler, oppslemmingsmidler, solubiliseringsmidler, buffere og lignende. Når det ukonjugerte, målrettede midlet og/eller immunkonjugatet blir 25 administrert intracerebroventrikulært eller intratekalt, kan det også oppløses i cerebrospinalvæske.

Doser som blir administrert til en pasient (som omfatter mennesker så vel som ikke-humane dyr), kan spesifiseres som mengde basert på pasientens 30 overflateareal. Dosen kan administreres til en slik pasient i mengder på fortrinnsvis, men ikke utelukkende, fra ca. 5 mg/m² til ca. 300 mg/m², inkludert ca. 20 mg/m², ca. 50 mg/m², ca. 100 mg/m², ca. 150 mg/m², ca. 200 mg/m² og ca. 250 mg/m². Det er hensiktsmessig å administrere de målrettede midlene/immunkonjugatene på én gang eller som en serie av behandlinger. I et 35 flerdoseregime kan disse mengdene administreres én gang per dag, én gang per uke, én gang annenhver uke, én gang hver tredje uke, én gang hver fjerde uke, én gang hver femte uke eller én gang hver sjette uke. Startdoser i form av en

enkelt høy dose eller alternativt lavere doser som blir administrert rett etter hverandre, fulgt av doser med lengre intervaller, utgjør en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen. I en foretrukket utførelsesform er tidspunktene for dosering til en pasient justert slik at det har gått lang nok tid til en andre og/eller en eventuell påfølgende behandling, til at den forrige dosen er blitt vesentlig metabolisert, men slik at mengden av immunkonjugat som foreligger i pasientens system, likevel hemmer, forsinker og/eller hindrer veksten av en tumor. Et eksempel på et regime med "gjentatte enkeltdoser" omfatter administrering av en startdose av immunkonjugat på ca. 200 mg/m² én gang hver tredje uke. Alternativt kan en høy startdose være fulgt av en vedlikeholdsdose på ca. 150 µg/m². Andre doseringsregimer kan imidlertid være anvendelige. Progresjonen av denne terapien kan lett følges med kjente fremgangsmåter og analyser. Dosen kan variere avhengig av om den blir administrert med forebyggende eller terapeutisk formål, forløpet av eventuell tidligere behandling, pasientens kliniske historie og responsen på det målrettede midlet/immunkonjugatet, samt den behandlende leges skjønn.

I samsvar med den foreliggende beskrivelsen blir MM behandlet som følger, med anvendelse av nBT062 og BT062 som et eksempel. Dette eksemplet er ikke ment å begrense den foreliggende beskrivelsen på noen som helst måte, og en fagkyndig kan enkelt finne andre immunkonjugat- og nBT062-baserte systemer og andre behandlingsregimer som kan benyttes for behandling av sykdommer som MM.

På grunn av den selektive ekspresjon av CD138 på pasientens MM-celler på celler som er tilgjengelige via blodstrømmen, spesifisiteten for nBT062 og stabiliteten av BT062 i blodstrømmen, fjerner BT062 den systemiske toksisitet av DM4 og tilveiebringer en mulighet til å målrette avleveringen av DM4-effektormolekylet/ene. Administrering av doser av nBT062 er fordelaktig for å beskytte lavt-uttrykkende CD138 positive, ikke-tumorceller mot BT062-binding av de cellene og fortrinnsvis mot ødeleggelse, mens immunkonjugatene tilveiebringer en måte for effektiv administrering av effektormolekylene til celleder hvor effektormolekylene kan frisettes fra immunkonjugatene. Denne målrettede avleveringen og frisettingen tilveiebringer et signifikant fremskritt i behandling av flere myelomtyper, da dagens kjemoterapifremgangsmåter noen ganger gir ufullstendig remisjon.

Den foreliggende oppfinnelsen er nærmere beskrevet i de følgende eksempler, som kun er gitt som en illustrasjon. Det er benyttet standardteknikker som er velkjente innen faget, eller teknikkene som er spesifikt beskrevet nedenfor.

5 **Materialer og fremgangsmåter**

Konstruksjon av kimært antistoff (cB-B4: nBT062)

B-B4

10

Murint antistoff B-B4 som tidligere karakterisert (Wijdenes et al., Br J Haematol., 94 (1996), 318), ble brukt i disse eksperimentene.

Kloning og ekspresjon av B-B4 og cB-B4 / nBT062

15

Standard rekombinante DNA-teknikker ble utført som beskrevet nærmere i lærebøker, for eksempel i J. Sambrook; Molecular Cloning, An Laboratory Manual; 2. utgave. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, eller når sett blir benyttet, som anbefalt i produsentens instruksjoner. PCR-kloning og modifisering av variable regioner hos mus er utført ved bruk av standard PCR-metodologi. Primere som er angitt i det respektive resultatavsnittet, er blitt anvendt.

20

Ekspresjon av cB-B4 / nBT062

25

Eksponensielt voksende COS-celler, dyrket i DMEM supplert med 10 % FCS, 580 µg/ml L-glutamin, 50 enheter/ml penicillin og 50 µg/ml streptomycin ble høstet ved trypsinering og sentrifugering og ble vasket i PBS. Cellene ble oppslemmet i PBS til en endelig konsentrasjon på 1×10^7 celler/ml. 700 µl av COS-cellesuspensjonen ble overført til en Gene Pulser-kyvette og blandet med tung- og kappa-lettkjede ekspresjonsvektor-DNA (10 µg av hver eller 13 µg av Supervector). Cellene ble elektroporert ved 1900 V, 25 µF ved bruk av en Bio-Rad Gene Pulser. Transformerte celler ble dyrket i DMEM supplert med 10 % gamma-globulin-fri FBS, 580 µg/ml L-glutamin, 50 enheter/ml penicillin og 50 µg/ml streptomycin i 72 timer, før antistoffholdige supernatanter fra cellekulturen ble høstet.

30

Capture ELISA for å måle ekspresjonsnivået av cB-B4 / nBT062

96-brønners plater ble dekket med 100 µl prøver av 0,4 µg/ml geit/anti-human IgG-antistoff fortynnet i PBS (4 °C, natten over). Platene ble vasket tre ganger med 200 µl/brønn av vaskebuffer (PBS+0,1 % Tween-20). Brønnene ble blokkert med 0,2 % BSA, 0,02 % Tween-20 i PBS, før tilsetning av 200 µl cellekultur-supernatanter som inneholdt det utskilte antistoff (inkubering ved 37 °C i én time). Brønnene ble vasket seks ganger med vaskebuffer, før deteksjon av bundet antistoff med geit anti-human kappa-lettkjede peroksidase-konjugat.

Rensing av cB-B4 / nBT062 fra cellekultur-supernatanter

cB-B4-antistoffet ble rensset fra supernatanter av transformerte COS 7-celler ved bruk av Protein A ImmunoPure Plus Kit (Pierce, Rockford, IL), i henhold til produsentens anbefalinger.

cB-B4 bindings- og konkurranseanalyse

Analyse av bindingsaktiviteten til B-B4 og cB-B4 overfor CD138 ble utført ved bruk av Diaclone (Besançon, France) sCD138 Kit i henhold til produsentens anbefalinger, tatt i betraktning endringene som er beskrevet i resultatavsnittet.

RNA-fremstilling og cDNA-syntese

Hybridom B-B4-celler ble dyrket og prosessert ved bruk av Qiagen Midi Kit (Hilden, Germany) for å isolere RNA i henhold til produsentens protokoll. Ca. 5 µg B-B4 RNA ble underkastet revers transkripsjon for å produsere B-B4 cDNA ved bruk av Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) 1 st strand synthesis kit i henhold til produsentens protokoll.

Kloning av B-B4-immunglobulin-cDNA

Immunglobulin-tungkjede-(IgH)-cDNA ble amplifisert ved PCR ved bruk av IgH-primeren MHV7 (5'-ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG-3') [SEQ ID NO:3] og IgG1 konstant region-primer MHCG1 (5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3') [SEQ ID NO:4]. På lignende måte ble

immunglobulin-lettkjede-(IgL) amplifisert ved bruk av de tre forskjellige Igκ-primerne MKV2 (5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTG-3') [SEQ ID NO:5], MKV4 (5'-ATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTCTTG-3') [SEQ ID NO:6] og MKV9 (5'-ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') [SEQ ID NO:7], hver i kombinasjon med primer MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3') [SEQ ID NO:8]. Alle amplifiseringsprodukter ble direkte ligert med pCR2.1-TOPO-vektoren ved bruk av TOPO-TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) i henhold til produsentens instruksjoner.

E. coli TOP10-bakterier (Invitrogen) transformert med de ligerte pCR2.1 vektorkonstruksjoner ble utvalgt på LB-ampicillin-Xgal agarplater. Småskala-kulturer ble inokulert med enkeltvise, hvite kolonier og ble dyrket natten over, og plasmider ble isolert ved bruk av QIAprep Spin Miniprep kit i henhold til produsentens instruksjoner.

cDNA-sekvensbestemmelse

Plasmider ble sekvensert ved bruk av BigDye Termination v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI, Foster City, CA). Hvert utvalgte plasmid ble sekvensert i begge retninger ved bruk av 1210 og 1233 primere syklisert på en GeneAmp9600 PCR-maskin. Den elektroforetiske sekvensanalysen ble utført på en ABI kapillærsekvenser.

Den komplette syklus av RT-PCR, kloning og DNA-sekvensanalyse ble gjentatt for å oppnå tre fullstendig uavhengige sett med sekvensinformasjon for hver immunglobulinkjede.

B-B4 V_κ DNA-sekvens

Første tråd-syntese ble utført i tre uavhengige reaksjoner. PCR-produktene som ble generert ved bruk av primerne MKC og MKV2 (sekvenser oppgitt ovenfor), ble ligert inn i pCR2.1-TOPO-vektorer i henhold til produsentens instruksjoner. Kloner fra hvert uavhengige sett av RT-PCR-reaksjoner ble sekvensert i begge retninger. MKV2-primet produktsekvens var svært lik sterile kappa-transkripter med opprinnelse fra myelom-fusjonspartneren, som MOPC-21, SP2 og Ag8 (Carroll et al., Mol Immunol., 25 (1988), 991; Cabilly et al., Gene, 40 (1985); 157) og ble derfor sett bort fra.

PCR-produktene ved bruk av MKC med MKV4- og MKV9-, primere lignet hverandre og avvek bare ved wobble-posisjonene innenfor ledersekvens-primeren.

