

CONJUGADO DE ANTICUERPO ANTI-BCMA, COMPOSICIONES QUE LO COMPRENDEN, Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y USO DEL MISMO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/843.226. presentada el 3 de mayo de 2019, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0002] La presente solicitud incorpora por referencia un Listado de secuencias presentado con esta solicitud como un archivo de texto titulado 14247-525-228_SEQ_LISTING.txt que fue creado el 28 de abril de 2020 y tiene un tamaño de 30.207 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] En la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo con especificidad de fijación para el antígeno de maduración de células B (BCMA) y composiciones que comprenden los conjugados de anticuerpo, que incluyen composiciones farmacéuticas, métodos para producir conjugados y métodos para usar los conjugados y las composiciones para tratamientos. Los conjugados y las composiciones son útiles en métodos de tratamiento y prevención de proliferación de células y cáncer, métodos de detección de proliferación de células y cáncer, y métodos de diagnóstico de proliferación de células y cáncer. Los conjugados y composiciones también son útiles en métodos de tratamiento, prevención, detección y diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades infecciosas.

ANTECEDENTES

[0004] El antígeno de maduración de células B (BCMA) es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) que reconoce el factor activador de células B. La proteína en humanos se codifica mediante el gen del miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 17 (TNFRSF17) y se expresa preferentemente en linfocitos B maduros.

[0005] BCMA cumple una función importante en la regulación de la maduración y diferenciación de las células B en células plasmáticas. Está estrechamente relacionado con el

receptor de BAFF (BAFF-R) y el activador transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando de ciclofilina (TACI). Si bien BCMA, BAFF-R, y TACI son proteínas transmembrana tipo III que promueven la supervivencia de células B en distintas etapas de desarrollo, BCMA es expresado exclusivamente en células de linaje de tipo B, tales como los plasmablastos y células plasmáticas diferenciadas (Avery *et al.* (2003) *J. Clin. Invest.* 112(2):286-297; O'Connor *et al.* (2004) *J. Exp. Med.* 199(1):91-98). Se induce de forma selectiva durante la diferenciación de células plasmáticas, que ocurre simultáneamente con la pérdida de la expresión de BAFF-R en las células diferenciadas (Darce *et al.* (2007) *J. Immunol.* 178(9):5612-5622). La expresión de BCMA parece respaldar la supervivencia de células plasmáticas normales y plasmablastos, pero por lo general está ausente en células B indiferenciadas y en la mayoría de las células B de memoria. Por lo tanto, no parece ser necesaria para la homeostasis general de las células B, pero se requiere para la supervivencia óptima de células plasmáticas de larga vida en la médula ósea (O'Connor *et al.* (2004) *supra*; Xu, S. y K.P. Lam (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21(12):4067-4074).

[0006] En el mieloma múltiple, se ha demostrado que BCMA se expresa universal y ampliamente en células plasmáticas malignas a niveles elevados; sin embargo, normalmente no se detecta en los tejidos humanos normales, excepto en las células plasmáticas. Debido a su expresión selectiva como receptor de superficie celular en múltiples líneas celulares de mieloma, el BCMA puede potencialmente ser dirigido en terapias para tratar el mieloma múltiple. La expresión de BCMA también se asocia con leucemia y linfoma. Por lo que existe la necesidad de métodos mejorados de direccionamiento y/o modulación de la actividad de BCMA. Dada la expresión específica de BCMA en células plasmáticas y una menor expresión en tejido no canceroso, existe la necesidad de terapias mejoradas que puedan dirigirse específicamente a células y tejidos que expresan o sobreexpresan BCMA. Los conjugados de anticuerpos a BCMA podrían usarse para administrar porciones de carga útil terapéutica o de diagnóstico a células diana que expresan BCMA para el tratamiento o diagnóstico de dichas enfermedades.

RESUMEN

[0007] En la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo que se fijan selectivamente al antígeno de maduración de células B (BCMA). Los conjugados de anticuerpo comprenden un anticuerpo, que se fija a BCMA, ligado a una o más porciones de carga útil. El anticuerpo se liga a la carga útil por medio de un ligador. Los anticuerpos contra

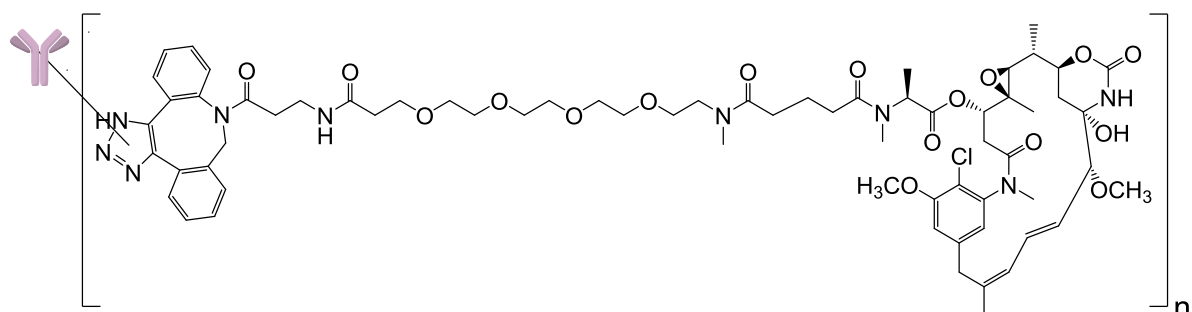
BCMA se describen en detalle en la presente, dado que son porciones útiles de carga útil, y ligadores útiles.

[0008] En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden los conjugados de anticuerpos. En algunas modalidades, las composiciones son composiciones farmacéuticas. Se puede usar cualquier composición farmacéutica adecuada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica es una composición para administración parenteral. En otro aspecto, en la presente se proporcionan kits que comprenden conjugados de anticuerpo o composiciones farmacéuticas.

[0009] En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para usar los conjugados de anticuerpo anti-BCMA. En algunas modalidades, los métodos son métodos para administrar una o más porciones de carga útil a una célula diana o tejido que expresa BCMA. En algunas modalidades, los métodos son métodos de tratamiento. En algunas modalidades, los métodos son métodos de diagnóstico. En algunas modalidades, los métodos son métodos analíticos. En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo se usan para tratar una enfermedad o afección. En algunos aspectos, la enfermedad o afección se selecciona de un tipo de cáncer, enfermedad autoinmunitaria e infección.

[0010] En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo se fijan a BCMA humano. En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo también se fijan a homólogos de BCMA humano. En algunos aspectos, los conjugados de anticuerpo también se fijan a BCMA de *Macaca fascicularis* y/o de ratón.

[0011] En ciertas modalidades, en la presente se proporciona un conjugado de anticuerpo de acuerdo con la Fórmula:



en donde n es de 1 a 4; el anticuerpo comprende una región VH de SEQ ID NO: 13, y una región VL de SEQ ID NO: 14; el anticuerpo también comprende una región constante de la cadena pesada que comprende residuos de p-azidometil-fenilalanina que se sustituyen en

cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y cada estructura dentro de los corchetes de la fórmula se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina. En otras modalidades, el anticuerpo comprende (i) una región VH que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 5 o 6; una CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 7 u 8; una CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 9; y (ii) una VL que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 10; una CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11; y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 12. En modalidades más específicas del conjugado de anticuerpo, n es 1, 2, 3 o 4. En modalidades particulares, el conjugado de anticuerpo también comprende al menos un dominio de región constante. Por ejemplo, en modalidades específicas, el conjugado de anticuerpo comprende un dominio de región constante humana, por ejemplo. Aun en otras modalidades específicas, el conjugado de anticuerpo comprende un dominio de región constante que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana, una región de cadena liviana de IgG1 kappa humana, o una región constante de la cadena de pesada de IgG1 humana y una región de la cadena liviana de IgG1 kappa humana. En una modalidad más específica del conjugado de anticuerpo, la región constante comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 19 y 20, o SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20. En otras modalidades, el conjugado de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpo puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en donde cada uno de los aminoácidos correspondientes a HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE fueron sustituidos con un residuo de p-azidometil-fenilalanina. En otras modalidades, el conjugado de anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Aun en otras modalidades, el conjugado de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpo puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, en donde cada uno de los aminoácidos correspondientes a la cadena pesada (HC)-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE fueron sustituidos con un residuo de p-azidometil-fenilalanina.

[0012] En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo es una IgA, una IgD, una IgE, una IgG, o una IgM. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo es humanizado o humano. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo es aglucosilado. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento scFv (sFv), o un fragmento scFv-Fc. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo se fija específicamente a BCMA humano y BCMA de *Macaca fascicularis*. En algunas modalidades de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, el anticuerpo se fija específicamente a BCMA humano y BCMA de ratón.

[0013] Además, en la presente se proporcionan kits que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, e instrucciones para el uso del conjugado de anticuerpo. En una modalidad específica, el conjugado de anticuerpo está liofilizado. En otra modalidad específica, el kit también comprende un fluido para reconstituir el anticuerpo liofilizado.

[0014] Además, en la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0015] Además, en la presente se proporcionan métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente, o una composición farmacéutica de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es un tipo de cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es leucemia o linfoma. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es mieloma múltiple. En modalidades específicas, dicho mieloma múltiple es de Etapa I, Etapa II, o Etapa III de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado. En algunas modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recientemente

diagnosticado. En otras modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante o resistente.

[0016] Además, en la presente se proporcionan métodos para diagnosticar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es un tipo de cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es leucemia o linfoma. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es mieloma múltiple. En modalidades específicas, dicho mieloma múltiple es de Etapa I, Etapa II, o Etapa III de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado. En algunas modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recientemente diagnosticado. En otras modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante o resistente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0017] La **Figura 1** proporciona una comparación de los sistemas de numeración Kabat y Chothia para CDR-H1. *Adaptado de* Martin A.C.R. (2010). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In R. Kontermann & S. Dübel (Eds.), *Antibody Engineering* vol. 2 (pp. 33-51). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

[0018] La **Figura 2** es un gráfico que ilustra cambios en el peso corporal de ratones implantados con tumores de mieloma múltiple ARP-1 después de haber administrado una dosis única de conjugados anticuerpo-fármaco de BCMA diferentes, como se divulga en la presente.

[0019] Las **Figuras 3A y 3B** son gráficos que ilustran las curvas de crecimiento tumoral y el tamaño tumoral en ratones implantados con tumores de mieloma múltiple ARP-1 después de haber administrado una dosis única de conjugados anticuerpo-fármaco de BCMA diferentes, como se divulga en la presente.

[0020] La **Figura 4** es un gráfico que ilustra cambios en el peso corporal de ratones implantados con células de mieloma múltiple MM.1S después de haber administrado una dosis única de conjugados anticuerpo-fármaco de BCMA diferentes, como se divulga en la presente.

[0021] La **Figura 5** es un gráfico que ilustra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones implantados con células de mieloma múltiple MM.1S después de haber

administrado una dosis única de conjugados anticuerpo-fármaco de BCMA diferentes, como se divulga en la presente.

[0022] La **Figura 6** es un gráfico que ilustra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones implantados con células de mieloma múltiple MM.1S después de haber administrado una dosis única de conjugado anticuerpo-fármaco de BCMA, Daratumumab, Velcade, o diferentes combinaciones de estos, como se divulga en la presente.

[0023] Las **Figuras 7A-7C** son gráficos que ilustran curvas de supervivencia en ratones implantados con células de mieloma múltiple MM.1S después de haber administrado una dosis única de conjugado anticuerpo-fármaco de BCMA junto con Daratumumab o Velcade como se divulga en la presente

[0024] Las **Figuras 8A y 8B** son gráficos que ilustran una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y una curva de supervivencia de ratones implantados con células de mieloma múltiple MM.1S después de haber administrado una dosis única de conjugado anticuerpo-fármaco de BCMA en diferentes concentraciones como se divulga en la presente.

[0025] La **Figura 9** es un gráfico que ilustra cambios en el peso corporal de ratones implantados con tumores de mieloma múltiple ARP-1 después de administrar una dosis única de conjugado anticuerpo-fármaco de BCMA en diferentes dosis, como se divulga en la presente.

[0026] Las **Figuras 10A y 10B** son gráficos que ilustran las curvas de crecimiento tumoral y el tamaño tumoral en ratones implantados con tumores de mieloma múltiple ARP-1 después de haber administrado una dosis única de conjugado anticuerpo-fármaco de BCMA en diferentes dosis, como se divulga en la presente.

[0027] Las **Figuras 11** es un gráfico que ilustra la DAR promedio del Conjugado 4 con el tiempo en plasma de PBS, humano, de ratón y de Macaca fascicularis.

[0028] La **Figura 12** proporciona gráficos que ilustran la fijación celular de Conjugado 4 y Conjugado 1 a células que expresan BCMA humano, BAFF-R, y receptores TACI.

DESCRIPCIONES DETALLADAS DE LAS MODALIDADES

1. Definiciones

[0029] A menos que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos del estado de la técnica, anotaciones y otra terminología científica que se usa en la presente tengan los significados que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la invención. En algunos casos, términos que tienen los significados que se les otorgan habitualmente se definen en la presente para mayor claridad y/o fácil referencia, y la inclusión de dichas definiciones en la presente no debería interpretarse como representativa de una diferencia respecto de lo que generalmente se entiende en el estado de la técnica. Las personas del oficio de nivel medio comprenden y utilizan normalmente las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en la presente con el uso de metodologías convencionales, tales como, las metodologías de clonación molecular más utilizadas descritas en Green & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed. (2012), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; and Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons. Según sea adecuado, los procedimientos que incluyen el uso de kits y reactivos disponibles en el comercio se llevan a cabo, por lo general, de acuerdo con los protocolos y las condiciones definidas por el fabricante a menos que se indique lo contrario.

[0030] Como se usan en la presente, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0031] La expresión “alrededor de” indica y abarca un valor indicado y un rango por encima y por debajo de ese valor. En algunas modalidades, la expresión “alrededor de” indica el valor designado $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, o $\pm 1\%$. En algunas modalidades, la expresión “alrededor de” indica el valor designado $\pm$ una desviación estándar de ese valor.