B-B4 VH DNA-sekvens

5

Syntese av første tråd ble utført i tre uavhengige reaksjoner, og PCR-produktene ble klonet og sekvensert fra hvert første tråd-produkt. Fem kloner ble sekvensert fra hver første tråd.

Konstruksjon av kimære cB-B4-ekspresjonsvektorer

10

Konstruksjonen av de kimære ekspresjonsvektorene innebærer addisjon av en egnet ledersekvens til VH og V_K , fortsatt med et BamHI-restriksjonssted og en Kozak-sekvens. Kozak konsensussekvens er avgjørende for effektiv translasjon av en variabel region-sekvens. Det definerer det korrekte AUG-kodon der et ribosom kan starte translasjon, og den aller viktigste basen er adeninet (eller mindre foretrukket et guanin) ved posisjon -3, oppstrøms for AUG-starten. Ledersekvensen blir utvalgt som den mest like sekvens i Kabat-databasen (Kabat *et al.*, NIH National Technical Information Service, 1991). Disse addisjonene blir kodet i foroverprimerne (For-primerne) (begge har sekvensen 5'-AGAGAAGCTTGCCGCCACCATGATT-GCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCC-3' [SEQ ID NO:9]; restriksjonssted er understreket; Kozak-sekvens er i fete typer). Konstruksjonen av kimære ekspresjonsvektorer omfatter innføring av et 5'-fragment av den humane gamma1 konstante regionen, opptil et naturlig ApaI restriksjonssted, tilgrensende til 3'-enden av J-regionen av B-B4 og, for lettkjeden, tilføye et splice donor-sted og HindIII-sted. Splice donor-sekvensen er viktig for korrekt binding, i leseramme, av den variable regionen til dens passende konstante region, og følgelig splicing av V:C-intronet. Kappa-intronet + CK blir kodet i ekspresjonskonstruktet nedstrøms for B-B4 V_K -sekvensen. Tilsvarende er gamma-4 CH kodet i ekspresjonskonstruktet nedstrøms for B-B4 VH-sekvensen.

30

B-B4 VH- og V_K -gener ble først nøye analysert for å identifisere eventuelle uønskede splice donor-steder, splice akseptor-steder, Kozak-sekvenser og eventuell forekomst av ekstra subkloning restriksjonsteder som senere ville interferere med subkloning og/eller ekspresjon av funksjonelt intakt antistoff. Et uønsket HindIII-sted ble funnet i V_K -sekvensen og måtte fjernes ved stedsrettet

35

mutagenese via PCR uten endring av aminosyresekvensen. For disse reaksjonene ble det brukt oligonukleotid-primere BT03 (5'-CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGGACGTTCCGGTGG-3') [SEQ ID NO:10] og BT04 (5'-CCACCGAACGTCCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3') [SEQ ID NO:11], og mutagenese ble gjennomført i henhold til protokollen til Stratagene (La Jolla, CA) Quickchange Mutagenesis Kit.

Kappa -kjede kimeriseringsprimere

Den ikke-flertydige B-B4 V_K-ledersekvensen, uavhengig av PCR primersekvensen, ble sammenstilt med murine ledersekvenser i Kabat-databasen. Den nærmeste match for B-B4 VH-lederen var VK-10 ARS-A (Sanz et al., PNAS, 84 (1987), 1085). Denne ledersekvensen er predikert å bli kuttet korrekt av SignalP-algoritmen (Nielsen et al., Protein Eng, 10 (1997); 1). Primerne CBB4Kfor (se ovenfor) og g2258 (5'-CGCGGGATCCACTCACGTTTGATTCCAGCTTGGTGCCTCC-3'[SEQ ID NO:12]; Restriksjonssted er understreket) ble utformet for å generere et PCR-produkt som inneholder denne komplette lederen, B-B4 V_K-regionen og *Hind*III og *Bam*HI terminale restriksjonssteder, for kloning inn i pKN100 ekspresjonsvektor. Foroverprimeren, CBB4K innfører et *Hind*III restriksjonssted, et Kozak-sted for translasjonsinitiering og VK-10 ARS-A-leadersekvensen. Reversprimeren g2258 innfører et splice donor-sted og et *Bam*HI-restriksjonssted. Det resulterende fragment ble klonet inn i *Hind*III/*Bam*HI-restriksjonsstedene i pKN100.

Kimeriseringsprimere for tungkjede

Den ikke-tvetydige B-B4 VH ledersekvensen, uavhengig av PCR-primersekvensen, ble sammenstilt med murine ledersekvenser i Kabat-databasen. Den nærmeste match for B-B4 VK-lederen var VH17-1A (Sun et al., PNAS, 84 (1987), 214). Denne ledersekvensen er predikert å bli kuttet korrekt av SignalP-algoritmen. Primerne cBB4Hfor (se ovenfor) og g22949 (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGA-GACGGTGACTGAGGTTCC-3' [SEQ ID NO:13]; Restriksjonssted er understreket) ble utformet for å generere et PCR-produkt som inneholder VH17-1A-leader, B-B4 VH-regionen og terminal *Hind*III og *Apa*I restriksjonssteder, for kloning inn i pG4D200 ekspresjonsvektoren. Foroverprimeren cBBHFor innfører et *Hind*III-restriksjonssted, et Kozak-sted for translasjonsinitiering og VH17-1A-leadersekvensen. Reversprimeren g22949 innfører 5'-enden av gamma4 C-regionen og et naturlig *Apa*I restriksjonssted.

Det resulterende fragment ble klonet inn i *HindIII/ApaI* restriksjonsstedene i pG4D200, hvilket resulterte i vektor pG4D200cBB4.

Produksjon av cBB4-antistoff

5 Én ampulle med COS 7-celler ble tint og dyrket i DMEM supplert med 10 % Fetal clone I serum med antibiotika. Én uke senere ble cellene (0,7 ml med en konsentrasjon på 10^7 celler/ml) elektroporert med pG4D200cBB4 pluss pKN100cBB4 (10 µg DNA hver) eller ingen DNA. Cellene ble platet i 8 ml vekstmedium i 4 døgn. Elektroporeringen ble gjentatt syv ganger.

10 ***Deteksjon av kimært antistoff***

En sandwich ELISA ble brukt for å måle antistoffkonsentrasjoner i COS 7-supernatanter. Transient transformerte COS 7-celler utskilte ca. 6956 ng/ml antistoff (data ikke vist).

15 ***Bindingsaktivitet til cB-B4***

For å analysere bindingsaktiviteten til cB-B4 i COS 7-kultur-supernatanter, er Diaclone sCD138 kit blitt brukt, en sandwich ELISA med fast fase. Et monoklonalt antistoff som er spesifikt for sCD138, har fått dekke brønner i de tilveiebrakte mikrotiter-strips. Under første inkubering blir sCD138 og biotinyleret B-B4 (bio-B-B4) antistoff inkubert samtidig og sammen med en fortyningsserie av umerket test-antistoff (B-B4 eller cB-B4).

25 Konsentrasjonen av bio-B-B4 i denne analysen er blitt redusert for å oppnå konkurranse med lave konsentrasjoner av umerket antistoff (konsentrasjonen av cB-B4 i COS 7-cellekultur-supernatanter var ellers for lav til å oppnå tilstrekkelig konkurranse). Resultater fra denne analysen viser at begge antistoffer har samme spesifisitet for CD138 (data ikke vist).

Rensing av cB-B4

30

Kimært B-B4 ble rensset fra COS 7-celle-supernatanter ved bruk av Protein A ImmunoPure Plus kit (Pierce), i henhold til produsentens anbefalinger (data ikke vist).

K_D-bestemmelse: Sammenligning nBT062/ BB4

Rensing av løselig CD 138

Løselig CD138-antigen fra U-266-cellekultur-supernatant ble renset med FPLC ved bruk av en 1 ml "HiTrap NHS-activated HP"-kolonne koblet med B-B4. Cellekultur-supernatant ble hatt i PBS-buffer pH 7,4 på kolonnen, og senere ble CD138-antigen eluert med 50 mM tri-etylamin pH 11 i 2 ml fraksjoner. Eluert CD138 ble umiddelbart nøytralisert med 375 µl 1 M Tris-HCl, pH 3, for å hindre strukturelle og/eller funksjonelle skader.

Biotinylering av CD 138

Sulfo-NHS-LC (Pierce) ble brukt for å merke CD138. NHS-aktiverte biotiner reagerer effektivt med primære aminogrupeer som lysinrestene, i buffere med pH 7–9 og danner stabile amidbindinger.

For biotinylering av CD138 ble 50 µl CD138 avsaltet ("desalted") ved bruk av proteinavsaltende ("protein desalting") spinnkolonner (Pierce). Biotinyleringsreagenset (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) ble oppløst i isavkjølt, deionisert H₂O til en endelig konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Biotinyleringsreagens og capture-reagensløsning ble blandet og hadde 12 ganger molart overskudd av biotinyleringsreagens i forhold til capture-reagens (50 pmol CD138 til 600 pmol biotinyleringsreagens) og ble inkubert i 1 time ved romtemperatur mens ampullen ble rystet forsiktig. Ubundet biotinyleringsreagens ble fjernet ved bruk av proteinavsaltende kolonner.

Immobilisering av bCD138

Sensorchippen (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) som ble brukt i BIACORE-analysen, er utformet for å binde biotinylerte molekyler for interaksjonsanalyse i BIACORE-systemer. Overflaten består av en karboksymetylert dekstranmatriks som på forhånd er immobilisert med streptavidin og er klar for høyaffinitets capture av biotinylerte ligander. Immobilisering av bCD138 ble utført på SENSOR CHIP SA ved bruk av en strømningshastighet på 10 µl/min ved manuell injeksjon. Chip-overflaten ble behandlet med tre påfølgende 1-minutters injeksjoner med 1 M NaCl i 50 mM NaOH. Deretter ble biotinylert CD138 injisert i 1 minutt.

K_D-bestemmelse for forskjellige antistoffer ved bruk av BIACORE

Programvaren BIACORE C bruker forhåndsdefinerte masker, såkalte veivisere ("wizards"), for forskjellige forsøk hvor kun visse innstillinger kan endres. Siden

5 BIACORE C opprinnelig ble utviklet for å måle konsentrasjoner, er det ingen veiviser som er utformet for å utføre affinitetsmålinger. Med adekvate innstillinger kan imidlertid veiviseren for "ikke-spesifikk binding" brukes for å måle affinitetshastighetskonstantene og ble derfor brukt for K_D-bestemmelse. Med denne veiviseren ble to strømningsceller ("flow cells") målt, og

10 dissosiasjonsfasen ble innstilt på 90 s ved å utføre "Regenerering 1" med BIACORE kjøringsbuffer. "Regenerering 2", som tilsvarer den reelle regenerering, ble utført med 10 mM glysin-HCl pH 2,5. Etter dette trinnet var liganden CD138 i sin bindingskompetente tilstand igjen. Under hele prosedyren ble HBS-EP brukt som kjørings- og fortynningsbuffer. For å bestemme binding av de forskjellige

15 antistoffer (~150 kDa) til CD138, ble assosiasjon og dissosiasjon analysert ved forskjellige konsentrasjoner (100, 50, 25, 12.5, 6.25 og 3.13 nM). Dissosiasjonslikevekt-konstantene ble bestemt ved beregning av hastighetskonstantene k_a og k_d . Etterpå ble K_D-verdien for analyttene beregnet ved kvotienten av k_d og k_a med programvaren BIAevaluation. Resultatene er

20 vist i **Tabell 4**.

Tabell 4: Komparativ analyse av K_D verdier for nBT062 og B-B4. Standardavvik er oppgitt for gjennomsnittlige K_D-verdier.

Antistoff	Affinitet	
	K _D (nM)	gjennomsnittlig K _D (nM)
nBT062	1.4	1.4 +/- 0.06
	1.4	
	1.5	
B-B4	1.7	1.6 +/- 0.06
	1.7	
	1.6	
nBT062-SPDB-DM4	1.9	1.9 +/- 0.00
	1.9	

Antistoff	Affinitet	
	K _D (nM)	gjennomsnittlig K _D (nM)
	1.9	
B-B4-SPP-DM1	2.6	2.6 +/- 0.06
	2.7	
	2.6	

Drøfting

5 Gjennomsnittlige K_D-verdier for hvert antistoff ble beregnet for tre uavhengige forsøk. Resultatene viser at i alle målinger oppviser nBT062 svakt reduserte K_D-verdier sammenlignet med B-B4 (gjennomsnittlige K_D-verdier var henholdsvis 1,4 og 1,6 nM).

Fremstilling av immunkonjugater

10 **nBT062-DM1 og huC242-DM1**

15 Det tiolholdige maytansinoidet DM1 ble syntetisert fra det mikrobielle fermenteringsproduktet ansamitocin P-3, som tidligere beskrevet av Chari (Chari et al., Cancer Res. 1 (1992), 127). Fremstilling av humanisert C242 (huC242) (Roguska et al., PNAS, 91 (1994), 969) er beskrevet tidligere. Antistoff/legemiddel-konjugater ble fremstilt som beskrevet tidligere (Liu et al., PNAS, 93 (1996), 8618). Et gjennomsnitt på 3,5 DM1-molekyler ble koblet per antistoffmolekyl.

nBT062-DM4

20

BT062 er et antistoff/legemiddel-konjugat som er sammensatt av det cytotoksiske maytansinoid-legemidlet DM4, koblet med disulfidbindinger via en kobler til det kimeriserte, monoklonale nBT062-antistoff. Maytansinoider er anti-mitotika som hemmer tubulinpolymerisering og mikrotubulisammenstilling (Remillard et al., Science 189 (1977), 1002). Kjemisk og skjematisk fremstilling av BT062 (nBT062-DM4) er vist i FIG. 1 og 2.

25

Syntese av DM4

DM4 blir fremstilt fra det velkjente derivatet maytansinol (Kupchan et al., J. Med. Chem., 21 (1978), 31). Maytansinol blir fremstilt ved reduktiv spalting av estergruppen i det mikrobielle fermenteringsproduktet, ansamitocin P3, med litiumtrimetoksyaluminum-hydrid (se FIG. 3).

DM4 blir syntetisert ved acylering av maytansinol med N-metyl-N-(4-metylditiopentanoyl)-L-alanin (DM4-sidekjede) i nærvær av dicykloheksylkarbodiimid (DCC) og sinkklorid, hvilket gir det disulfidholdige maytansinoidet DM4-SMe. DM4-SMe blir redusert med ditiotreitol (DTT) til det ønskede tiolholdige maytansinoid DM4 (se FIG. 4 for prosessflytdiagrammet for DM4).

Immunkonjugat BT062

Prosedyren for fremstilling av nBT062-DM4 er skissert i FIG. 5. nBT062-antistoffet blir modifisert med N-succinimidyl-4-(2-pyridylditio)butyrat (SPDB-kobler) for å innføre ditiopyridylgrupper. DM4 blir blandet med det modifiserte antistoffet i en konsentrasjon som gir overskudd av ekvivalenter av ditiopyridylgrupper. BT062-konjugatet dannes ved en disulfutvekslingsreaksjon mellom tiolgruppen i DM4 og ditiopyridylgruppene som ble innført i antistoffet via kobleren. Rensing med kromatografi og diafiltrering fjerner de lavmolekylære reaktantene (DM4) og reaksjonsproduktene (tiopyridin), så vel som aggregater av konjugert antistoff, hvilket gir partiet med legemiddelsubstans.

FACS-analyse og WST cytotoxissitetsanalyse

FACS-analyse

OPM-2-celler er plasmacelle leukemicellelinjer med høy ekspresjon av CD138. OPM-2-celler ble inkubert med nBT062, nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 eller nBT062-SMCC-DM1 i forskjellige konsentrasjoner (indikert i FIG. 6). Cellene ble vasket, og CD138-bundet antistoff eller konjugater ble påvist ved bruk av et fluorescens-merket, sekundært antistoff i FACS-analyse. Gjennomsnittlig fluorescens målt i disse forsøkene, ble plottet mot antistoffkonsentrasjonen.

Analyse av cellenes levedyktighet

CD138⁺ MOLP-8-celler var podet i flatbunnede plater i en konsentrasjon på 3000 celler/brønn. CD138⁻ BJAB kontrollceller ble podet i en konsentrasjon på 1000 celler/brønn. Cellene ble behandlet med nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 eller nBT062-SMCC-DM1 i forskjellige konsentrasjoner (indikert i FIG. 7) i fem døgn. WST-reagens (vannløselig tetrazoliumsalt, ROCHE) ble tilsatt for å måle cellenes levedyktighet i henhold til produsentens instruksjoner (ROCHE). Reagenset ble inkubert i 7,5 timer på MOLP-8-celler og i 2 timer på BJAB-celler. Fraksjonen av overlevende celler ble beregnet basert på de optiske tettheter målt i en mikroplateleser ved bruk av standard prosedyrer.

Drøfting

Binding av nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1, nBT062-SMCC-DM1 eller nBT062 ble analysert med FACS. CD138⁺ OPM-2 som målceller ble inkubert med nBT062 eller immunkonjugater, og cellebundne molekyler ble påvist ved bruk av et fluorescens-merket, sekundært antistoff. I FIG. 6 er gjennomsnittlig fluorescens som et mål på mengden av cellebundet antistoff, plottet mot forskjellige antistoff- eller konjugatkonsentrasjoner. Resultatene viser at nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 og nBT062-SMCC-DM1 oppviser svært like bindingsegenskaper. Dessuten gir resultatene en sterk indikasjon på at bindingsegenskapene til det ukonjugerte antistoffet, ikke blir påvirket av de konjugerte toksiner.

I analysen av cellenes levedyktighet analyserte man antistoffets cytotoksiske virkning mot CD138⁺ MOLP-8 målceller og mot CD138⁻ BJAB B-lymfoblastom-kontrollceller. Begge cellelinjer ble podet i flatbunnede plater og inkubert med økende konsentrasjoner av immunkonjugatene. Ukonjugert antistoff ble brukt som en kontroll. Den cytotoksiske virkning ble analysert fem dager etter tilsetning av immunkonjugatene, ved bruk av WST-reagens for å måle cellenes levedyktighet. I FIG. 7(A)-(C) er fraksjonen av overlevende celler i forhold til kontrollceller behandlet med bærerkontroll, plottet mot økende konsentrasjoner av immunkonjugat. Resultatene viser at den cytotoksiske virkning av nBT062-SPDB-DM4, nBT062-SPP-DM1 og nBT062-SMCC-DM1 mot MOLP-8-celler er svært lik. Som forventet ble CD138⁻ BJAB kontrollceller ikke drept av immunkonjugatene, hvilket indikerer at alle immunkonjugater virker via

cellespesifikk binding til CD138. I kompetitive forsøk ble MOLP-8-celler preinkubert med et molart overskudd av ukonjugert nBT062. Preinkubering ga vesentlig blokkering av cytotoxisiteten til nBT062-SPDB-DM4, hvilket ga ytterligere evidens for at immunkonjugatene dreper cellene via spesifikk binding til CD138 på celleoverflaten (FIG. 7 (D)).

Forsøk med xenografts på mus

For å evaluere betydningen av CD138-målretting for anti-tumor-aktiviteten til antistoff/maytansinoid-konjugater av en human kimær versjon av B-B4-antistoffet, nBT062, ble det utført forsøk med xenografts på mus. Det ble fremstilt to versjoner av nBT062/maytansinoid-konjugater som kan ha forskjellig disulfidkoblinger med ulik stabilitet (nBT062-SPP-DM1 og nBT062-SPDB-DM4). Anti-tumoraktiviteten til disse antistoff/legemiddel-konjugatene ble sammenlignet med aktiviteten til B-B4-SPP-DM1-konjugatet (som omfatter det murine opprinnelige antistoff), så vel som ukonjugert fritt maytansinoid (DM4), opprinnelig umodifisert nBT062-antistoff, og et ikke-målrettet (irrelevant) IgG1/maytansinoid-konjugat. Konjugatene ble evaluert i en CD138-positiv xenograftmodell (MOLP-8) for humant multippelt myelom hos SCID-mus (severe combined immunodeficient).

Hos disse musene ble det etablert subkutane tumorer (CB.17 SCID hunnmus) ved inokulering med MOLP-8-cellesuspensjoner. Behandling med en enkelt intravenøs bolusinjeksjon ble utført når tumorvolumene hadde nådd et gjennomsnitt på 113 mm³. Endringer i tumorvolum og kroppsvekt ble undersøkt to ganger per uke. Forsøkene ble utført i 68 dager etter tumorcelleinokulering.