[0032] La expresión “combinaciones de estas” incluye cualquier combinación posible de elementos a los que se refieren los términos. Por ejemplo, una oración que indica que “si α_2 es A, entonces α_3 no es D; α_5 no es S; o α_6 no es S; o combinaciones de estas” incluye las siguientes combinaciones cuando α_2 es A: (1) α_3 no es D; (2) α_5 no es S; (3) α_6 no es S; (4) α_3 no es D; α_5 no es S; y α_6 no es S; (5) α_3 no es D y α_5 no es S; (6) α_3 no es D y α_6 no es S; y (7) α_5 no es S y α_6 no es S.

[0033] Las expresiones “BCMA” y “antígeno de maduración de células B” se usan en la presente de manera indistinta. BCMA también es conocido por sus sinónimos, que incluyen BCM, miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 17

(“TNFRSF17”), CD269, TNFRSF13A, y miembro de la superfamilia del receptor del TNF 17, entre otros. A menos que se indique lo contrario, los términos incluyen cualquier variante, isoforma y homólogos de especies de BCMA humano que se expresen naturalmente mediante células transfectadas con BCMA o gen BCMA. Las proteínas BCMA incluyen, por ejemplo, la isoforma 1 de BCMA humano (SEQ ID NO: 1) y la isoforma 2 de BCMA humano (SEQ ID NO: 2). En algunas modalidades, las proteínas BCMA incluyen BCMA de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 3). En algunas modalidades, las proteínas BCMA incluyen BCMA murino (SEQ ID NO: 4).

[0034] El término “inmunoglobulina” se refiere a una clase de proteínas estructuralmente relacionadas que comprenden por lo general dos pares de cadenas de polipéptidos: un par de cadenas livianas (L) y un par de cadenas pesadas (H). En una “inmunoglobulina intacta”, las cuatro de esas cadenas se interconectan mediante enlaces disulfuro. La estructura de inmunoglobulinas fue bien caracterizada. *Ver, por ejemplo*, Paul, *Fundamental Immunology* 7th ed., Ch. 5 (2013) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. Brevemente, cada cadena pesada comprende normalmente una región variable de la cadena pesada (V_H o VH) y una región constante de la cadena pesada (C_H or CH). La región constante de la cadena pesada comprende normalmente tres dominios, cuya abreviatura es C_{H1} (o CH1), C_{H2} (o CH2), y C_{H3} (o CH3). Cada cadena liviana comprende normalmente una región variable de la cadena liviana (V_L o VL) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana comprende normalmente un dominio, cuya abreviatura es C_L or CL.

[0035] El término “anticuerpo” describe un tipo de molécula de inmunoglobulina y se usa en la presente en su sentido más amplio. Un anticuerpo incluye específicamente anticuerpos intactos (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas), y fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos comprenden al menos un dominio de fijación al antígeno. Un ejemplo de un dominio de fijación al antígeno es un dominio de fijación al antígeno formado por un dímero V_H - V_L . Un “anticuerpo contra BCMA,” “anticuerpo anti-BCMA,” “Ab contra BCMA,” “anticuerpo específico contra BCMA,” “Ab anti-BCMA,” “anticuerpo contra BCMA,” “anticuerpo anti-BCMA,” “Ab contra BCMA,” “anticuerpo específico contra BCMA” o “Ab anti-BCMA” o cualquier iteración de estas frases en donde “BCMA” se sustituye mediante “TNFRSF17”, es un anticuerpo, como se describe en la presente, que se fija específicamente a BCMA. En algunas modalidades, el anticuerpo se fija al dominio extracelular de BCMA.

[0036] Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (“regiones hipervariables (HVR)”, también denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR)) intercaladas con regiones que son más conservadas. Las regiones más conservadas se denominan regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L comprende por lo general tres CDR y cuatro FR, dispuestas en el siguiente orden (de terminal N a terminal C): FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Las CDR se incluyen en la fijación al antígeno, e influyen en la especificidad del antígeno y la afinidad de fijación del anticuerpo. Ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th ed. (1991) Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[0037] La cadena liviana de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa y lambda, en función de la secuencia del dominio constante.

[0038] La cadena pesada de cualquier especie vertebrada se puede asignar a una de cinco clases diferentes (o isotipos): IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. Estas clases también se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases de IgG e IgA se dividen además en subclases sobre la base de diferencias en secuencia y función. Los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

[0039] Los extremos de la secuencia de aminoácidos de una CDR se pueden determinar por parte de una persona del oficio de nivel medio que usa cualquier cantidad de esquemas de numeración conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al., *supra* (esquema de numeración “Kabat”); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (esquema de numeración “Chothia”); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (esquema de numeración “Contact”); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (esquema de numeración “IMGT”); y Honegge y Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309:657-70 (esquema de numeración “AHo”), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

[0040] La Tabla 1 proporciona las posiciones de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3 como se identifica por los esquemas Kabat y Chothia. Para CDR-H1, la numeración de residuos se proporciona usando ambos esquemas de numeración Kabat y Chothia.

Tabla 1. Residuos en CDR de acuerdo con los esquemas de numeración Kabat y Chothia.

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34

L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (numeración Kabat)	H31-H35B	H26-H32 or H34*
H1 (numeración Chothia)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

* El terminal C de CDR-H1, cuando se enumera usando la convención de numeración Kabat, varía entre H32 y H34, en función de la longitud de CDR, como se ilustra en la Figura 1.

[0041] A menos que se indique lo contrario, el esquema de numeración usado para identificar una CDR particular en la presente es el esquema de numeración Kabat/Chothia. En donde los residuos abarcados por estos dos esquemas de numeración difieren (por ejemplo, CDR-H1 y/o CDR-H2), el esquema de numeración se especifica como Kabat o Chothia. Por razones de conveniencia, CDR-H3 se denomina a veces en la presente Kabat o Chothia. Sin embargo, esto no implica diferencias en secuencia en donde no existen, y una persona del oficio de nivel medio puede confirmar fácilmente si las secuencias son las mismas o diferentes examinando las secuencias.

[0042] Las CDR se pueden asignar, por ejemplo, usando *software* de numeración de anticuerpos, tal como Abnum, disponible en www.bioinf.org.uk/abs/abnum/, y descrito en Abhinandan y Martin, *Immunology*, 2008, 45:3832-3839, incorporado por referencia en su totalidad.

[0043] El “esquema de numeración de la UE” se usa, por lo general cuando se refiere a un residuo de una región constante de la cadena pesada del anticuerpo (por ejemplo, como se informa en Kabat et al., *supra*). A menos que se indique lo contrario, el esquema de numeración de la UE se usa para referirse a residuos en las regiones constantes de la cadena pesada descritas en la presente.

[0044] Un “fragmento de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, tal como la región variable o de fijación al antígeno de un anticuerpo intacto. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos scFv (sFv), y fragmentos scFv-Fc.

[0045] Los fragmentos “Fv” comprenden un dímero ligado de manera no covalente de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana.

[0046] Los fragmentos “Fab” comprenden, además de los dominios de variable de la cadena pesada y liviana, el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se pueden generar, por ejemplo,

mediante métodos recombinantes o mediante la digestión de papaína de un anticuerpo de longitud completa.

[0047] Los fragmentos “F(ab')₂” contienen dos fragmentos Fab' unidos, cerca de la región bisagra, mediante enlaces disulfuro. Los fragmentos F(ab')₂ se pueden generar, por ejemplo, mediante métodos recombinantes o mediante la digestión de pepsina de un anticuerpo intacto. Los fragmentos F(ab') se pueden disociar, por ejemplo, mediante el tratamiento con β-mercaptoetanol.

[0048] Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “sFv” o “scFv” comprenden un dominio V_H y un dominio V_L en una sola cadena de polipéptidos. V_H y V_L están normalmente ligados mediante un ligador peptídico. Ver Plückthun A. (1994). En algunas modalidades, el ligador es SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, el ligador es SEQ ID NO: 27. Antibodies from *Escherichia coli*. En Rosenberg M. & Moore G.P. (Ed.), *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* vol. 113 (pp. 269-315). Springer-Verlag, Nueva York, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0049] Los fragmentos “scFv-Fc” comprenden un scFv unido a un dominio Fc. Por ejemplo, un dominio Fc se puede unir al terminal C del scFv. El dominio Fc puede seguir el V_H o V_L, en función de la orientación de los dominios variables en scFv (es decir, V_H-V_L o V_L-V_H). Se puede usar cualquier dominio Fc adecuado conocido en el estado de la técnica o descrito en la presente. En algunos casos, el dominio Fc comprende un dominio Fc de IgG1. En algunas modalidades, el dominio Fc de IgG1 comprende SEQ ID NO: 19, o una porción de este. SEQ ID NO: 19 proporciona la secuencia de C_H1, C_H2, y C_H3 de la región constante de IgG1 humana.

[0050] La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos comprende anticuerpos que son sustancialmente similares y que se fijan a los mismos epítomos, con la excepción de variantes que pueden surgir normalmente durante la producción del anticuerpo monoclonal. Dichas variantes están por lo general presentes solo en pequeñas cantidades. Un anticuerpo monoclonal se obtiene normalmente mediante un proceso que incluye la selección de una pluralidad de anticuerpos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como una agrupación de clones de hidridoma, clones de fago, clones de levadura, clones bacterianos, u otros clones de ADN recombinantes. El anticuerpo seleccionado también se

puede alterar, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana (“maduración de la afinidad”), para humanizar el anticuerpo, para mejorar su producción en el cultivo celular, y/o para reducir su inmunogenicidad en un sujeto.

[0051] La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie diferente.

[0052] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado es por lo general una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una o más CDR se reemplazan por residuos de una o más CDR de un anticuerpo no humano (anticuerpo donante). El anticuerpo donante puede ser cualquier anticuerpo no humano adecuado, tal como un anticuerpo de ratón, rata, conejo, gallina o primate no humano que tiene una especificidad, afinidad, o efecto biológico no deseado. En algunos casos, los residuos de la región de marco seleccionados del anticuerpo receptor se reemplazan mediante los residuos de la región de marco correspondiente del anticuerpo donante. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo para refinar adicionalmente la función del anticuerpo. Para mayor detalle, ver Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

[0053] Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana, o derivado de una fuente no humana que utiliza un repertorio de anticuerpo humano o secuencias de codificación de anticuerpo humano (por ejemplo, que se obtienen de fuentes humanas o se diseñan *de novo*). Los anticuerpos humanos excluyen específicamente anticuerpos humanizados.

[0054] Un "anticuerpo aislado" es aquel que se ha separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes del entorno natural pueden incluir enzimas, hormonas y otros materiales proteínicos o no proteínicos. En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se purifica a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o de terminal N-terminal, por ejemplo,

mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria. En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se purifica hasta homogeneizarse mediante electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE) en condiciones reductoras o no reductoras, con detección mediante tinción azul o de plata de Coomassie. Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no está presente. En algunos aspectos, un anticuerpo aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

[0055] En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se purifica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % en peso. En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se purifica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % en volumen. En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se proporciona como una solución que comprende al menos 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % a 100 % en peso. En algunas modalidades, un anticuerpo aislado se proporciona como una solución que comprende al menos 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % a 100 % en volumen.

[0056] "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre sitio de fijación único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de fijación (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, "afinidad de fijación" se refiere a la afinidad de fijación intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de fijación (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su componente Y se puede representar mediante la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en el estado de la técnica, lo que incluye aquellos descritos en la presente. La afinidad se puede determinar, por ejemplo, con el uso de tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR), tal como un instrumento Biacore[®]. En algunas modalidades, la afinidad se determina a 25 °C.

[0057] Con respecto a la fijación de un anticuerpo a una molécula diana, los términos "fijación específica", "se fija específicamente a", "específico para", "se fija selectivamente" y "selectivo para" un antígeno particular (por ejemplo, una diana de polipéptidos) o un epítipo en un antígeno particular, se refieren a la fijación que se puede medir de manera diferente a la interacción no específica o no selectiva. La fijación específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de una molécula en comparación con la fijación de una molécula de control. La fijación específica también se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que imita el sitio de fijación al anticuerpo en la diana. En ese caso, se

indica la fijación específica si la fijación del anticuerpo a la diana se inhibe competitivamente mediante la molécula de control.

[0058] El término “ k_d ” o “ k_d ” (sec^{-1}), como se usa en la presente, se refiere a la constante de la velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. Este valor también se denomina valor k_{off} .

[0059] El término “ k_a ” o “ k_a ” ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$), como se usa en la presente, se refiere a la constante de la velocidad de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. Este valor también se denomina valor k_{on} .

[0060] El término “ K_D ” (también conocido como “ K_d ” o “ KD ,” M o nM), como se usa en la presente, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. $K_D = k_d/k_a$. El valor de K_D es normalmente igual en magnitud a la concentración del ligando en el cual la mitad de las moléculas de proteína se une al ligando en equilibrio.

[0061] El término “ K_A ” o “ K_a ” (M^{-1}), como se usa en la presente, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. $K_A = k_a/k_d$.

[0062] Un anticuerpo “maduro por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR o FR que genera una mejora en la afinidad del anticuerpo para su antígeno, en comparación con un anticuerpo de origen que no posee las alteraciones. En una modalidad, un anticuerpo maduro por afinidad tiene afinidad nanomolar o picomolar para el antígeno diana. Los anticuerpos maduros por afinidad se pueden producir usando una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, Marks et al. (*Bio/Technology*, 1992, 10:779-783, incorporada por referencia en su totalidad) describe la maduración de la afinidad mediante transposición de dominio V_H y V_L . La mutagénesis aleatoria de CDR y/o los residuos de marco se describen, por ejemplo, en Barbas et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, 91:3809-3813); Schier et al., *Gene*, 1995, 169:147-155; Yelton et al., *J. Immunol.*, 1995, 155:1994-2004; Jackson et al., *J. Immunol.*, 1995, 154:3310-3319; y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 1992, 226:889-896, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

[0063] Cuando se usa en la presente en el contexto de dos o más anticuerpos, la expresión “compite con” o “compite de manera cruzada con” indica que los dos o más anticuerpos compiten por la fijación a un antígeno (por ejemplo, BCMA). En un ensayo de

ejemplo, BCMA se recubre en una placa y se fija a un primer anticuerpo, luego de lo cual se agrega un segundo anticuerpo etiquetado. Si la presencia del primer anticuerpo reduce la fijación del segundo anticuerpo, los anticuerpos compiten. En otro ensayo de ejemplo, un primer anticuerpo se recubre en una placa y se fija al antígeno, y luego se agrega el segundo anticuerpo. La expresión “compite con” también incluye combinaciones de anticuerpos en donde un anticuerpo reduce la fijación de otro anticuerpo, pero en donde no se observa competencia cuando los anticuerpos se agregan en el orden inverso. Sin embargo, en algunas modalidades, los primeros y segundos anticuerpos inhiben la fijación entre sí, sin importar el orden en que se agregaron. En algunas modalidades, un anticuerpo reduce la fijación de otro anticuerpo a su antígeno en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, o al menos 90 %.

[0064] El término “epítipo” se refiere a una porción de un antígeno capaz de fijarse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten a menudo en residuos de aminoácidos accesibles a la superficie y/o cadenas laterales de azúcar, y pueden tener características estructurales tridimensionales, así como características de carga específica. Los epítipos conformacionales o no conformacionales se distinguen en que la fijación a los primeros pero no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes. Un epítipo puede comprender residuos de aminoácidos que se incluyen directamente en la fijación, y otros residuos de aminoácidos que no se incluyen directamente en la fijación. El epítipo al que se fija un anticuerpo se puede determinar usando técnicas conocidas para la determinación del epítipo tales como, la evaluación para la fijación del anticuerpo a variantes de BCMA con diferentes mutaciones de punto.

[0065] Porcentaje de “identidad” entre una secuencia de polipéptidos y una secuencia de referencia, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para alcanzar la identidad de secuencia de porcentaje máximo. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, usando *software* informático disponible para el público, tal como el *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA, o MUSCLE. Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquier

algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud total de las secuencias que se comparan.

[0066] Una “sustitución conservadora” o una “sustitución conservadora de aminoácidos” se refiere a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido química o funcionalmente similar. Las personas del oficio de nivel medio conocen las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos similares. Las secuencias de polipéptidos que tienen dichas sustituciones son conocidas como “variantes modificadas de manera conservadora”. A modo de ejemplo, los grupos de aminoácidos que se proporcionan en las Tablas 2-4 se consideran, en algunas modalidades, sustituciones conservadoras entre sí.

Tabla 2. Grupos seleccionados de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí, en algunas modalidades.

<i>Residuos ácidos</i>	D y E
<i>Residuos básicos</i>	K, R, y H
<i>Residuos hidrófilos no cargados</i>	S, T, N, y Q
<i>Residuos alifáticos no cargados</i>	G, A, V, L, e I
<i>Residuos no polares no cargados</i>	C, M, y P
<i>Residuos aromáticos</i>	F, Y, y W
<i>Residuos que contienen grupo alcohol</i>	S y T
<i>Residuos alifáticos</i>	I, L, V, y M
<i>Residuos asociados a cicloalqueno</i>	F, H, W, y Y
<i>Residuos hidrófobos</i>	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, y Y
<i>Residuos con carga negativa</i>	D y E
<i>Residuos polares</i>	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T
<i>Residuos con carga positiva</i>	H, K, y R
<i>Residuos pequeños</i>	A, C, D, G, N, P, S, T, y V
<i>Residuos muy pequeños</i>	A, G, y S
<i>Residuos incluidos en formación de giro</i>	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y T
<i>Residuos flexibles</i>	Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

Tabla 3. Grupos seleccionados adicionales de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí, en algunas modalidades.

<i>Grupo 1</i>	A, S, y T
<i>Grupo 2</i>	D y E
<i>Grupo 3</i>	N y Q
<i>Grupo 4</i>	R y K
<i>Grupo 5</i>	I, L, y M
<i>Grupo 6</i>	F, Y, y W

Tabla 4. Otros grupos seleccionados de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí, en algunas modalidades.

<i>Grupo A</i>	A y G
<i>Grupo B</i>	D y E
<i>Grupo C</i>	N y Q
<i>Grupo D</i>	R, K, y H
<i>Grupo E</i>	I, L, M, V
<i>Grupo F</i>	F, Y, y W
<i>Grupo G</i>	S y T
<i>Grupo H</i>	C y M

[0067] Las sustituciones conservadoras se pueden encontrar, por ejemplo, en Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* 2.^a ed. (1993) W. H. Freeman & Co., Nueva York, NY. Un anticuerpo generado por una o más sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos en un anticuerpo de origen es conocido como “una variante modificada de manera conservadora.”

[0068] La expresión “aminoácido” se refiere a los veinte aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales incluyen alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C); ácido glutámico (Glu; E), glutamina (Gln; Q), glicina (Gly; G); histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), y valina (Val; V).

[0069] Los aminoácidos que se codifican naturalmente son los ácidos proteinogénicos conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Estos incluyen los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), y las pirrolisinas y selenocisteína menos comunes. Los aminoácidos que se codifican naturalmente incluyen variantes después de la traducción de los 22 aminoácidos naturales tales como aminoácidos prenilados, aminoácidos isoprenilados, aminoácidos mirisoilados, aminoácidos palmitoilados, aminoácidos glucosilados ligados a N, aminoácidos glucosilados ligados a O, aminoácidos fosforilados y aminoácidos acilados.

[0070] La expresión “aminoácido no natural” se refiere a un aminoácido que no es proteinogénico, o una variante de este modificada después de la traducción. En particular, la expresión se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes de estos modificados después de la traducción.

[0071] El término “conjugado” o “conjugado de anticuerpo” se refiere a un anticuerpo ligado a una o más porciones de carga útil. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo descrito en la presente. La carga útil puede ser cualquier carga útil descrita en la presente. El anticuerpo se puede ligar directamente a la carga útil a través de un enlace covalente, o el anticuerpo se puede ligar a la carga útil de manera indirecta a través de un ligador. Normalmente, el ligador se une de manera covalente al anticuerpo y también se une de manera covalente a la carga útil. La expresión “conjugados anticuerpo-fármaco” o “ADC” se refiere a un conjugado en donde al menos una carga útil es una porción terapéutica tal como un fármaco.

[0072] La expresión “carga útil” se refiere a una porción molecular que se puede conjugar en un anticuerpo. En modalidades particulares, las cargas útiles se seleccionan del grupo que consiste en porciones terapéuticas y porciones de etiquetado.

[0073] El término “ligador” se refiere a una porción molecular que puede formar al menos dos enlaces covalentes. Normalmente, un ligador es capaz de formar al menos un enlace covalente en un anticuerpo y al menos otro enlace covalente en una carga útil. En algunas modalidades, un ligador puede formar más de un enlace covalente a un anticuerpo. En algunas modalidades, un ligador puede formar más de un enlace covalente en una carga útil o puede formar enlaces covalentes en más de una carga útil. Después de que un ligador forma un enlace en un anticuerpo, o una carga útil, o ambos, la estructura restante, es decir, el residuo del ligador después de que se forman uno o más enlaces covalentes puede aun denominarse “ligador” en la presente. La expresión “precursor de ligador” se refiere a un ligador que tiene uno o más grupos activos capaces de formar un enlace covalente con un anticuerpo o una carga útil, o ambos. En algunas modalidades, el ligador es un ligador escindible. Por ejemplo, un ligador escindible puede ser uno que se libera mediante una función bio-lábil, que puede o no estar modificada por ingeniería genética. En algunas modalidades, el ligador es un ligador no escindible. Por ejemplo, un ligador no escindible puede ser uno que se libera tras la degradación del anticuerpo.

[0074] “Tratar” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o afección se refiere, en algunas modalidades, a la mejora de una enfermedad o trastorno que existe en un sujeto. En otra modalidad, “tratar” o “tratamiento” incluye mejorar al menos un parámetro físico, que puede ser indiscernible por parte del sujeto. Aun en otra modalidad, “tratar” o “tratamiento” incluye modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible) o fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro

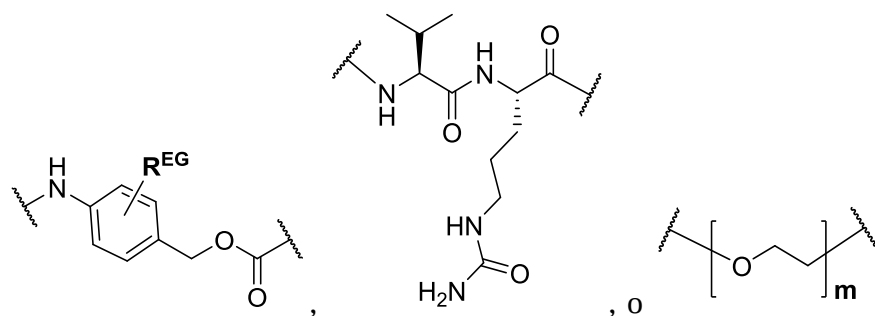
físico) o ambos. Aun en otra modalidad, “tratar” o “tratamiento” incluye retardar o prevenir el inicio de la enfermedad o el trastorno.

[0075] Como se usa en la presente, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o una composición que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno cuando se administra a un sujeto. En algunas modalidades, una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad eficaz se refiere a una cantidad de un anticuerpo o composición que es eficaz para prevenir o mejorar una enfermedad o la progresión de la enfermedad cuando se administra a un sujeto, o que genera una mejora de los síntomas.

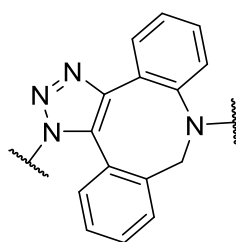
[0076] Como se usa en la presente, la expresión “inhibe el crecimiento” (por ejemplo, en referencia a células, tales como células tumorales) incluye cualquier disminución mensurable en el crecimiento celular (por ejemplo, crecimiento de célula tumoral) cuando está en contacto con un anticuerpo contra BCMA, en comparación con el crecimiento de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo contra BCMA. En algunas modalidades, el crecimiento se puede inhibir en al menos alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 %, o 100 %. La disminución en el crecimiento celular puede ocurrir mediante una variedad de mecanismos, que incluyen, entre otros, internalización de anticuerpo, apoptosis, necrosis, y/o actividad mediada por función efectora.

[0077] Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a un sujeto mamífero. Los sujetos de ejemplo incluyen, entre otros, humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, camellos, aves, cabras y ovejas. En ciertas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad que se puede tratar o diagnosticar con un anticuerpo proporcionado en la presente. En algunas modalidades, la enfermedad es leucemia, linfoma, o mieloma múltiple, un tumor de células dendríticas plasmocitoides, una neoplasia del linaje de células B, un neoplasma de célula plasmática, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), un linfoma de células B de grado bajo, linfoma de Burkitt, un linfoma plasmablastico, o un linfoma folicular.

[0078] En algunas estructuras químicas ilustradas en la presente, algunos sustituyentes, grupos químicos, y átomos se representan con una línea curvada/ondeada (por ejemplo, ) que intersecta un enlace o enlaces para indicar el átomo a través del cual se unen los sustituyentes, grupos químicos y átomos. Por ejemplo, en algunas estructuras, tales como



pero no se limita a , , o , esta línea curvada/ondeada indica los átomos en la estructura principal de un conjugado o estructura de ligador-carga útil a los que se une la entidad química ilustrada. En algunas



estructuras, tales como pero no se limita a , esta línea curvada/ondeada indica los átomos en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, así como los átomos en la estructura principal del conjugado o estructura de ligador-carga útil a los que se une la entidad química ilustrada.

[0079] La expresión “específico del sitio” se refiere a una modificación de un polipéptido en una ubicación de secuencia predeterminada en el polipéptido. La modificación está en un solo residuo predecible del polipéptido con poca o ninguna variación. En modalidades particulares, se introduce un aminoácido modificado en esa ubicación de secuencia, por ejemplo, de manera recombinante o sintética. De manera similar, una porción puede estar ligada “de manera específica del sitio” a un residuo en una ubicación de secuencia particular en el polipéptido. En algunas modalidades, un polipéptido puede comprender más de una modificación específica de sitio.

2. Conjugados

[0080] En la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo contra BCMA. Los conjugados comprenden un anticuerpo contra BCMA ligado de manera covalente a través de un ligador a una carga útil. En algunas modalidades, el anticuerpo está ligado a una carga útil. En otras modalidades, el anticuerpo está ligado a más de una carga útil. En algunas modalidades, el anticuerpo está ligado a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más cargas útiles.

[0081] En los conjugados proporcionados en la presente, el anticuerpo puede ser de cualquier especie. En algunas modalidades, el BCMA es un BCMA de vertebrado. En algunas modalidades, el BCMA es un BCMA de mamífero. En algunas modalidades, el BCMA es BCMA humano. En algunas modalidades, el BCMA es BCMA de ratón. En algunas modalidades, el BCMA es BCMA de *Macaca fascicularis*.

[0082] El anticuerpo es normalmente una proteína que comprende múltiples cadenas de polipéptidos. En algunas modalidades, el anticuerpo es un heterotetrámero que comprende dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana se puede ligar a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. Cada cadena pesada se puede ligar a la otra cadena pesada mediante uno o más enlaces disulfuro covalentes. Cada cadena pesada y cada cadena liviana también puede tener uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Como es conocido por las personas del oficio de nivel medio, cada cadena pesada comprende normalmente un dominio variable (V_H) y una cantidad de dominios constantes. Cada cadena liviana comprende normalmente un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante. Como es conocido por las personas del oficio de nivel medio, los anticuerpos tienen normalmente afinidad selectiva para sus moléculas diana, es decir, antígenos.