Forsøk A med xenograft-mus

Mus

CB.17 SCID hunnmus, fem uker gamle, ble anskaffet fra Charles River Laboratories.

Humane tumorcellelinjer

MOLP-8, en human multippelt myelom-cellelinje, ble anskaffet fra ATCC. MOLP-8-celler, som uttrykker CD138-antigenet på celleoverflaten og utvikler xenograft-tumorer hos SCID-mus, ble vedlikeholdt i RPMI-1640-medium supplert med 4 mM L-glutamin (Biowhittaker, Walkersville, MD), 10 % føtalt bovins serum (Hyclone, Logan, Utah) og 1 % streptomycin/penicillin, ved 37 °C i en fuktig atmosfære som inneholdt 5 % CO₂.

DEL I

Tumorvekst hos mus

10

Hver mus ble inokulert med 1×10^7 MOLP-8-celler subkutan i området area høyre skulder. Det totale volum per mus var 0,2 ml, hvor forholdet mellom serumfritt medium og matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) var 1/1 (volum/volum). Før behandling ble xenograft-tumorene overvåket daglig og fikk bli etablert. Tumorvolumet nådde omtrent 113 mm³ ca. 11 dager etter tumorcelleinokulering. Graden av tumoretablering ("tumor take rate") hos CB.17 SCID-mus var 100 %.

15

20

Elleve dager etter tumorcelle-inokulering ble 42 mus utvalgt på bakgrunn av tumorvolum og kroppsvekt. Tumorvolumet var innenfor et område på 68,2 til 135,9 mm³. De førtito musene ble randomisert i syv grupper (A-G) på seks dyr hver, basert på tumorvolum.

25

30

Hver av de seks musene i Gruppe A fikk 200 µl PBS som bærerkontroll. Hver mus i gruppe B fikk 13,8 mg/kg nakent nBT062-antistoff. Denne dosen tilsvarer mengden av nBT062-antistoff-komponent i 250 µg/kg av koblet maytansinoid. Forholdet mellom molekylvektene til maytansinoider og nBT062-antistoff i et konjugatmolekyl, er omtrent 1/55. Hver mus i Gruppe C fikk 250 µg/kg av DM4. Hver mus i Gruppe D fikk 250 µg/kg av huC242-DM4. Hver mus i Gruppe E, F og G fikk 250 µg/kg av henholdsvis nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 og nBT062-SPP-DM1.

35

Alle midler ble administrert intravenøst som en enkelt bolusinjeksjon i en lateral halevene ved bruk av en 1 ml sprøyte med en kanyle på 27 gauge, ½ tomme. Før administrering ble stamløsninger av nBT062-antistoff, nBT062-SPDB-DM4 og nBT062-SPP-DM1 fortynnet med steril PBS til en konsentrasjon på henholdsvis 2

mg/ml, 28,1 µg/ml og 28,1 µg/ml, slik at det injiserte volum for hver mus var mellom 120–220 µl.

DEL II

- 5 I et annet forsøkssett ble MOLP-8-celler ($1,5 \times 10^7$ celler per mus) oppslemmet i en 50:50-blanding av serumfritt media og matrigel, injisert subkutan, i et volum på 100 µl, i området under høyre skulder. Tumorvolumene nådde ca. 80 mm³ ved dag 11, og gjennomsnittet for kontrollene var ca. 750 mm³ ved dag 25, etter celleinokulering. Tiden til doblet tumorvolum ble estimert til 4,58 dager.
- 10 Hver mus i kontrollgruppen (n=6) fikk 0,2 ml steril PBS administrert i den laterale halevenen (i.v.) som en bolusinjeksjon. Alle behandlingsdoser var basert på konjugert maytansinoid. Ni grupper (n=6) ble behandlet med en enkelt intravenøs injeksjon av nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 eller nBT062-SPP-DM1 i doser på henholdsvis 450, 250 og 100 µg/kg. En ytterligere gruppe
- 15 (n=6) fikk gjentatte doser på 250 µg/kg av nBT062-SMCC-DM1 (ukentlig i fem uker). Musene ble randomisert i elleve grupper (n=6) etter tumorvolum, ved bruk av programmet LabCat. Tumorvolumene ble rangert fra 40,0 til 152,5 mm³. Dosene til musene var basert på individuell kroppsvekt.
- 20 Tumorstørrelsen ble målt i tre dimensjoner to ganger per uke ved bruk av LabCat System (Tumor Measurement and Tracking, Innovative Programming Associated, Inc., Princeton, NJ). Tumorvolumet i mm³ ble beregnet ved bruk av metodologien som er beskrevet i Tomayko et al., Cancer Chemother. Pharmacol, 24 (1989), 148:
- 25 **Volume=Length x Width x Height x $\frac{1}{2}$**
- Log₁₀ for celledrap ble beregnet med formelen som er beskrevet i Bissery et al., Cancer Res., 51 (1991), 4845:
- Log₁₀ cell kill = (T-C) / T_d x 3.32**
- 30 hvor (T-C) eller tumorvekstforsinkelse er median tid i døgn som er nødvendig før tumorer i behandlingsgruppen (T) og kontrollgruppen (C) når en forhåndsbestemt størrelse (600 mm³). T_d er tiden til dobling av tumoren, basert

på median for tumorvolum hos kontrollmusene, og 3,32 er antall celledoblinger per log for cellevekst.

Resultater

5 Tumorveksten hos individuelle mus er vist i FIG. 8 og 9. Gjennomsnittlig (+/- SD) tumorvekst for hver gruppe er vist i FIG. 10.

Sammenlignet med tumorvekst hos dyr forhåndbehandlet med PBS, forårsaket behandling med nBT062-antistoff, ukonjugert fritt DM4 eller det irrelevante ikke-målrettede konjugat huC242-DM4 ikke noen signifikant hemming av tumorvekst.

Alle tre CD138-målrettede konjugater, nBT062-SPDB-DM4, B-B4-SPP-DM1 og nBT062-SPP-DM1, i en dose på 250 µg/kg, forårsaket markert forsinket tumorvekst. Basert på de gjennomsnittlige tumorvolum som ble målt for behandlingsgruppene, var DM4-konjugatet nBT062-SPDB-DM4 det mest aktive, mens nBT062-SPP-DM1-konjugatet viste svakt økt aktivitet sammenlignet med dets murine motstykke B-B4-SPP-DM1 (FIG. 10). Resultatene som ble oppnådd for individuelle mus viser dessuten at anti-tumoraktiviteten som ble oppnådd med B-B4-SPP-DM1, er mer heterogen og derfor mindre forutsigbar enn hos mus behandlet med nBT062-SPP-DM1. Når det gjelder homogenitet av anti-tumoraktivitet, hadde, ved bruk av det andre konjugatet, der nBT062 er målrettet antistoff, nBT062-SPDB-DM4 lignende egenskaper som nBT062-SPP-DM1.

25 Ingen reduksjon av kroppsvekt ble observert i noen av behandlingsgruppene, hvilket tyder på at behandlingen ble godt tolerert.

Drøfting

30 Resultatet fra analysen av tre CD138-målrettede konjugater i dyreforsøk, viste betydningen av målrettet avlevering for anti-tumor-aktiviteten. Mens maytansinoid-konjugater av humant kimært nBT062 og murine B-B4-antistoffer, viste signifikant aktivitet, målt som loggcelledrap, var det ingen signifikant innvirkning på tumorvekst ved behandling med ukonjugert DM4, umodifisert opprinnelig huBT062-antistoff eller et ikke-målrettet kontrollkonjugat (huC242-DM4).

Immunkonjugatet som ble fremstilt fra humant kimært antistoff, nBT062-SPP-DM1, gav svakt høyere anti-tumoraktivitet enn konjugatet som ble fremstilt fra dets murine motstykke, B-B4-SPP-DM1. Dessuten resulterte behandling med nBT062-SPP-DM1 og nBT062-SPDB-DM4 i mer homogene responser hos individuelle mus enn behandling med B-B4-SPP-DM1. Den høye bindingsvariasjonen for B-B4-SPP-DM1 forklarte hvorfor målingen av median for tumorvolum (+/- SD) av MOLP-8 humant multippelt myelom-xenograft hos CB.17 SCID-mus over tid (døgn) etter inokulering, faktisk ga relativt bedre resultater for B-B4-SPP-DM1 enn for nBT062-SPP-DM1 (data ikke vist). Dette trekket ved immunkonjugater der nBT062 brukes som et målrettet antistoff, synes å være fordelaktig, spesielt med tanke på terapeutisk bruk av konjugatene.

Det mest potente av maytansinoid-konjugatene, etter en enkelt i.v. administrering i MOLP-8 xenograft-modellene med SCID-mus, var nBT062-SPDB-DM4.

Forsøk B med xenograft-mus

I dette forsøkssettet ble åttifem mus inokulert med MOLP-8-celler ($1,5 \times 10^7$ celler/mus) subkutan i høyre skulder. Graden av tumoretablering var 100 %. Sekstiseks SCID-mus som hadde store MOLP-8-tumorer med et gjennomsnittlig tumorvolum på ca. 80 mm^3 , ble randomisert til elleve behandlingsgrupper ($n=6$). Musene ble behandlet med en enkeltdose av ett av tre konjugater (nBT062-SMCC-DM1, nBT062-SPDB-DM4 eller nBT062-SPP-DM1). En ytterligere gruppe fikk fem ukentlige doser av nBT062-SMCC-DM1, og en kontrollgruppe fikk en enkeltdose av PBS. Gjennomsnittlige tumorvolumer er vist i **FIG. 11A**. En doserespons ble fastslått for hvert konjugat. En median for tumorvolum på 750 mm^3 hos de PBS-behandlede dyrene, ble nådd på dag 25. Tid til tumordobling, bestemt ved den best tilpassede lineære regresjonskurven tilpasset et log-lineært plott av kontroll-tumorvekst, var 4,58 dager. Dyr behandlet med nBT062-SPDB-DM4 i en dose på 450 µg/kg , hadde høyeste loggcelledrap ($\text{LCK}=2,89$), fulgt av dyr behandlet med nBT062-SMCC-DM1 med en ukentlig dose på 250 µg/kg ($\text{LCK}=2,1$; se Tabell 5). Sammenligning av kurver for gjennomsnittlig tumorvekst hos behandlingsgruppene ved gjentatt måling av ANOVA ved utførelse av Dunnett's Multiple Comparison Test, viste en signifikant forskjell mellom PBS-kontrollgruppen og 450 µg/kg nBT062-SPDB-DM4

($p < 0,01$), 250 $\mu\text{g/kg}$ nBT062-SPDB-DM4 ($p < 0,05$) og fem ukentlige doser av 250 $\mu\text{g/kg}$ nBT062-SMCC-DM1 ($p < 0,05$). Delvis eller fullstendig tumorregresjon forekom ikke i noen av behandlingsgruppene, bortsett fra hos ett dyr som fikk 450 $\mu\text{g/kg}$ nBT062-SPDB-DM4 og som hadde delvis regresjon av tumoren inntil dag 85 etter inokulering.

Tabell 5. LCK-verdier ("log cell kill"), målt som anti-tumoraktivitet av forskjellige nBT062-DMx-konjugater i forskjellige doseringsskjemaer. Det henvises til avsnittet Materialer og fremgangsmåter for informasjon om beregning av LCK-verdier.

Testmateriale	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	LCK	Dosering
PBS			enkeltdose
nBT062-SMCC-DM1	450	0.85	enkeltdose
nBT062-SMCC-DM1	250	0.53	enkeltdose
nBT062-SMCC-DM1	100	0	enkeltdose
nBT062-SPDB-DM4	450	2.89	enkeltdose
nBT062-SPDB-DM4	250	1.05	enkeltdose
nBT062-SPDB-DM4	100	0.39	enkeltdose
nBT062-SPP-DM1	450	0.8	enkeltdose
nBT062-SPP-DM1	250	0.39	enkeltdose
nBT062-SPP-DM1	100	0.2	enkeltdose
nBT062-SMCC-DM1	250	2.1	ukentlig i 5 uker

Referanser:

Akkina RK, Rosenblatt JD, Campbell AG, Chen IS, Zack JA. Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse. Blood. 1994;84:1393-1398.

Armour KL, Clark MR, Hadley AG, et al. Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 1999; 29(8):2613-24.

- Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. 2001 Jun; 32(3):297-305.
- Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):474-83.
- Bataille R, Jégou G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234-40. Review.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lise EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365-393.
- Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96, 1898-1903.
- Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett*. 1977;75:159-162.
- Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Müller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2079-89. Epub 2005 Nov 8.
- Blättler WA and Chari RVJ. Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs. In: Ojima, I., Vite, G.D. and Altmann, K.-H., Editors, 2001. *Anticancer Agents- Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 317-338.
- Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1490-1496.
- Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, Ferlito A, Rinaldo A, Stein H. AIDS-related plasma- blastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 1999; 108: 95-99.

Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J* 1978; 173: 723-737.

Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:118-129.

Chari RV, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blattler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res*. 1992;52:127-131.

Chari RV, Jackel KA, Bourret LA, Derr SM, Tadayoni BM, Mattocks KM, Shah SA, Liu C, Blättler WA and Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res*. 1995; 55: 4079-4084.

Charnaux N, Brule S, Chaigneau T, Saffar L, Sutton A, Hamon M, Prost C, Lievre N, Vita C, Gattegno L. RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. *Glycobiology*. 2004 Sep 8 [Epub ahead of print]

Chen BP, Galy A, Kyoizumi S, Namikawa R, Scarborough J, Webb S, Ford B, Cen DZ, Chen SC. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*. 1994;84:2497-2505.

Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*. 1999;12:1101-1106.

Clement C, Vooijs, W.C., Klein, B., and Wijdenes, J. In: al. SFSe, ed. J. Leukocyte Typing V. Oxford: Oxford University Press; 1995:714-715.

Couturier O, Faivre-Chauvet A ; Filippovich IV; Thedr  z P, Sa  -Maurel C; Bardi  s M; Mishra AK; Gauthrit M; Blain G; Apostolidis C; Molinet R; Abbe JC; Bateille R; Wijdenes J; Chatal JF; Cherel M; Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 5(10 Suppl.) (Oct 1999) 3165s-3170s.

Davies EJ et al., Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer *Clin Cancer Res*. 2004; 10(15):5178-86.

Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of

tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*. 1998;91:2679-2688.

Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett*. 1998;426:67-70.

Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:1206-1214.

Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia*. 1999;1:303-310.

Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol*. 1999;104:152-162.

Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upešlacijs J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem*. 2002;13:40-46.

Han I, Park H, Oh ES. New insights into syndecan-2 expression and tumorigenic activity in colon carcinoma cells. *J Mol Histol*. 2004; 35(3):319-26.

Horvathova M, Gaillard, J.-P., Liutard, J., Duperray, C., Lavabre-Bertrand, T., Bourquard, P et al. In: al. *SFSe*, ed. *Leucocyte Typing V*. Oxford: Oxford University Press; 1995:713-714.

Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. 2001. *J. Immunol. Methods* 254, pp. 67-84.

Kupchan SM, Sneden AT, Branfman AR, Howie GA, Rebhun LI, McIvor WE, Wang RW, Schnaitman TC. Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids. *J Med Chem*. 1978;21:31-37.

Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H, McCune JM, Yee EJ, Namikawa R. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*. 1992;79:1704-1711.

Kyoizumi S, Murray LJ, Namikawa R. Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1993;81:1479-1488.

Langford JK, Stanley MJ, Cao D, Sanderson RD. Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29965-71.

5 Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blattler WA, Chari RV. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:8618-8623. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science.* 10 1988;241:1632-1639.

Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz HD, Thierauch KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer.* 2004 Jun; 40(9):1373-82.

15 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice. *Blood.* 1993;82:2526-2536.

O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:254-263.

20 Ojima I, Geng X, Wu X, Qu C, Borella CP, Xie H, Wilhelm SD, Leece BA, Bartle LM, Goldmacher VS and Chari RV. Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates. 2002. *J. Med. Chem.* 45, pp. 5620-5623.

25 Olafsen, T, Cheung, CC, Yazaki, PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman, MA, Williams, LE, Shively, JE, Raubitschek, AA, and Wu, AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. 2004; *Prot. Eng. Design & Selection* 17:1: 21-27.

Orosz Z, Kopper L. Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. *Anticancer Res.* 2001; 21(1B):733-7.

30 Padlan, EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 1991; 28: 489-498.

Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 35 2003;3:207-212.

Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA and Slamon DJ. Phase II study of receptor-

enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. 1998. *J. Clin. Oncol.* 16, pp. 2659-2671.

5 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997;97:46-55.

10 Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science.* 1975;189:1002-1005.

Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:969-973.

15 Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, Lutz RJ, Frantz G, Hillan K, Peale F, Tobin P, Eberhard D, Rubin MA, Lasky LA, Koeppen H. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2546-53.

20 Ross JS, Gray K, Gray G, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer Antibodies, *Am J Clin Path.* (4/17/2003).

Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989;1:27-35.

25 Sandhu JS, Clark BR, Boynton EL, Atkins H, Messner H, Keating A, Hozumi N. Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone. *Blood.* 1996;88:1973-1982.

Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res.* 1995;55:3551-3557.

30 Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *Br J Haematol.* 1997;97:56-64.

35 Schuurman J, Van Ree R, G. J. Perdok GJ, Van Doorn HR, Tan KY, Aalberse RC, Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites, *Immunology* 1999; 97:693-698.

- Sebestyen A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol.* 1999; 104(2):412-9.
- Seftalioglu A, Karakus S. Syndecan-1/CD138 expression in normal myeloid, acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells. *Acta Histochem.* 2003;105:213-221.
- Seftalioglu A, Karakus S, Dundar S, Can B, Erdemli E, Irmak MK, Oztas E, Korkmaz C, Yazar F, Cavusoglu I. Syndecan-1 (CD138) expression in acute myeloblastic leukemia cells--an immuno electron microscopic study. *Acta Oncol.* 2003;42:71-74.
- Senter PD, Doronina S, Cervený C, Chace D, Francisco J, Klussman K, Mendelsohn B, Meyer D, Siegall CB, Thompson J et al. (2002). Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates. Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.), 414.
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG.. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001; 276(9):6591-604.
- Sievers EL, Larson R.Å., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L. et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. 2001. *J. Clin. Oncol.* 19, pp. 3244-3254.
- Sievers EL and Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. 2001. *Curr. Opin. Oncol.* 13, pp. 522-527.
- Smith R., Single chain antibody variable region fragments; www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html (last updated on May, 2001).
- Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng.* 1994; 7(6): 805-814.
- Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shammass MA, Whiteman KA, Hylander-Gans LL, Carrasco DR, Hideshima T, Shringarpure R, Shi J, Allam CK, Wijdenes J, Venuta S, Munshi NC, Anderson KC, Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells, *Blood*, 2004, 104 (12), pp. 3688-3696.

- Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, Patnaik A, Edwards T, Takimoto C, Smith L, de Bono J, Schwartz G, Mays T, Jonak ZL, Johnson R, DeWitte M, Martino H, Audette C, Maes K, Chari RV, Lambert JM, Rowinsky EK. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *J Clin Oncol.* 2003;21:211-222.
- Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dederda DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood.* 1997;90:754-765.
- Vogel CW. Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties. *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods.* 2004;283:087-108.
- Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, Stirpe F, Bast EJ, de Gast GC. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;42:319-328.
- Ward, E.S., D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, and G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 1989. 341:544-546.
- Wargalla UC, Reisfeld RA. Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:5146-5150.
- Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996; 94:318-323.
- Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138, *J Biol Regul Homeost Agents.* 2002 Apr-Jun;16(2):152-5.
- Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmman JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry.* 1996;26:113-120.
- Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;308(3):1073-82.

Yang M, Jiang P, An Z, Baranov E, Li L, Hasegawa S, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. Clin Cancer Res. 1999;5:3549-3559.

5 Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:1206-1211.

10 Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodavsky I, Suva LJ, Epstein J, Yaccoby S, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Sanderson RD. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. Blood. 2007 Sep 15;110(6):2041-8. Epub 2007 May 29.

15 Yoshitake S, Yamada Y, Ishikawa E, Masseyeff R. Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. Eur J Biochem 1979;101:395-399.