[0083] Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden tener cualquier forma de anticuerpo conocida por las personas del oficio de nivel medio. Pueden ser de longitud completa o fragmentos. Los anticuerpos de longitud completa de ejemplo incluyen IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, etc. Los fragmentos de ejemplo incluyen Fv, Fab, Fc, scFv, scFv-Fc, etc.

[0084] En algunas modalidades, el anticuerpo del conjugado comprende seis de las secuencias de CDR descritas en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo del conjugado comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) descrito en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo del conjugado comprende un dominio variable de la cadena liviana (V_L) descrito en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo del conjugado comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) descrito en la presente y un dominio variable de la cadena liviana (V_L) descrito en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo del conjugado comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana descrito apareados en la presente (par $V_H - V_L$).

[0085] En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo se puede formar de un anticuerpo que comprende uno o más grupos reactivos. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo se puede formar de un anticuerpo que comprende aminoácidos que se codifican naturalmente. Las personas del oficio de nivel medio reconocerán que varios aminoácidos que se codifican naturalmente incluyen grupos reactivos capaces de conjugarse en una carga útil o en un ligador. Estos grupos reactivos incluyen cadenas laterales de cisteína, cadenas laterales de lisina y grupos amino-terminales. En estas modalidades, el conjugado de anticuerpo puede comprender una carga útil o un ligador ligado al residuo de un grupo reactivo de anticuerpo. En estas modalidades, el precursor de carga útil o el precursor del ligador comprenden un grupo reactivo capaz de formar un enlace con un grupo reactivo de anticuerpo. Los grupos reactivos típicos incluyen grupos de maleimida, carbonatos activados (que incluyen, entre otros, p-nitrofeniléster), ésteres activados (que incluyen, entre otros, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofeniléster, y aldehídos). Los grupos reactivos particularmente útiles incluyen maleimida y succinimida, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, para formar enlaces en cadenas laterales de cisteína y lisina. Otros grupos reactivos se describen en las secciones y los ejemplos a continuación.

[0086] En otras modalidades, el anticuerpo comprende uno o más aminoácidos modificados que tienen un grupo reactivo, como se describe en la presente. Normalmente, el aminoácido modificado no es un aminoácido que se codifica naturalmente. Estos aminoácidos modificados pueden comprender un grupo reactivo útil para formar un enlace covalente en un precursor de ligador o en un precursor de carga útil. Una persona del oficio de nivel medio puede usar el grupo reactivo para ligar el polipéptido a cualquier entidad molecular capaz de formar un enlace covalente en el aminoácido modificado. De este modo, en la presente se proporcionan conjugados que comprenden un anticuerpo que comprende un residuo de aminoácidos modificados ligado a una carga útil de manera directa o indirecta a través de un ligador. Los aminoácidos modificados de ejemplo se describen en las secciones a continuación. Por lo general, los aminoácidos modificados tienen grupos reactivos capaces de formar enlaces a ligadores o cargas útiles con grupos reactivos complementarios.

[0087] En algunas modalidades, los aminoácidos no naturales se posicionan en ubicaciones seleccionadas en una cadena de polipéptidos del anticuerpo. Se identificó que estas ubicaciones proporcionan sitios óptimos para la sustitución con los aminoácidos no naturales. Cada sitio es capaz de tener un aminoácido no natural con estructura, función y/o métodos únicos para producir el anticuerpo.

[0088] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para la sustitución proporciona un anticuerpo que es estable. La estabilidad se puede medir mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la materia.

[0089] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para sustitución proporciona un anticuerpo que tiene propiedades funcionales óptimas. Por ejemplo, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de afinidad de fijación para su antígeno diana en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar fijación mejorada en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio.

[0090] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para sustitución proporciona un anticuerpo que puede ser ventajoso. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo muestra propiedades ventajosas en sus métodos de síntesis, que se analizan a continuación. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en el rendimiento en la producción en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar rendimiento en producción mejorado en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de la supresión de tARN en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar supresión de tARN mejorada en la producción en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio.

[0091] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para sustitución proporciona un anticuerpo que tiene solubilidad ventajosa. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en la solubilidad en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar solubilidad mejorada en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio.

[0092] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para sustitución proporciona un anticuerpo que tiene una expresión ventajosa. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en la expresión en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el

anticuerpo puede mostrar expresión mejorada en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio.

[0093] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para sustitución proporciona un anticuerpo que tiene plegamiento ventajoso. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida en el plegamiento adecuado en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar plegamiento mejorado en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural específico del sitio.

[0094] En algunas modalidades, una posición específica del sitio para la sustitución proporciona un anticuerpo que es capaz de conjugación ventajosa. Como se describe a continuación, varios aminoácidos no naturales tienen cadenas laterales o grupos funcionales que facilitan la conjugación del anticuerpo en un segundo agente, ya sea en forma directa o a través de un ligador. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar eficacia de conjugación mejorada en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar mejor rendimiento de conjugación en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En algunas modalidades, el anticuerpo puede mostrar mejor especificidad de conjugación en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones.

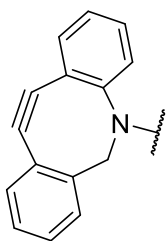
[0095] El uno o más aminoácido no natural se ubica en algunas posiciones específicas del sitio en al menos una cadena de polipéptidos del anticuerpo. La cadena de polipéptidos puede ser cualquier cadena de polipéptidos del anticuerpo sin limitación, incluyendo cadena liviana o cadena pesada. La posición específica del sitio puede ser en cualquier dominio del anticuerpo, incluyendo cualquier dominio variable y cualquier dominio constante.

[0096] En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden un aminoácido no natural en una posición específica del sitio. En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden dos aminoácidos no naturales en posiciones específicas del sitio. En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden tres aminoácidos no naturales en posiciones específicas del sitio. En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden más de tres aminoácidos no naturales en posiciones específicas del sitio.

[0097] En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden aminoácidos no naturales cada uno en las posiciones HC-F404 y HC-Y180, de acuerdo con el esquema de numeración Kabat o Chothia o de la UE, o una variante de estos modificada después de la traducción. En estas denominaciones, HC indica un residuo de la cadena pesada, y LC indica un residuo de la cadena liviana. Las personas del oficio de nivel medio van a reconocer que los aminoácidos no naturales sustituyen los residuos de HC-F404 y HC-Y180 en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo. En algunas modalidades, los aminoácidos no naturales son residuos de la Fórmula (30), en la presente.

3. Grupos de conjugación y residuos de estos

[0098] Los grupos de conjugación facilitan la conjugación de las cargas útiles descritas en la presente en un segundo compuesto, tal como un anticuerpo descrito en la presente. En algunas modalidades, el grupo de conjugación se denomina **R** en la presente. Los grupos de conjugación pueden reaccionar a través de cualquier mecanismo de reacción adecuado conocido por las personas del oficio de nivel medio. En algunas modalidades, un grupo de conjugación reacciona a través de una reacción de cicloadición de [3+2] alquino-azida, reacción de ligadura de Diels-Alder de demanda inversa de electrones, reacción de tioles-electrófilos, o reacción de carbonilo-oxiamina, como se describe en detalle en la presente. En algunas modalidades, el grupo de conjugación comprende un alquino, por ejemplo, un alquino con tensión. En algunas modalidades, el grupo de conjugación es:



. Los grupos de conjugación adicionales se describen en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense N.º 2014/0356385, la publicación de patente estadounidense N.º 2013/0189287, la publicación de patente estadounidense N.º 2013/0251783, la patente estadounidense N.º 8.703.936, la patente estadounidense N.º 9.145.361, la patente estadounidense N.º 9.222.940, y la patente estadounidense N.º 8.431.558.

[0099] Después de la conjugación, un residuo divalente del grupo de conjugación se forma y se une al residuo de un segundo compuesto. La estructura del residuo divalente se determina mediante el tipo de reacción de conjugación empleada para formar el conjugado.

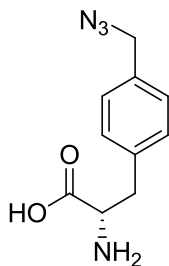
Chemical structures of two macrocyclic compounds, labeled **y/o**.

COMP-N=N-
(105a)

COMP-N=N-
(105b).

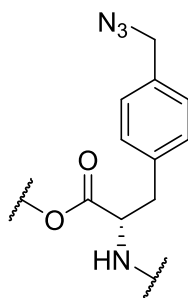
[00103] En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105a-105b en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación. En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo

con cualquiera de las Fórmulas 105a-105b en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación, en la posición 404 de la cadena pesada, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105a-105b en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación, en la posición 180 de la cadena pesada, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.



(30)

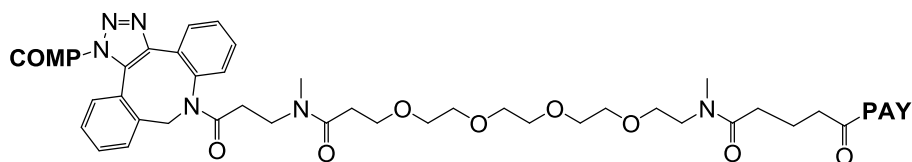
Los expertos de la técnica reconocerán que los aminoácidos tales como la Fórmula (30) se incorporan en polipéptidos y anticuerpos como residuos. Por ejemplo, un residuo de la Fórmula (30) puede estar de acuerdo con la siguiente Fórmula:



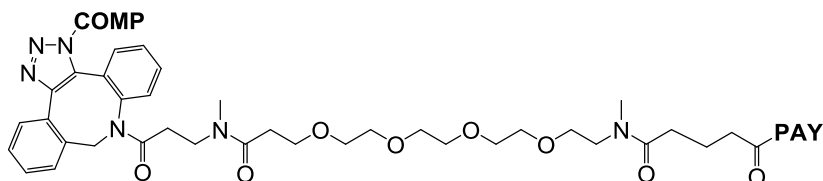
(30')

Otra modificación, por ejemplo, en -N₃ también se incluye dentro del término residuo en la presente.

[00104] En una modalidad, en la presente se proporciona un conjugado de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105c-105d, en donde **COMP** indica un residuo del anticuerpo anti-BCMA y **PAY** indica la porción de carga útil:



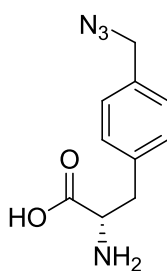
(105c)



(105d).

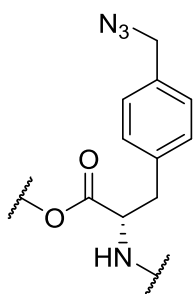
[00105] En cualquiera de las modalidades anteriores, el conjugado comprende **n** cantidad de porciones **PAY**, en donde **n** es un entero de 1 a 8. En algunas modalidades, **n** es 2. En algunas modalidades, **n** es 3. En algunas modalidades, **n** es 4. En algunas modalidades, **n** es 5. En algunas modalidades, **n** es 6. En algunas modalidades, **n** es 7. En algunas modalidades, **n** es 8.

[00106] En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105c-105d en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación. En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105c-105d en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación, en la posición 404 de la cadena pesada, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En modalidades particulares, en la presente se proporcionan conjugados anti-BCMA de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas 105c-105d en donde **COMP** indica un residuo del aminoácido no natural de acuerdo con la Formula (30), a continuación, en la posición 180 de la cadena pesada, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.



(30)

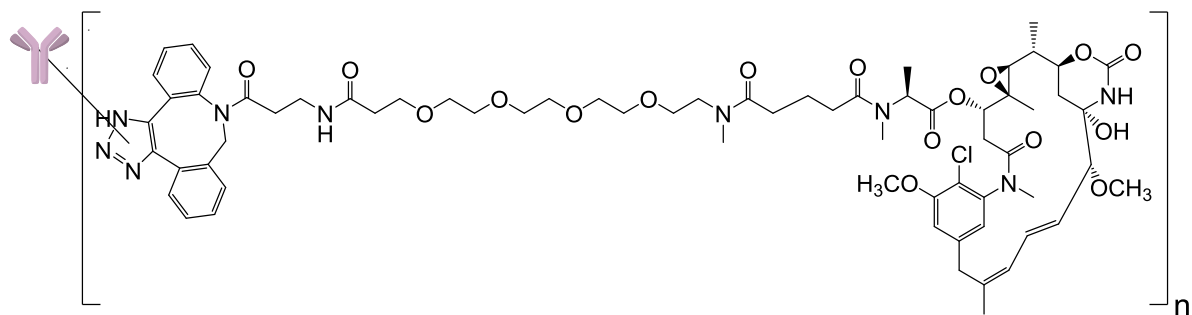
Los expertos de la técnica reconocerán que los aminoácidos tales como la Fórmula (30) se incorporan en polipéptidos y anticuerpos como residuos. Por ejemplo, un residuo de la Fórmula (30) puede estar de acuerdo con la siguiente Fórmula:



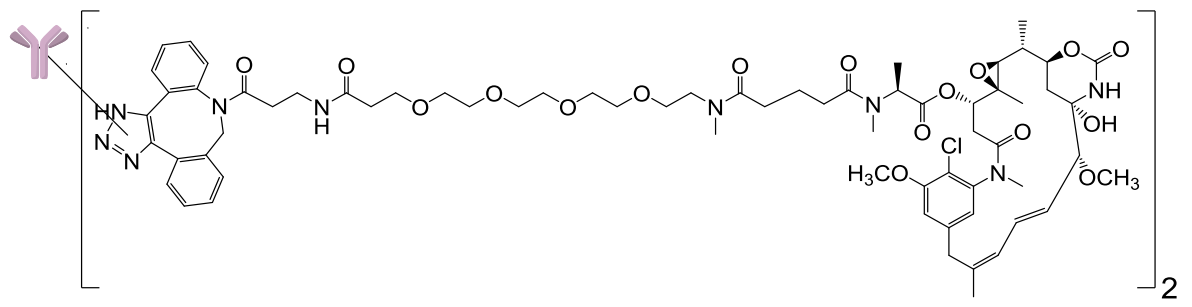
(30')

Otra modificación, por ejemplo, en $-N_3$ también se incluye dentro del residuo en la presente.