Patentkrav

1. Immunkonjugat som omfatter et konstruert, målrettet antistoff som gjenkjenner CD138, og et effektormolekyl for indusering av celledød, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet omfatter en tungkjede som har minst 90 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 1, og en lettkjede som har minst 90 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 2, hvori (a) tungkjeden omfatter aminosyrerestene 31 til 35 (CDR1), 51 til 68 (CDR2) og 99 til 111 (CDR3) av SEQ ID NO:1, og (b) lettkjeden omfatter aminosyrerestene 24 til 34 (CDR1), 50 til 56 (CDR2) og 89 til 97 (CDR3) av SEQ ID NO:2, og hvori det konstruerte, målrettede antistoff er av en IgG4-isotype.
2. Immunkonjugatet ifølge krav 1, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet videre omfatter aminosyrerestene 123 til 448 av SEQ ID NO: 1, og mutasjoner derav som

 - (i) bevarer eller reduserer den antistoffavhengige cytotoxisiteten og/eller komplementavhengige cytotoxisiteten til det konstruerte, målrettede antistoffet, og/eller
 - (ii) stabiliserer det konstruerte, målrettede antistoffet,

mer foretrukket hvori: (a) tungkjeden har minst 95 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 1; og (b) lettkjeden har minst 95 % sekvensidentitet med SEQ ID NO: 2.
3. Immunkonjugatet ifølge krav 1, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet er et kimært humant/muse-antistoff.
4. Immunkonjugatet ifølge krav 1, hvori det konstruerte, målrettede antistoffet omfatter en tungkjede som har SEQ ID NO: 1 og en lettkjede som har SEQ ID NO: 2.
5. Farmasøytisk sammensetning som omfatter immunkonjugatet ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, og en farmasøytisk akseptabel bærer.
6. Immunkonjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, for anvendelse i medisin.
7. Immunkonjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, for anvendelse i en behandling målrettet mot tumorceller, hvori det konstruerte, målrettede antistoff i immunkonjugatet, binder CD138 uttrykt på CD138-uttrykkende celler.

SEKVENSLISTE

<110> Biotest AG

<120> AGENTS TARGETING CD138 AND USES THEREOF

<130> 319936.WO/JND/CJS

<150> 61/016,630

<151> 2007-12-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amino Acid sequence (predicted) of heavy chain of chimeric human/mouse antibody

<220>

<221> CDR1

<222> (31)..(35)

<220>

<221> CDR2

<222> (51)..(68)

<220>

<221> CDR3

<222> (99)..(111)

<220>

<221> region IgG4

<222> (123)..(448)

<400> 1

2

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

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

4

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

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

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

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

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amino Acid sequence (predicted) of light chain of chimeric human/mouse antibody

<220>

<221> CDR1

<222> (24)..(34)

<220>

<221> CDR2

<222> (50)..(56)

<220>

<221> CDR3

<222> (89)..(97)

<220>

<221> region IgG4

<222> (108)..(214)

<400> 2

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgH primer MHV7

<400> 3

atgggcatca agatggagtc acagaccag g 31

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> IgG1 constant region primer MHCG1

<400> 4

cagtggatag acagatgggg g 21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ig kappa primer MKV2

6

<400> 5

atggagacag acacactcct gctatgggtg 30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Ig kappa primer MKV4

<400> 6

atgagggccc ctgctcagtt ttttggcttc ttg 33

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Ig kappa primer MKV9

<400> 7

atggatatcca cacctcagtt ccttg 25

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer MKC

<400> 8

actggatggt gggaagatgg 20

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward (For) primer

<400> 9

agagaagctt gccgccacca tgattgcctc tgctcagttc cttggtctcc 50

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer BT03

<400> 10

caacagtata gtaagctccc tcggacgttc ggtgg 35

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer BT04

<400> 11

ccaccgaacg tccgagggag ctactatac tgttg 35

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer g2258

<400> 12

cgcgggatcc actcacgttt gatttcagc ttggtgcctc c 41

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

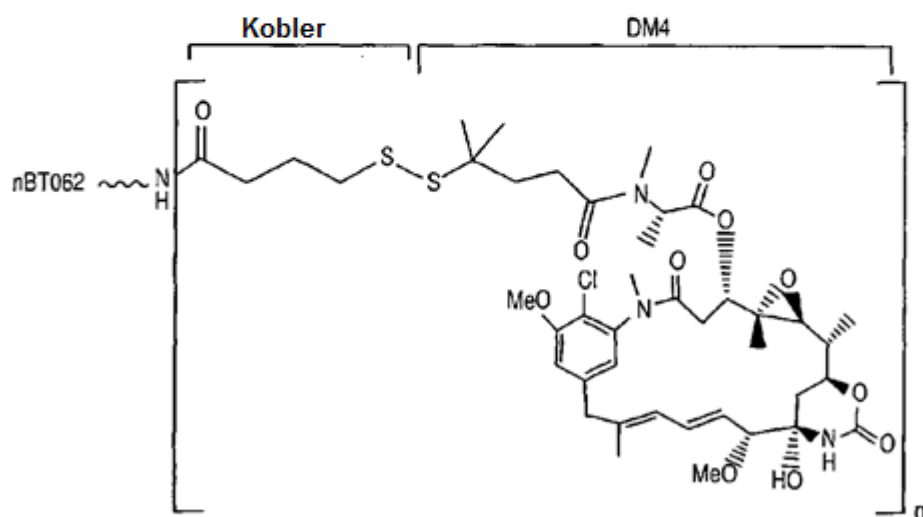
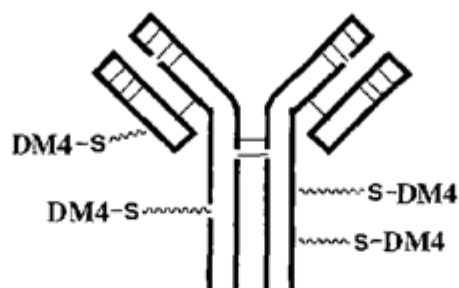
<220>

<223> Primer g22949

<400> 13

cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttcc 45

FIG. 1



*n er omtrent 3,5 legemiddel koblet per antistoffmolekyl

FIG. 2

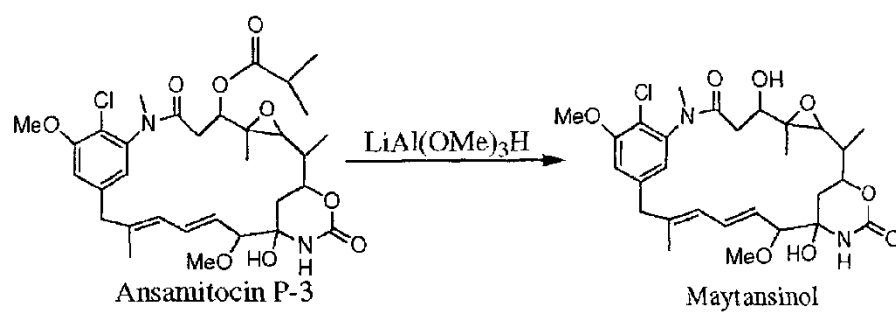
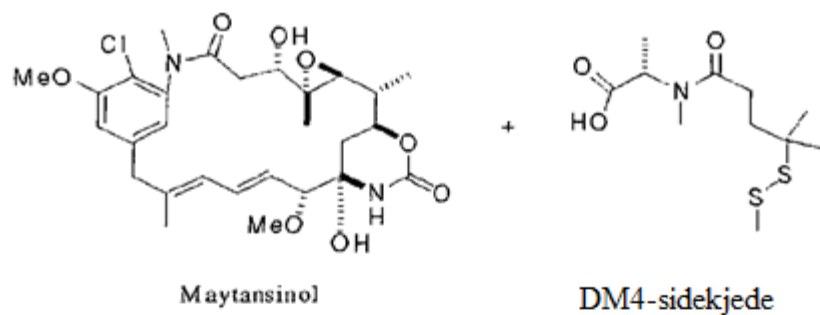