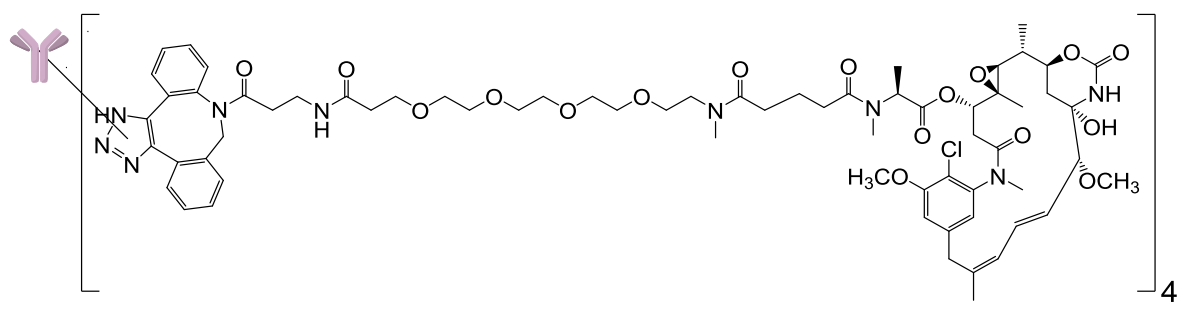
[00107] En modalidades particulares, se proporcionan en la presente conjugados de anti-BCMA que tienen la estructura del **Conjugado M**:



en donde n es un entero de 1 a 6. En algunas modalidades, n es un entero de 1 a 4. En algunas modalidades, n es 2. Por ejemplo, en modalidades particulares, el conjugado de anti-BCMA tiene la siguiente estructura:

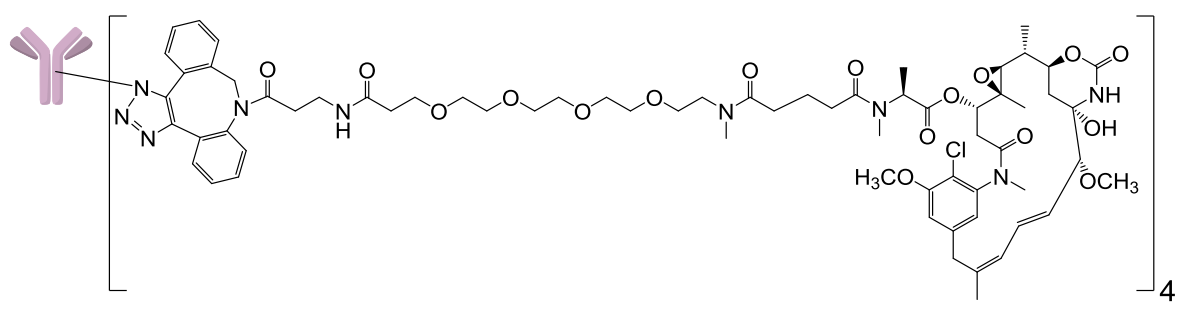
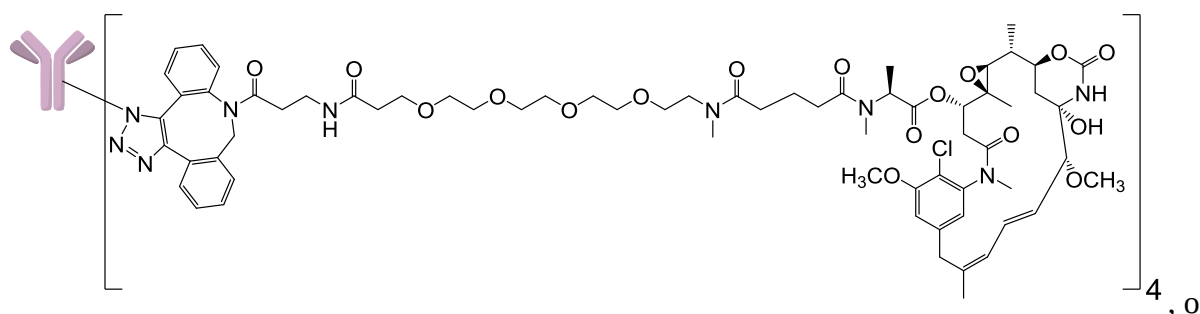


[00108] En algunas modalidades, n es 4. Por ejemplo, en modalidades particulares, el conjugado de anti-BCMA tiene la siguiente estructura:



[00109] En cualquiera de las modalidades anteriores en donde el conjugado de anti-BCMA tiene una estructura de acuerdo con el **Conjugado M**, la estructura entre corchetes se puede unir de manera covalente a uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo en los sitios HC-F404 y HC-Y180, de acuerdo con el esquema de numeración Kabat o de la UE de Kabat. En modalidades particulares, cada aminoácido no natural es un residuo de acuerdo con la Fórmula (30).

[00110] En una modalidad, el conjugado de anti-BCMA es el **Conjugado 4**, que tiene la estructura de:

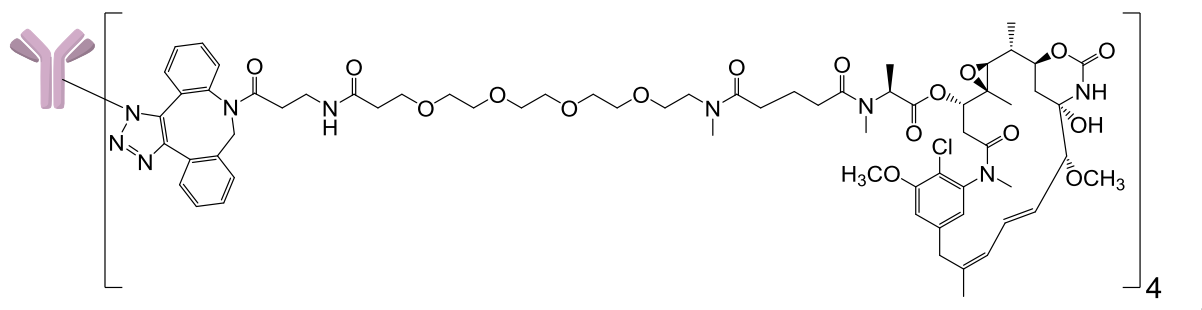


en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17;

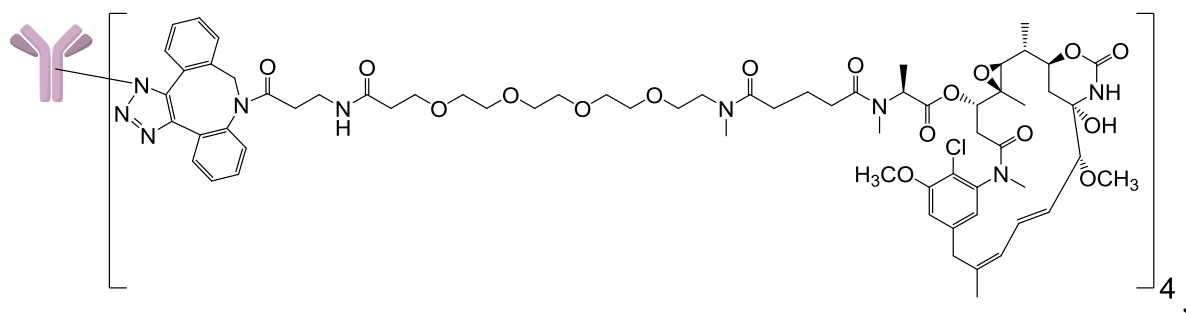
en donde el anticuerpo también comprende residuos de p-azidometil-fenilalanina que se sustituyen en cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y

cada estructura dentro de los corchetes de las fórmulas se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina.

[00111] En una modalidad, el conjugado de anti-BCMA es el **Conjugado 4**, en donde la especie predominante es:



or

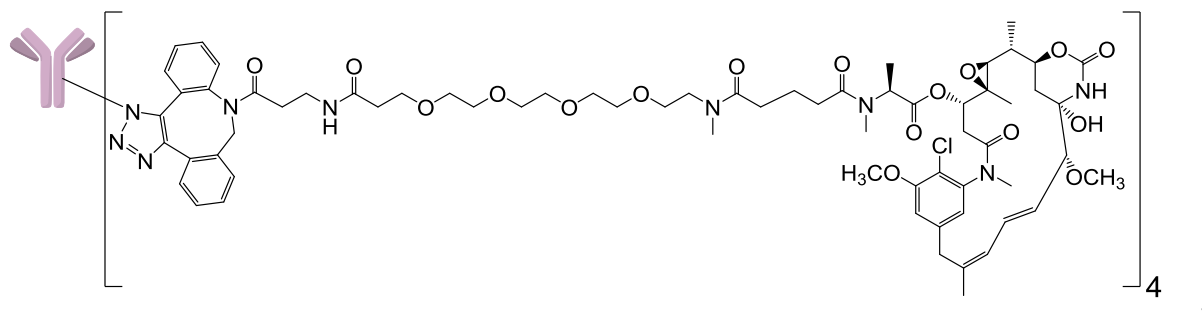


en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17;

en donde el anticuerpo también comprende residuos de p-azidometil-fenilalanina que se sustituye en cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y

cada estructura dentro de los corchetes de las fórmulas se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina.

[00112] En una modalidad, el conjugado de anti-BCMA es el **Conjugado 4**, en donde la especie predominante es:

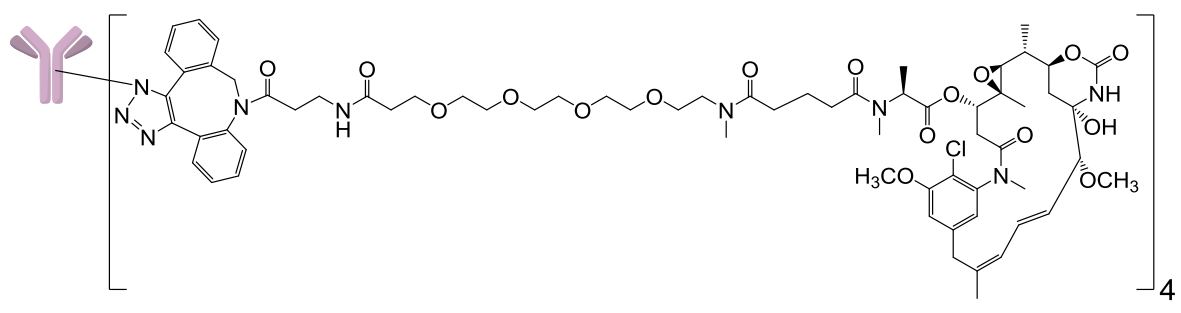


en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17;

en donde el anticuerpo también comprende residuos de p-azidometil-fenilalanina que se sustituyen en cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y

cada estructura dentro de los corchetes de las fórmulas se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina.

[00113] En una modalidad, el conjugado de anti-BCMA es el **Conjugado 4**, en donde la especie predominante es:



en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17;

en donde el anticuerpo también comprende residuos de p-azidometil-fenilalanina que se sustituyen en cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y

cada estructura dentro de los corchetes de las fórmulas se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina.

4. Especificidad del anticuerpo

[00114] Los conjugados comprenden anticuerpos que se fijan selectivamente a BCMA humano. En algunos aspectos, el anticuerpo se fija selectivamente al dominio extracelular de BCMA humano (BCMA humano).

[00115] En algunas modalidades, el anticuerpo se fija a un homólogo de BCMA humano. En algunos aspectos, el anticuerpo se fija a un homólogo de BCMA humano de una especie seleccionada de monos, ratones, perros, gatos, ratas, vacas, caballos, cabras y ovejas. En algunos aspectos, el homólogo es un homólogo de *Macaca fascicularis*. En algunos aspectos, el homólogo es un homólogo de ratón o murino.

[00116] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena liviana. En algunos aspectos, la cadena liviana es una cadena liviana kappa. En algunos aspectos, la cadena liviana es una cadena liviana lambda. En modalidades específicas, la cadena liviana kappa comprende una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEQ ID NO: 20.

[00117] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgA. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgD. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgE. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgG. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgM. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgG1. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgG2. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgG3. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgG4. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgA1. En algunos aspectos, la cadena pesada es una IgA2.

[00118] En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fv. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento F(ab')₂. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab'. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv (sFv). En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv-Fc.

[00119] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

[00120] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

[00121] En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo maduro por afinidad. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo maduro por afinidad derivado de una secuencia ilustrativa proporcionada en la presente divulgación.

[00122] Los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones que incluyen tipos de cáncer. En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de tipos de cáncer de tumores sólidos. Por ejemplo, los

conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal.

[00123] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia V_H proporcionada en SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia V_L proporcionada en SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia V_H y una secuencia V_L . En algunos aspectos, la secuencia V_H es una secuencia V_H que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 13, y la secuencia V_L es una secuencia V_L que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en cualquiera de SEQ ID NO: 14. En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15. En una modalidad específica, la secuencia de cadena pesada, por ejemplo, la secuencia de cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 15, además comprende una metionina del terminal N. En determinadas modalidades, tal secuencia de cadena pesada se codifica mediante la secuencia de nucleótidos proporcionada en SEQ ID NO: 16. En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17. En una modalidad específica, la secuencia de cadena liviana, por ejemplo, la secuencia de cadena liviana proporcionada en SEQ ID NO: 17, además comprende una metionina del terminal N. En determinadas modalidades, tal secuencia de cadena liviana se codifica mediante la secuencia de nucleótidos proporcionada en SEQ ID NO: 18.

[00124] En algunas modalidades, los anticuerpos comprenden seis de las CDR indicadas en la Tabla 5 a continuación. En modalidades particulares, se seleccionan CDR Chothia. En modalidades particulares, se seleccionan CDR Kabat.

[00125] **Tabla 5.** CDR de anticuerpo 2265-F02.