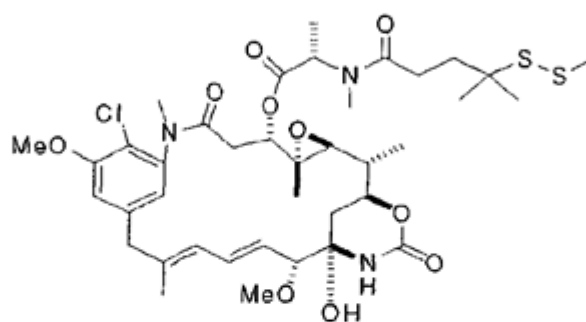
FIG. 3

3



trinn I

1) DCC, ZnCl₂, CH₂Cl₂
2) Kromatografi

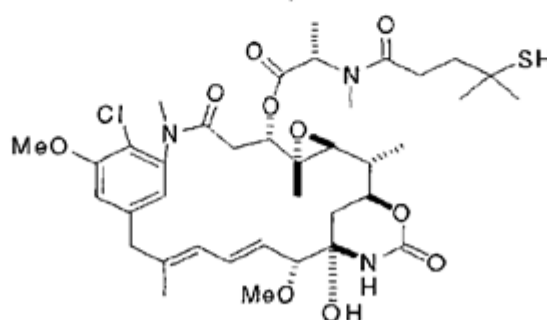


L-DM4-SMe

FIG. 4

trinn II

1) DTT, DME, phosphate buffer
2) Kromatografi



L-DM4

DCC: 1,3-dicykloheksylkarbodiimid

DTT: ditiotreititol

DME: 1,2-dimetoksyetan

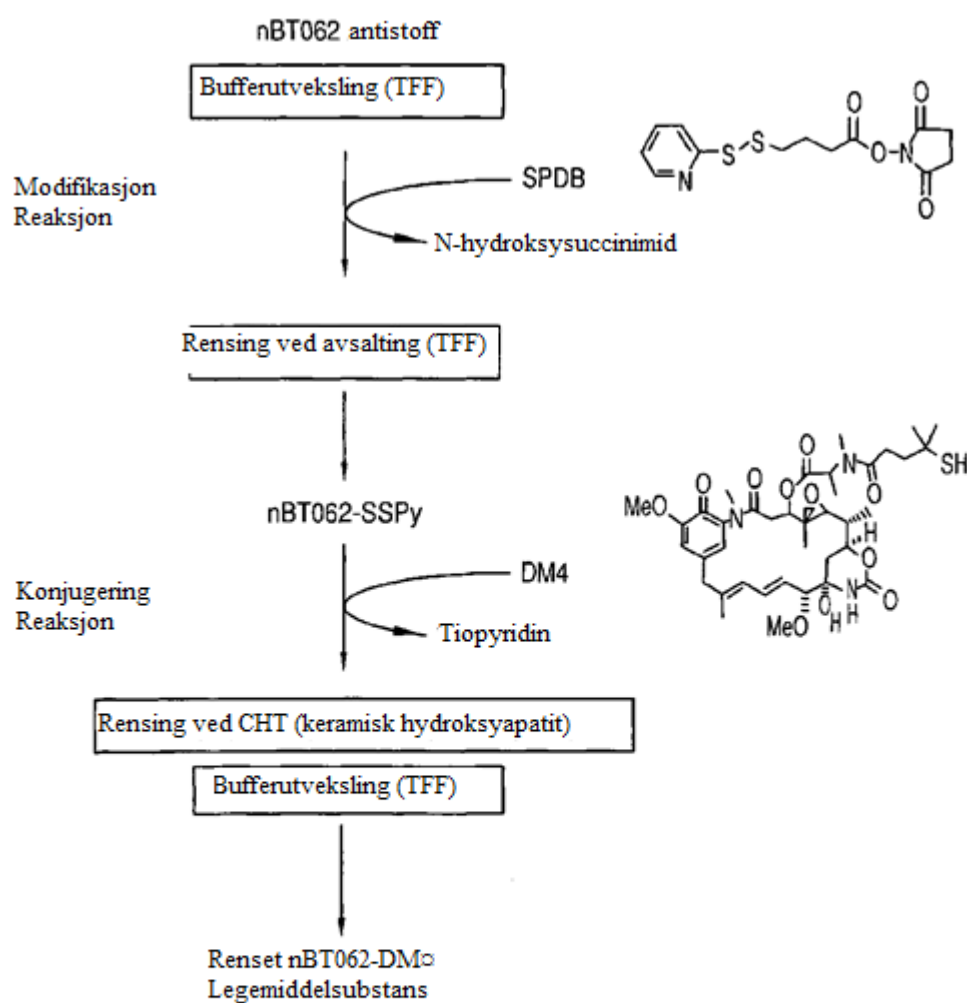


FIG. 5

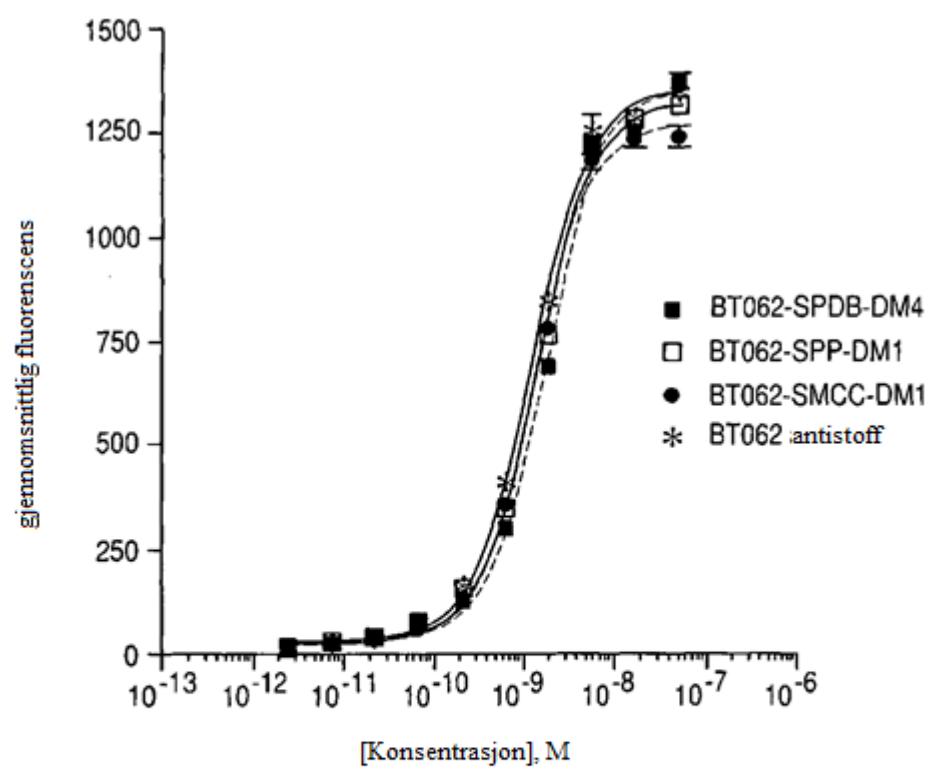


FIG. 6

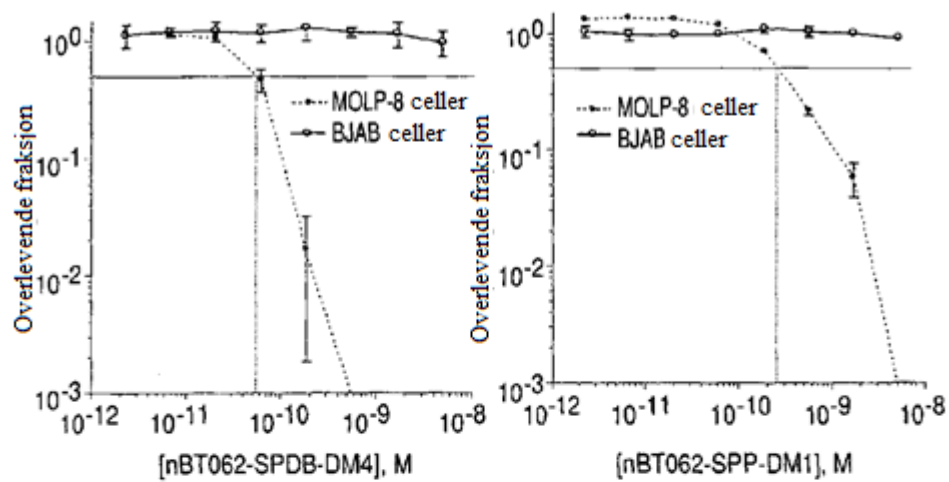


FIG. 7A