	<u>CDR</u> <u>Chothia</u> <u>H1</u> <u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>CDR</u> <u>Kabat</u> <u>H1</u> <u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO</u>	<u>CDR</u> <u>Chothia</u> <u>H2</u> <u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>CDR</u> <u>Kabat</u> <u>H2</u> <u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO</u>	<u>CDR</u> <u>H3</u> <u>SEQ</u> <u>ID NO</u>	<u>CDR</u> <u>L1</u> <u>SEQ</u> <u>ID NO</u>	<u>CDR</u> <u>L2</u> <u>SEQ</u> <u>ID NO</u>	<u>CDR</u> <u>L3</u> <u>SEQ</u> <u>ID NO</u>
2265-F02	5	6	7	8	9	10	11	12

[00126] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende tres de: una CDR-H1 que comprende una de SEQ ID NO: 5 y 6; una CDR-H2 que comprende una de SEQ ID NO: 7 y 8; una CDR-H3 que comprende la SEQ ID NO: 9; y uno, dos o los tres de: una CDR-L1 que comprende SEQ ID NO: 10; una CDR-L2 que comprende la SEQ ID NO: 11; y una CDR-L3 que comprende la SEQ ID NO: 12. En modalidades particulares, las CDR son de acuerdo con Chothia. En modalidades particulares, las CDR son de acuerdo con Kabat.

5. *Línea germinal*

[00127] En algunas modalidades, el anticuerpo que se fija específicamente a BCMA es un anticuerpo que comprende una región variable que se codifica mediante un gen de línea germinal particular, o una variante de este. Los anticuerpos ilustrativos proporcionados en la presente comprenden regiones variables que se codifican mediante los genes de línea germinal de la región variable de la cadena pesada VH1-18, VH3-33, VH2-5, VH2-70, y VH4-30-4. o variantes de estos; y genes de línea germinal de la región variable de la cadena liviana Vκ1-5, Vκ3-11, Vκ2-20, Vκ1-33, y Vκ1-16, o variantes de estos.

[00128] Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que las secuencias de CDR proporcionadas en la presente también pueden ser útiles cuando se combinan con regiones variables codificadas mediante otros genes de línea germinal de la región variable, o sus variantes. En particular, las secuencias de CDR proporcionadas en la presente pueden ser útiles cuando se combinan con regiones variables codificadas mediante genes de línea germinal de la región variable, o sus variantes, que son estructuralmente similares a los genes de línea germinal de la región variable mencionados anteriormente. Por ejemplo, en algunas modalidades, una secuencia de CDR-H proporcionada en la presente se puede combinar con una región variable codificada mediante un gen de línea germinal de la región variable seleccionado de las familias V_H 1, V_H 2, V_H 3, o V_H 4, o una de sus variantes. En algunas modalidades, una secuencia de CDR-L proporcionada en la presente se puede combinar con una región variable codificada mediante un gen de línea germinal de la región variable seleccionado de las familias Vκ1, Vκ2, o Vκ3, o una de sus variantes.

6. *Variantes de glucosilación*

[00129] En determinadas modalidades, un anticuerpo se puede alterar para aumentar, reducir o eliminar la medida en la que se glucosila. Por lo general, la glucosilación de polipéptidos es “ligada a N” o es “ligada a O”.

[00130] La glucosilación “ligada a N” se refiere a la unión de una porción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por ello, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación.

[00131] La glucosilación “ligada a O” se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[00132] La adición o eliminación de sitios de glucosilación ligada a N al anticuerpo se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que se crea o retira una o más de las secuencias tripeptídicas antes descritas. La adición o eliminación de sitios de glucosilación ligada a O se puede lograr mediante adición, eliminación o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en o a (según el caso) la secuencia de un anticuerpo.

7. Variantes de Fc

[00133] En determinadas modalidades, se pueden introducir modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionada en la presente para generar una variante de la región Fc. En determinadas modalidades, la variante de la región Fc posee algunas funciones efectoras, pero no todas. Tales anticuerpos pueden ser útiles, por ejemplo, en aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras son innecesarias o perjudiciales. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad mediada por el complemento dirigida al anticuerpo (ADCC). Se conocen en el estado de la técnica numerosas sustituciones o eliminaciones con función efectora alterada.

[00134] En algunas modalidades, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias C_H3. En algunas modalidades, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias C_H2. Por ejemplo, Fc puede incluir una o modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: V262E, V262D, V262K, V262R, V262S, V264S, V303R y V305R. En algunas modalidades, un Fc es un solo polipéptido. En algunas modalidades, un Fc es múltiples péptidos, por ejemplo, dos polipéptidos. Se describen modificaciones de ejemplo en la región Fc, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2017/037545, presentada el 14 de junio de 2017.

[00135] Una alteración en la actividad CDC y/o ADCC se puede confirmar usando ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, los ensayos de fijación al receptor de Fc (FcR) se pueden llevar a cabo para medir la fijación a FcγR. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, 9:457-492, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00136] Los ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se proporcionan en las patentes estadounidenses N.º 5.500.362 y 5.821.337; Hellstrom et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, 83:7059-7063; Hellstrom et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, 82:1499-1502; y Bruggemann et al., *J. Exp. Med.*, 1987, 166:1351-1361; cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células *Natural Killer* (NK). De manera alternativa, o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo* usando un modelo animal, tal como el que se describe en Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95:652-656, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00137] Los ensayos de fijación a C1q también se pueden llevar a cabo para confirmar que el anticuerpo no puede fijarse a C1q y, por ende, carece de actividad de CDC. Los ejemplos de ensayos de fijación a C1q incluyen aquellos descritos en WO 2006/029879 y WO 2005/100402, que se incorporan por referencia en su totalidad.

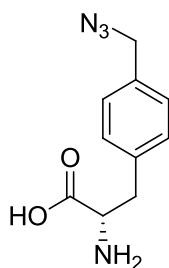
[00138] Los ensayos de activación del complemento incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 1996, 202:163-171; Cragg et al., *Blood*, 2003, 101:1045-1052; y Cragg y Glennie, *Blood*, 2004, 103:2738-2743; que se incorporan por referencia en su totalidad.

[00139] La fijación a FcRn y depuración *in vivo* (determinación de la semivida) también se pueden medir, por ejemplo, usando los métodos descritos en Petkova et al., *Intl. Immunol.*, 2006, 18:1759-1769, que se incorpora por referencia en su totalidad.

8. Aminoácidos modificados

[00140] Cuando el conjugado de anticuerpo comprende un aminoácido modificado, el aminoácido modificado puede ser cualquier aminoácido modificado que se considere adecuado por el especialista. En modalidades particulares, el aminoácido modificado es p-

azido-metil-L-fenilalanina (también denominado p-metilazido fenilalanina). En modalidades particulares, el aminoácido no natural es el compuesto (30):



(30);

o una sal de aquel. Tales aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal. Una persona del oficio de nivel medio comprenderá que la porción azido del residuo de p-azido-metil-L-fenilalanina reacciona con un grupo de conjugación para formar el triazol del grupo cíclico fusionado formado mediante la reacción de cicloadición de alquino-azida promovida por la cepa [3+2] usada para elaborar algunos de los conjugados descritos en la presente.

9. Preparación de conjugados de anticuerpo

9.1. Preparación de antígenos

[00141] La proteína BCMA que se debe usar para el aislamiento de los anticuerpos puede ser BCMA intacto o un fragmento de BCMA. La proteína BCMA intacta, o fragmento de BCMA, puede estar en forma de una proteína aislada o proteína expresada mediante una célula. Otras formas de BCMA útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

9.2. Anticuerpos monoclonales

[00142] Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, usando el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature*, 1975, 256:495-497 (que se incorpora por referencia en su totalidad), y/o mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.816.567, que se incorpora por referencia en su totalidad). Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener, por ejemplo, usando colecciones a base de fagos o levaduras. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 8.258.082 y 8.691.730, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[00143] En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza para dar lugar a linfocitos que producen, o que pueden producir, anticuerpos que se

fijarán específicamente a la proteína usada para inmunización. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos luego se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Ver Goding J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* 3^a ed. (1986) Academic Press, San Diego, CA, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00144] Las células de hibridoma se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fundidas. Por ejemplo, si las células de mieloma de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluye hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

[00145] Las células de mieloma útiles son aquellas que se fusionan eficazmente, sustentan la producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a las condiciones del medio, tales como la presencia o ausencia de un medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOP-21 y MC-11 (disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA), y células SP-2 o X63-Ag8-653 (disponibles de American Type Culture Collection, Rockville, MD). Las líneas celulares de mieloma humano y líneas celulares de heteromieloma de ratón-humano también se describieron para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Ver, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 1984, 133:3001, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00146] Luego de la identificación de células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad biológica deseadas, clones seleccionados se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante métodos estándar. Ver Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

[00147] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de fijarse específicamente a genes que codifican las

cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales). Por ende, las células de hibridoma pueden servir como una fuente útil de ADN que codifica anticuerpos con las propiedades deseadas. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan en células huésped tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Pichia* sp.), células COS, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen anticuerpos de otra manera, para producir los anticuerpos monoclonales.

9.3. Anticuerpos humanizados

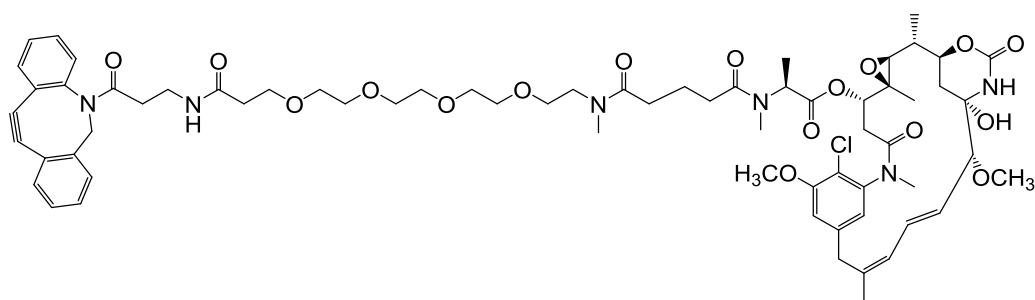
[00148] Los anticuerpos humanizados se pueden generar reemplazando la mayor parte, o todas, las porciones estructurales de un anticuerpo monoclonal no humano con secuencias de anticuerpos humanos correspondientes. En consecuencia, se genera una molécula híbrida en la que solo las variables específicas contra el antígeno, o CDR, se componen de secuencias no humanas. Los métodos para obtener anticuerpos humanizados incluyen aquellos descritos en, por ejemplo, Winter y Milstein, *Nature*, 1991, 349:293-299; Rader et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95:8910-8915; Steinberger et al., *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:36073-36078; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 86:10029-10033; y patentes estadounidenses N.º 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, y 6.180.370; que se incorporan por referencia en su totalidad.

9.4. Anticuerpos humanos

[00149] Los anticuerpos humanos se pueden generar mediante una variedad de técnicas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones humanizados). Ver, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90:2551; Jakobovits et al., *Nature*, 1993, 362:255-258; Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 1993, 7:33; y las patentes estadounidenses N.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807; que se incorporan por referencia en su totalidad. Los anticuerpos humanos también se pueden derivar de colecciones de expresión de fagos (ver, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 1991, 227:381-388; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 1991, 222:581-597; y las patentes estadounidenses N.º 5.565.332 y 5.573.905, que se incorporan por referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante linfocitos B activados *in vitro* (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.567.610 y 5.229.275, que se incorporan por referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanos también se pueden derivar de

9.5. Conjugación

[00151] En algunas modalidades, un conjugado de anti-BCMA se prepara poniendo en contacto un anticuerpo anti-BCMA como se divulga en la presente con un precursor de ligador que tiene una estructura (M):



(M).

42

[00152] Se comprenderá que los conjugados de la reacción de conjugación divulgada en la presente pueden dar como resultado una mezcla de conjugados con una distribución de uno o más fármacos (por ejemplo, porciones **PAY**) unidos a un anticuerpo. Los conjugados individuales se pueden identificar en la mezcla mediante, por ejemplo, espectroscopia de masa y separar mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba, que incluye los métodos conocidos en el estado de la técnica. En determinadas modalidades, la mezcla de conjugados comprende una especie de conjugado predominante. En determinadas modalidades, un conjugado homogéneo con un único valor de relación fármaco-anticuerpo (DAR) se puede asilar de la mezcla de conjugación, por ejemplo, mediante electroforesis o cromatografía.

[00153] La DAR puede variar de 1 a 8 unidades por conjugado. También se puede determinar la distribución cuantitativa de DAR en términos de n . En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización de conjugados homogéneos en donde n es un determinado valor se pueden alcanzar mediante electroforesis.

[00154] En determinadas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente varía de 1 a 8. En determinadas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente varía de alrededor de 2 a alrededor de 6; de alrededor de 3 a alrededor de 5.

[00155] En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 1. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionada en la presente es alrededor de 2. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 2,5. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 3. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 3,5. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 4. En algunas modalidades, el DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8 o alrededor de 3,9. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 5. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 6. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 7. En algunas modalidades, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 8.

[00156] En algunas modalidades preferidas, la DAR para un conjugado proporcionado en la presente es alrededor de 4.

10. Vectores, células huésped y métodos recombinantes

[00157] Las modalidades también se refieren a la provisión de ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos anti-BCMA, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos, y técnicas recombinantes para la producción de los anticuerpos.

[00158] Para la producción recombinante del anticuerpo, los ácidos nucleicos que lo codifican se pueden aislar e insertar en un vector replicable para posterior clonación (es decir, amplificación del ADN) o expresión. En algunos aspectos, el ácido nucleico se puede producir mediante recombinación homóloga, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 5.204.244, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00159] Se conocen muchos vectores diferentes en el estado de la técnica. Los componentes del vector, en general, incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 5.534.615, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00160] Los ejemplos ilustrativos de células huésped adecuadas se proporcionan más adelante. No se pretende que estas células huésped sean limitativas.

[00161] Las células huésped adecuadas incluyen cualquier célula procariota (por ejemplo, bacteriana), eucariota inferior (por ejemplo, levadura), o eucariota superior (por ejemplo, de mamífero). Las procariotas adecuadas incluyen eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia* (*E. coli*), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* (*S. typhimurium*), *Serratia* (*S. marcescans*), *Shigella*, *Bacilli* (*B. subtilis* y *B. licheniformis*), *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* útil es *E. coli* 294, aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776, y *E. coli* W3110.

[00162] Además de las procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levadura, también son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti-BCMA. *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocido como levadura de panadería, es un microorganismo huésped eucariótico inferior

habitualmente usado. Sin embargo, una cantidad de otros géneros, especies y cepas están disponibles y son útiles, tales como *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, SF9), *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickerhamii*, *K. waltii*, *K. drosophilum*, *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*), *Yarrowia*, *Pichia pastoris*, *Candida* (*C. albicans*), *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces* (*S. occidentalis*), y hongos filamentosos tales como *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* (*A. nidulans* y *A. niger*).

[00163] Las células huésped de mamíferos útiles incluyen células COS-7, células HEK293; células de riñón de hámster bebé (BHK); de ovario de hámster chino (CHO); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono verde africano (VERO-76), y similares.

[00164] Las células huésped que se usan para obtener el anticuerpo anti-BCMA de la presente invención se pueden cultivar en varios medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como, F10 de Ham, medio esencial mínimo (MEM), RPMI-1640 y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth Enz.*, 1979, 58:44; Barnes et al., *Anal. Biochem.*, 1980, 102:255; y las patentes estadounidenses N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 y 5.122.469, o WO 90/03430 y WO 87/00195 se pueden usar. Cada una de las anteriores referencias se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[00165] Cualquiera de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes, en general, en concentraciones finales en el rango micromolar), glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros complementos necesarios en concentraciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica.

[00166] Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

[00167] Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de manera intracelular, como una primera etapa, los

residuos de partículas ya sean células huésped o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Por ejemplo, Carter et al. (*Bio/Technology*, 1992, 10:163-167) describen un proceso para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. coli*. En síntesis, la pasta celular es descongelada en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los residuos celulares se pueden retirar mediante centrifugación.

[00168] En algunas modalidades, el anticuerpo se produce en un sistema libre de células. En algunos aspectos, el sistema libre de células es un sistema de transcripción y traducción *in vitro* como se describe en Yin et al., *mAbs*, 2012, 4:217-225, que se incorpora por referencia en su totalidad. En algunos aspectos, el sistema libre de células utiliza un extracto libre de células de una célula eucariota o de una célula procariota. En algunos aspectos, la célula procariota es *E. coli*. La expresión libre de células del anticuerpo puede ser útil, por ejemplo, en donde el anticuerpo se acumula en una célula como un agregado insoluble, o en donde los rendimientos de la expresión periplásmica son bajos. Los anticuerpos producidos en un sistema libre de células pueden ser aglucosilados según la fuente de las células.

[00169] Cuando el anticuerpo es segregado en el medio, los sobrenadantes de esos sistemas de expresión en general primero se concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon[®] o Millipore[®] Pellicon[®]. Un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para evitar el desarrollo de contaminantes no previstos.

[00170] La composición de anticuerpos preparada de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad; la cromatografía por afinidad es una técnica de purificación particularmente útil. La conveniencia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 1983, 62:1-13, que se incorpora por referencia en su totalidad). La proteína G es útil para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.*, 1986, 5:1567-1575, que se incorpora por referencia en su totalidad).

[00171] La matriz a la que se une el ligando de afinidad es, con frecuencia, agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina BakerBond ABX[®] es útil para la purificación.

[00172] Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de sílice, cromatografía de heparina-Sepharose[®], cromatofoco, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, también están disponibles, y pueden ser aplicadas por un experto en la técnica.

[00173] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH de alrededor de 2,5 a alrededor de 4,5, lo cual se realiza, en general, con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a alrededor de 0 a alrededor de 0,25 M).

11. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

[00174] Los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se pueden formular en composiciones farmacéuticas usando los métodos disponibles en el estado de la técnica y aquellos divulgados en la presente. Cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se puede proporcionar en la composición farmacéutica apropiada y administrar mediante una vía adecuada de administración.

[00175] Los métodos proporcionados en la presente abarcan administrar composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un conjugado de anticuerpo proporcionado en la presente y uno o más portadores compatibles y aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En este contexto, la expresión "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa que está aprobado por un ente regulador del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América u otra farmacopea habitualmente reconocida para usar en animales, y más en particular, en seres humanos. El término "portador" incluye un diluyente, un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto)), un excipiente o un vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que

incluyen aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua se puede usar como un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de glicerol y dextrosa acuosas también se pueden usar como portadores líquidos, en particular, para soluciones inyectables. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Martin, E.W., *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

[00176] En la práctica clínica, las composiciones farmacéuticas o conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se pueden administrar mediante cualquier vía conocida en el estado de la técnica. Las vías de administración de ejemplo incluyen, entre otras, las vías de inhalación, intraarterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, nasal, parenteral, pulmonar y subcutánea. En algunas modalidades, una composición farmacéutica o conjugado de anticuerpo proporcionados en la presente se administran por vía parenteral.

[00177] Las composiciones para administración parenteral pueden ser emulsiones o soluciones estériles. Las composiciones parenterales pueden incluir, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo). Estas composiciones también pueden contener agentes humectantes, isotónicos, emulgentes, de dispersión y estabilizantes. La esterilización se puede llevar a cabo de muchas maneras, por ejemplo, usando un filtro bacteriológico, mediante radiación o mediante calentamiento. Las composiciones parenterales también se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver al momento de su uso en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

[00178] En algunas modalidades, una composición proporcionada en la presente es una composición farmacéutica o una forma de dosis unitaria única. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosis unitarias únicas proporcionadas en la presente comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de uno o más conjugados de anticuerpo profilácticos o terapéuticos.

[00179] La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes farmacéuticos. Se puede usar cualquier excipiente farmacéutico adecuado, y un experto en la técnica es capaz de seleccionar excipientes farmacéuticos adecuados. Los ejemplos no limitativos de los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa,

sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. El hecho de que un excipiente particular sea adecuado para la incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosis depende de diversos factores conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, entre otros, el modo en el que la forma de dosis se administrará a un sujeto y el anticuerpo específico en la forma de dosis. La composición o la forma de dosis unitaria única, si se desea, también puede contener cantidades pequeñas de agentes humectantes o emulgentes, o agentes amortiguadores de pH. En consecuencia, los excipientes farmacéuticos proporcionados más adelante pretenden ser ilustrativos y no limitativos. Los excipientes farmacéuticos adicionales incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Rowe et al. (Eds.) 6.^a Ed. (2009), que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00180] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un agente antiespuma. Se puede usar cualquier agente antiespuma adecuado. En algunos aspectos, el agente antiespuma se selecciona de un alcohol, un éter, un aceite, una cera, una silicona, un tensioactivo, y combinaciones de estos. En algunos aspectos, el agente antiespuma se selecciona de un aceite mineral, un aceite vegetal, etilen bis estearamida, una cera de parafina, una cera de éster, una cera de alcohol graso, un alcohol graso de cadena larga, un jabón de ácido graso, un éster de ácido graso, un silicio glicol, una fluorosilicona, un copolímero de polietilenglicol-polipropilenglicol, polidimetilsiloxano-dióxido de silicio, éter, octil alcohol, alcohol caprílico, trioleato de sorbitán, alcohol de etilo, 2-etil-hexanol, dimeticona, alcohol de oleílo, simeticona, y combinaciones de estos.

[00181] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un cosolvente. Los ejemplos ilustrativos de cosolventes incluyen etanol, poli(etilen)glicol, butilenglicol, dimetilacetamida, glicerina y propilenglicol.

[00182] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un amortiguador. Los ejemplos ilustrativos de amortiguadores incluyen acetato, borato, carbonato, lactato, malato, fosfato, citrato, hidróxido, dietanolamina, monoetanolamina, glicina, metionina, goma guar y glutamato monosódico.

[00183] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un portador o agente de relleno. Los ejemplos ilustrativos de portadores o agentes de relleno incluyen

lactosa, maltodextrina, manitol, sorbitol, quitosano, ácido esteárico, goma xantana y goma guar.

[00184] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo. Los ejemplos ilustrativos de tensioactivos incluyen *d*-alfa-tocoferol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, docusato de sodio, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, ácido láurico, hidroxiestearato macrogol 15, alcohol de miristilo, fosfolípidos, éteres de alquilo polioxietilenados, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán, estearatos de polioxietileno, polioxilglicéridos, lauril sulfato de sodio, ésteres de sorbitán y vitamina E succinato de polietilen(glicol).

[00185] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un agente antiaglutinante. Los ejemplos ilustrativos de agentes antiaglutinantes incluyen fosfato (tribásico) de calcio, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y óxido de magnesio.

[00186] Otros excipientes que se pueden usar con las composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, albúmina, antioxidantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, polímeros bioabsorbibles, agentes quelantes, agentes de liberación controlada, diluyentes, agentes de dispersión, mejoradores de la disolución, agentes emulgentes, agentes gelificantes, bases de pomadas, mejoradores de penetración, conservantes, agentes solubilizantes, solventes, agentes estabilizantes y azúcares. Los ejemplos específicos de cada uno de estos agentes se describen, por ejemplo, en *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Rowe et al. (Eds.) 6.^a Ed. (2009), The Pharmaceutical Press, que se incorpora por referencia en su totalidad.

[00187] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un solvente. En algunos aspectos, el solvente es una solución salina, tal como una solución de dextrosa o solución salina isotónica estéril. En algunos aspectos, el solvente es agua para inyección.

[00188] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas están en forma particulada, tal como una micropartícula o una nanopartícula. Las micropartículas y nanopartículas pueden estar formadas de cualquier material adecuado, tal como un polímero o un lípido. En algunos aspectos, las micropartículas o nanopartículas son micelas, liposomas, o polimersomas.

[00189] También se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosis que comprenden un conjugado de anticuerpo, ya que, en algunas modalidades, el agua puede facilitar la degradación de algunos anticuerpos.

[00190] Las composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosis proporcionadas en la presente se pueden preparar usando ingredientes que contienen baja humedad o son anhidros y condiciones de baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosis que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria pueden ser anhidros si se espera un contacto sustancial con humedad durante la fabricación, el envasado y/o el almacenamiento.

[00191] Una composición farmacéutica anhidra puede prepararse y almacenarse de modo que se mantenga su naturaleza anhidra. En consecuencia, las composiciones anhidras se pueden envasar usando materiales que se conocen porque evitan la exposición al agua de modo que puedan incluirse en kits de medicamentos adecuados. Los ejemplos de envasado adecuado incluyen, entre otros, láminas selladas herméticamente, plásticos, contenedores de dosis unitarias (por ejemplo, viales), blísteres y paquetes de tiras.

[00192] Las composiciones libres de lactosa proporcionadas en la presente pueden comprender excipientes que son conocidos en el estado de la técnica y se enumeran, por ejemplo, en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) SP (XXI)/NF (XVI). En general, las composiciones libres de lactosa comprenden un ingrediente activo, un aglutinante/agente de relleno, y un lubricante en cantidades aceptables y compatibles desde el punto de vista farmacéutico. Las formas de dosis libre de lactosa de ejemplo comprenden un ingrediente activo, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado y estearato de magnesio.

[00193] También se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosis que comprenden uno o más excipientes que reducen la velocidad a la que un anticuerpo o conjugado de anticuerpo se descompone. Tales excipientes, que se denominan en la presente “estabilizantes”, incluyen, entre otros, antioxidantes tales como ácido ascórbico, amortiguadores de pH o amortiguadores de sal.

11.1. Formas de dosificación parenterales

[00194] En determinadas modalidades, se proporcionan formas de dosis parenterales. Las formas de dosis parenterales se pueden administrar a los sujetos mediante diversas vías que incluyen, entre otras, subcutánea, intravenosa (que incluye inyección de bolo), intramuscular e intraarterial. Dado que, en general, su administración elude las defensas naturales del sujeto contra contaminantes, las formas de dosis parenterales son, en general, estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un sujeto. Los ejemplos de formas de dosis parenterales incluyen, entre otras, soluciones listas para la inyección, productos secos listos

para disolver o suspender en un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico para la inyección, suspensiones listas para la inyección y emulsiones.

[00195] Los vehículos adecuados que se pueden usar para proporcionar formas de dosis parenterales son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, entre otros: Agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, entre otros, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles en agua tales como, entre otros, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, entre otros, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

[00196] Los excipientes que aumentan la solubilidad de uno o más de los anticuerpos divulgados en la presente también se pueden incorporar en las formas de dosis parenterales.

11.2. Kits y formas de dosis unitarias

[00197] En los tratamientos de seres humanos, el médico determinará la posología que considera más apropiada de acuerdo con un tratamiento preventivo o curativo y de acuerdo con la edad, peso, afección y otros factores específicos del sujeto que se debe tratar.

[00198] En determinadas modalidades, una composición proporcionada en la presente es una composición farmacéutica o una única forma de dosis unitaria. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosis unitarias únicas proporcionadas en la presente comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos profilácticos o terapéuticos.

[00199] La cantidad de la composición o conjugado de anticuerpo que será eficaz para la prevención o tratamiento de un trastorno o uno o más síntomas de este varía con la naturaleza y gravedad de la enfermedad o afección, y la vía por la que el anticuerpo se administra. La frecuencia y dosificación también varían de acuerdo con los factores específicos para cada sujeto, en función del tratamiento específico (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos) administrado, la gravedad del trastorno, enfermedad o afección, la vía de administración, además de la edad, el peso corporal, la respuesta y los antecedentes médicos del sujeto. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de respuesta a la dosis, derivadas de sistemas de prueba en modelos de animales o *in vitro*.