FIG. 7B

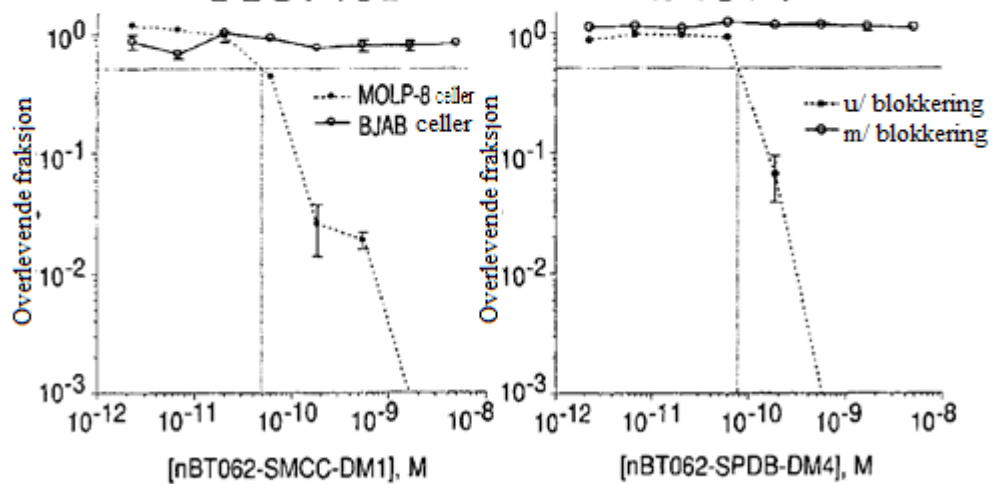


FIG. 7C

FIG. 7D

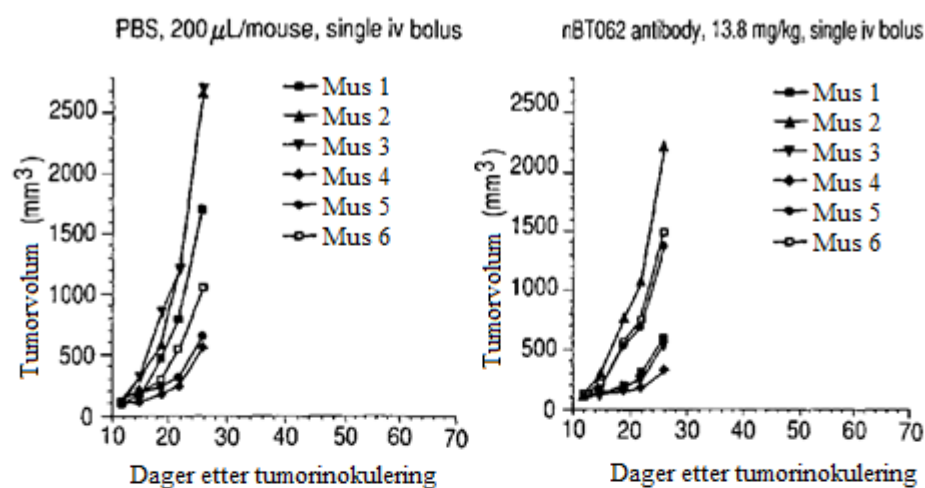


FIG. 8A

FIG. 8B

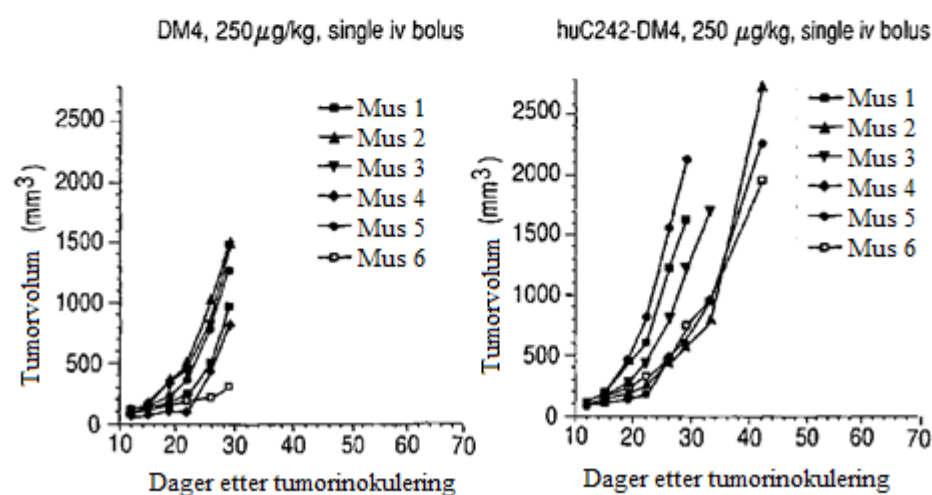


FIG. 8C

FIG. 8D

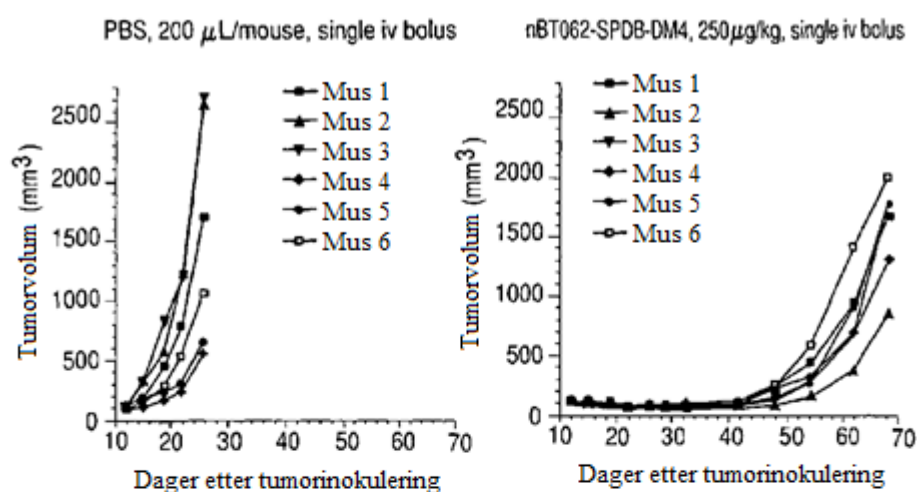


FIG. 9A

FIG. 9B

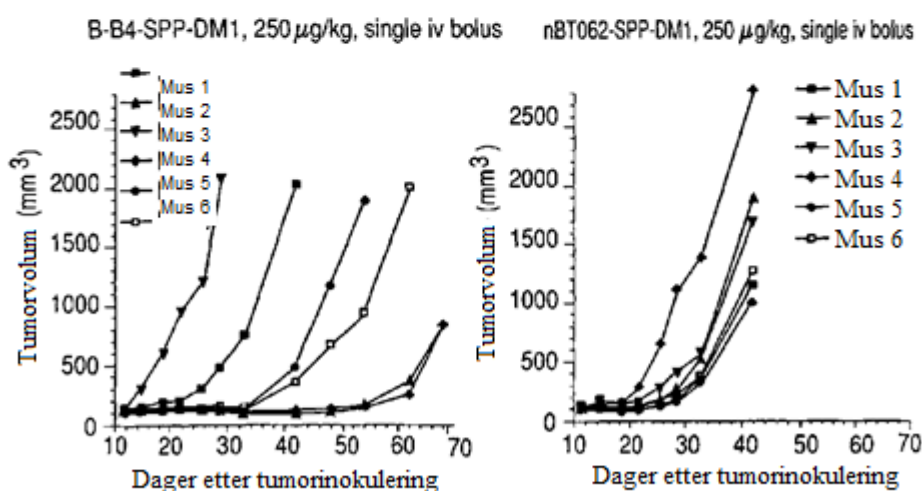


FIG. 9C

FIG. 9D

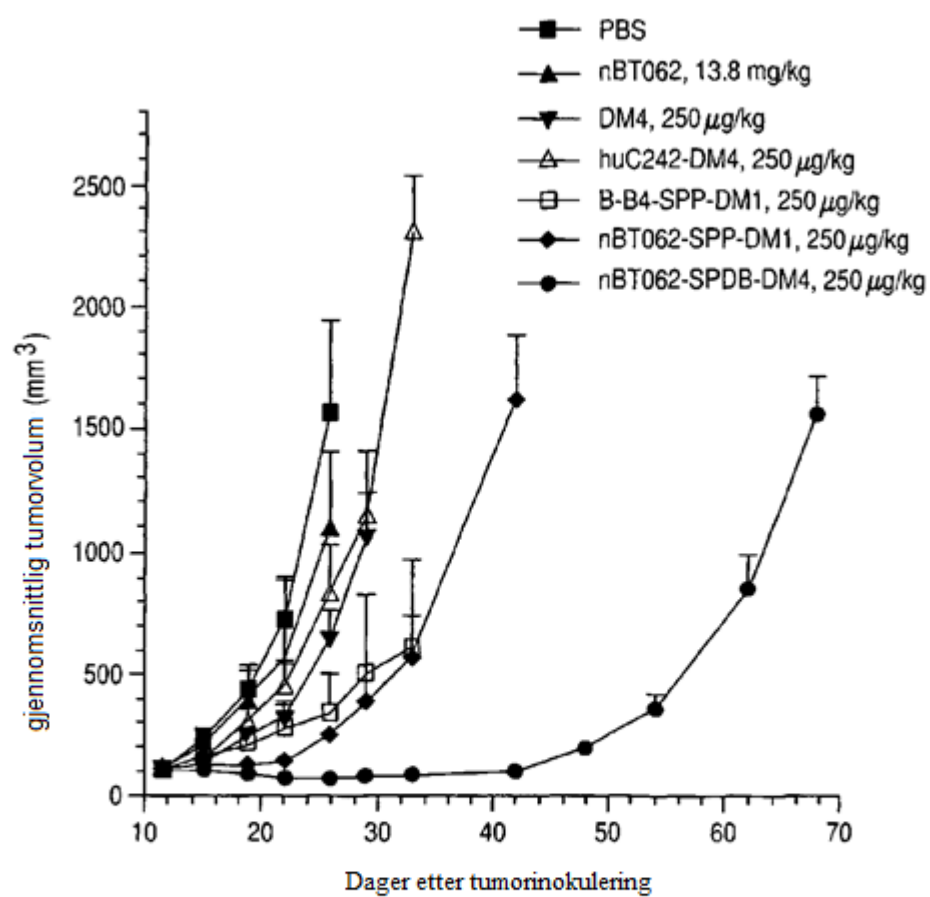


FIG. 10

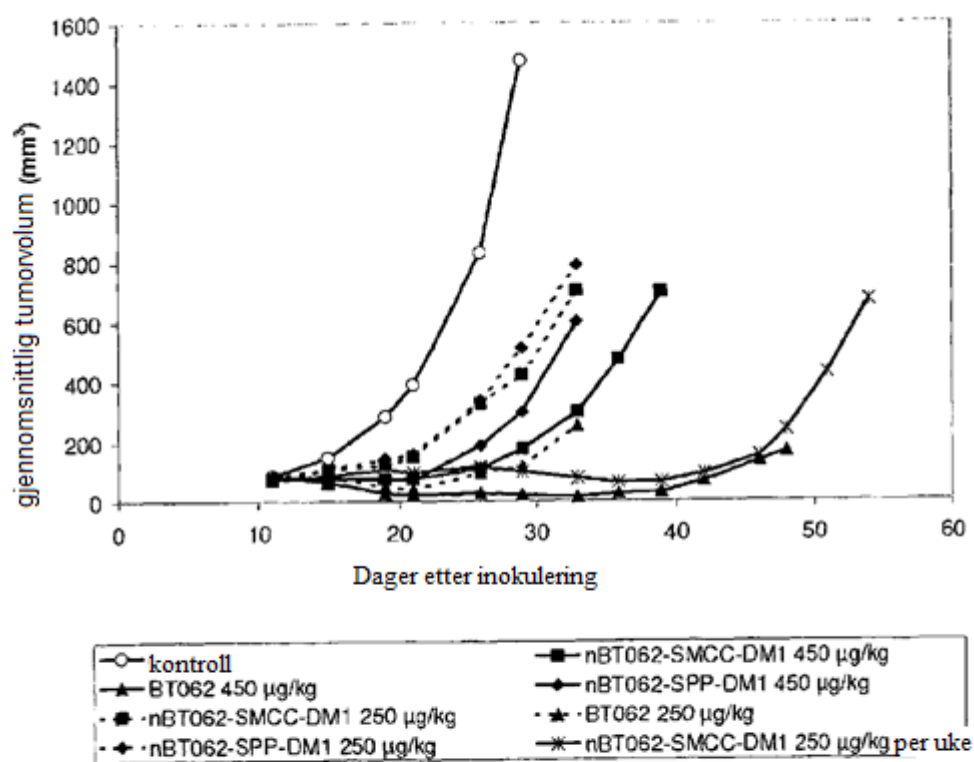


FIG. 11A

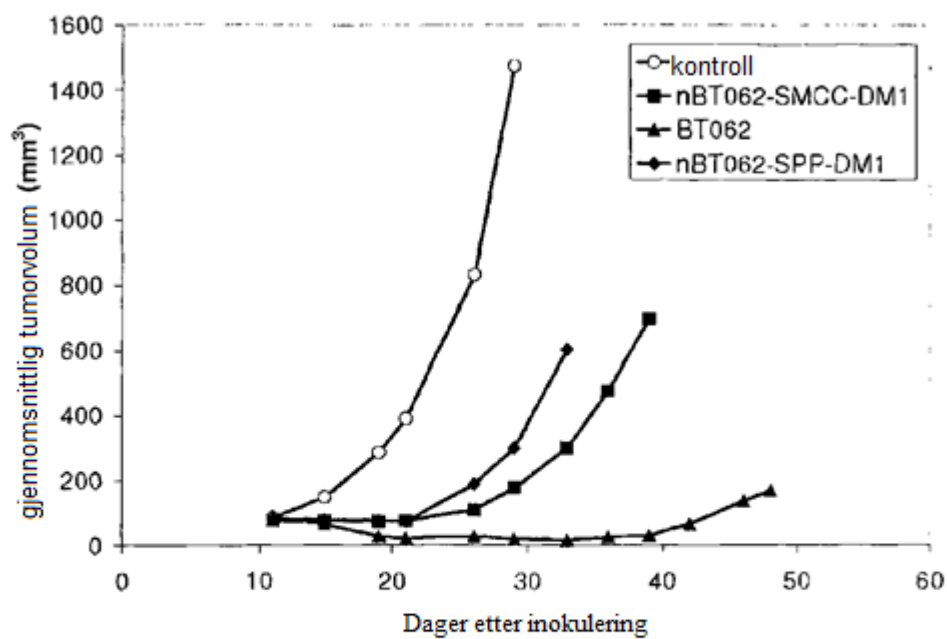


FIG. 11B