[00200] En determinadas modalidades, la dosis de ejemplo de una composición incluyen cantidades de miligramos o microgramos del anticuerpo por kilogramo del sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, alrededor de 10 microgramos por kilogramo a alrededor de 50 miligramos por kilogramo, alrededor de 100 microgramos por kilogramo a alrededor de 25 miligramos por kilogramo, o alrededor de 100 microgramos por kilogramo a alrededor de 10 miligramos por kilogramo). En determinada modalidad, la dosis del conjugado de anticuerpo proporcionada en la presente, en función del peso del anticuerpo, administrada para prevenir, tratar, controlar o mejorar un trastorno, o uno o más síntomas de este en un sujeto es 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, o 15 mg/kg o más del peso corporal de un sujeto. En otra modalidad, la dosis de la composición o una composición proporcionada en la presente administrada para prevenir, tratar, controlar o mejorar un trastorno, o uno o más síntomas de este en un sujeto es 0,1 mg a 200 mg, 0,1 mg a 100 mg, 0,1 mg a 50 mg, 0,1 mg a 25 mg, 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 7,5 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 mg a 7,5 mg, 0,25 mg a 5 mg, 0,25 mg a 2,5 mg, 0,5 mg a 20 mg, 0,5 a 15 mg, 0,5 a 12 mg, 0,5 a 10 mg, 0,5 mg a 7,5 mg, 0,5 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 7,5 mg, 1 mg a 5 mg, o 1 mg a 2,5 mg.

[00201] La dosis se puede administrar de acuerdo con un cronograma adecuado, por ejemplo, una, dos veces, tres veces, o cuatro veces por semana. Puede ser necesario usar dosis del conjugado de anticuerpo por fuera de los rangos divulgados en la presente en algunos casos, como será aparente para los expertos en la técnica. Además, cabe destacar que el médico clínico o médico a cargo del tratamiento sabrá cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar el tratamiento según la respuesta del sujeto.

[00202] Diferentes cantidades terapéuticamente eficaces pueden ser aplicables para diferentes enfermedades y afecciones, como es sabido por los expertos en la técnica. De manera similar, las cantidades suficientes para prevenir, controlar, tratar o mejorar tales trastornos, pero insuficiente para causar, o suficiente para reducir, efectos adversos asociados con los anticuerpos proporcionados en la presente también se abarcan mediante las cantidades de dosis y cronogramas de frecuencia de dosificación descritos en la presente. Además, cuando se le administran a un sujeto múltiples dosis de una composición proporcionada en la presente, no todas las dosis deben ser las mismas. Por ejemplo, la dosis administrada al sujeto

se puede aumentar para mejorar el efecto profiláctico o terapéutico de la composición o se puede disminuir para reducir uno o más efectos secundarios que tiene un sujeto particular.

[00203] En determinadas modalidades, el tratamiento o prevención se pueden iniciar con una o más dosis de carga de un conjugado de anticuerpo o composición proporcionados en la presente, seguido de una o más dosis de mantenimiento.

[00204] En determinadas modalidades, una dosis de un conjugado de anticuerpo o composición proporcionados en la presente se puede administrar para lograr una concentración de estado estacionario del anticuerpo en sangre o suero del sujeto. La concentración de estado estacionario se puede determinar mediante mediciones de acuerdo con las técnicas disponibles para los expertos en la técnica o puede ser en función de las características físicas del sujeto, tales como altura, peso y edad.

[00205] En determinadas modalidades, la administración de la misma composición se puede repetir, y las administraciones se pueden separar en al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o 6 meses. En otras modalidades, la administración del mismo agente profiláctico o terapéutico se puede repetir, y la administración se puede separar en al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o 6 meses.

11.3. Tratamientos conjuntos y formulaciones

[00206] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos divulgados en la presente, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, bendamustina (TREANDA®, Cephalon), Venetoclax (VENCLEXTA®, Abbvie, Genentech), Denosumab (XGEVA®, Amgen; PROLIA®, Amgen), Carfilzomib (KYPROLIS®, Amgen), Ixazomib (NINLARO®, Takeda), Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozole (FEMARA®, Novartis), Imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs), y Gefitinib

(IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bulatacín y bulatacinona); una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán); briostatín; calistatín; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesín, carzelesín y bizelesín); criptoficinas (en particular, criptoficín 1 y criptoficín 8); dolastatín; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobín; pancratistatín; un sarcodictiín; spongistatín; mostazas del nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazín, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloroetamina, óxido de mecloroetamina clorhidrato, melfalán, novembichín, fenesterina, prednimustina; trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocín, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, en especial uncialamicina, calicheamicina gammall, y calicheamicina omegall (Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicín, caminomicina, carzinofilín, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicín, detorubicín, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicín), morfolino-doxorubicín, cianomorfolino-doxorubicín, 2-pirrolino-doxorubicín y desoxidoxorubicín), epirubicín, esorubicín, idarubicín, marcellomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, porfiromicina, puromicinae, quelamicina, rodorubicín, streptonigrín, streptozocín, tubercidín, ubenimex, zinostatín, zorubicín; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterín, metotrexato, pladienolida B, pteropterín, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; regenerador del ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina;

bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; democolcina; diaziquona; elfomitina; elliptinio acetato; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocina; mitoguazona, mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatín; fenamet; pirarubicín; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, la toxina T-2, verracurín A, roridín A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas por ingeniería genética de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatín y carboplatín; vinblastina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina)TM; novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicina; aminopterín; capecitabín (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados aceptables desde el punto de vista farmacéutico de cualquiera de los anteriores.

[00207] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpos proporcionados en la presente en combinación con uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 comprenden un bloqueador de moléculas pequeñas de la vía de PD-1 o PD-L1. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 comprenden un anticuerpo que inhibe la actividad de PD-1 o PD-L1. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 se seleccionan del grupo que consiste en: CA-170, BMS-8, BMS-202, BMS-936558, CK-301, y AUNP12. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 se seleccionan del grupo que consiste en: avelumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab, AMP-224 (GlaxoSmithKline), MEDI0680/AMP-514 (AstraZeneca), PDR001 (Novartis), cemiplimab, TSR-042 (Tesaro, GlaxoSmithKline),

Tizlelizumab/BGB-A317 (Beigene), CK-301 (Checkpoint Therapeutics), BMS-936559 (Bristol-Meyers Squibb), cemiplimab (Regeneron), camrelizumab, sintilimab, toripalimab, genolimzumab, y A167 (Sichuan Kelun-Biotech Biopharmaceutical). En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 se seleccionan del grupo que consiste en: MGA012 (Incyte/MacroGenics), PF-06801591 (Pfizer/Merck KGaA), LY3300054 (Eli Lilly), FAZ053 (Novartis), PD-11 (Novartis), CX-072 (CytomX), BGB-A333 (Beigene), BI 754091 (Boehringer Ingelheim), JNJ-63723283 (Johnson and Johnson/Janssen), AGEN2034 (Agenus), CA-327 (Curis), CX-188 (CytomX), STI –A1110 (Servier), JTX-4014 (Jounce), AM0001 (Armo Biosciences, Eli Lilly), CBT-502 (CBT Pharmaceuticals), FS118 (F-Star/Merck KGaA), XmAb20717 (Xencor), XmAb23104 (Xencor), AB122 (Arcus Biosciences), KY1003 (Kymab), RXI-762 (RXi). En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 se seleccionan del grupo que consiste en: PRS-332 (Pieris Pharmaceuticals), ALPN-202 (Alpine Immune Science), TSR-075 (Tesar/Anaptys Bio), MCLA-145 (Merus), MGD013 (MacroGenics), MGD019 (MacroGenics), RO7121661 (Hoffman-La Roche), LY3415244 (Eli Lilly). En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de PD-1 o PD-L1 se seleccionan de un anticuerpo anti-PD1 monoespecífico o biespecífico descrito en, por ejemplo, WO 2016/077397, WO 2018/156777, y la solicitud internacional N.º PCT/US2013/034213, presentada el 23 de mayo de 2018.

[00208] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente en combinación con uno o más inhibidores de LAG3, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de LAG3 comprenden un bloqueador de moléculas pequeñas de la vía de LAG3. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de LAG3 comprenden un anticuerpo que inhibe la actividad de LAG3. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de LAG3 se seleccionan del grupo que consiste en: IMP321 (Eftilagimod alpha, Immutep), relatilimab (Bristol-Myers Squibb), LAG525 (Novartis), MK4280 (Merck), BI 754111 (Boehringer Ingelheim), REGN3767 (Regeneron/Sanofi), Sym022 (Symphogen) y TSR-033 (Tesar/GSK).

[00209] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente en combinación con uno o más inhibidores de

TIM3, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de TIM3 comprenden un bloqueador de moléculas pequeñas de la vía de TIM3. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de TIM3 comprenden un anticuerpo que inhibe la actividad de TIM3. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de TIM3 se seleccionan del grupo que consiste en: TSR-022 (Tesaro), LY3321367 (Eli Lilly), Sym023 (Symphogen) y MBG453 (Novartis).

[00210] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente en combinación con uno o más inhibidores de CD73, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD73 comprenden un bloqueador de moléculas pequeñas de la vía de CD73. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD73 comprenden un anticuerpo que inhibe la actividad de CD73. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD73 se seleccionan del grupo que consiste en: MEDI9447 (Medimmune), AB680 (Arcus), y BMS-986179 (Bristol-Myers Squibb).

[00211] En determinadas modalidades, se proporcionan composiciones, formulaciones terapéuticas, y métodos de tratamiento o usos que comprenden cualquiera de los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente en combinación con uno o más inhibidores de CD39, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que lo necesitan. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD39 comprenden un bloqueador de moléculas pequeñas de la vía de CD39. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD39 comprenden un anticuerpo que inhibe la actividad de CD39. En algunas modalidades, el uno o más inhibidores de CD39 se seleccionan del grupo que consiste en: CPI-444 (Corvus), PBF-509 (Pablobio, Novartis), MK-3814 (Merck), y AZD4635 (AstraZeneca).

[00212] En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con VELCADE® (bortezomib), KYPROLIS® (Carfilzomib), NINLARO® (Ixazomib). En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con FARYDAK® (panobinostat). En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con DARZALEX® (daratumumab). En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con EMPLICITI® (elotuzumab). En determinadas modalidades,

los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con AREDIA® (pamidronato) o ZOMETA® (ácido zolendróico). En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con XGEVA® (denosumab) o PROLIA® (denosumab).

[00213] En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en combinación con un inhibidor de gamma secretasa (GSI), por ejemplo, avagacestat (BMS-708163; Bristol-Myers Squib), MK-0752 (Merck & Co.), R04929097 (Roche), semagacestat (LY-450139; Eli Lilly & Co.), DAPT (t-butiléster de N-[N-(3,5-difluorofenilacetil-L-alanil)]-S-fenilglicina), L685,458, compuesto E ((s,s)-2-(3,5-difluorofenil)-acetilamino-1-N-(1-metil-2-oxo-5-fenil-2,3-dihidro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-il)-propionamida), DBZ (dibenzazepina), JLK6 (7-amino-4-cloro-3-metoxiisocumarina), o [11-endo]-N-(5,6,7,8,9,10-hexahidro-6,9-metano benzo[9][8]anulen-11-il)-tiofen-2-sulfonamida.

[00214] Los agentes administrados en combinación con los conjugados de anticuerpo divulgados en la presente se pueden administrar justo antes, durante, o poco después de la administración de los conjugados de anticuerpo. En determinadas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran en un primer cronograma de dosis, y el uno o más segundos agentes se administran con sus propios cronogramas de dosis. A los fines de la presente descripción, tales regímenes de administración se consideran la administración de un conjugado de anticuerpo “en combinación con” un componente adicional terapéuticamente activo. Las modalidades incluyen composiciones farmacéuticas en las que un conjugado de anticuerpo divulgado en la presente se coformula con uno o más de los agentes quimioterapéuticos, inhibidores de PD-1, o inhibidores de PD-L1 divulgados en la presente.

12. Aplicaciones terapéuticas

[00215] Para aplicaciones terapéuticas, los conjugados de anticuerpo de la presente invención se administran a un mamífero, en general, un ser humano, en una forma de dosis aceptable desde el punto de vista farmacéutico tal como aquellas conocidas en el estado de la técnica y aquellas analizadas anteriormente. Por ejemplo, los conjugados de anticuerpo de la presente invención se pueden administrar a un ser humano de forma intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal o

intratumoral. Los conjugados de anticuerpo también se administran de manera adecuada por vía peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. La vía intraperitoneal puede ser particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores de ovario.

[00216] Los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección que implique BCMA. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección que se puede diagnosticar mediante sobreexpresión de BCMA. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección que se puede beneficiar del tratamiento con un anticuerpo anti-BCMA. En algunas modalidades, la enfermedad o la afección es un tipo de cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o la afección es leucemia, linfoma o mieloma múltiple.

[00217] Cualquier tipo de cáncer adecuado se puede tratar con los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente. Los tipos de cáncer ilustrativos adecuados incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma corticosuprarrenal, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, carcinoma de células basales, tumor cerebral, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer óseo, cáncer de mama, tumor bronquial, carcinoma de sitio primario desconocido, tumor cardíaco, cáncer de cuello uterino, cordoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, carcinoma ductal, tumor embrionario, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioneuroblastoma, histiocitoma fibroso, sarcoma de Ewing, cáncer de ojo, tumor de células germinales, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, enfermedad trofoblástica de la gestación, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, histiocitosis, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células de islotes, Kaposi sarcoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, carcinoma lobular *in situ*, cáncer de pulmón, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello con sitio primario oculto, carcinoma de línea media que implican el gen *NUT*, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer orofaríngeo,

osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitomas, tumor hipofisario, blastoma pleuropulmonar, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal o uretra, retinoblastoma, tumor rabdoide, cáncer de glándulas salivales, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumor de la médula espinal, cáncer de estómago, linfoma de linfocitos T, tumor teratoideo, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma y carcinoma de timo, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, y tumor de Wilms.

[00218] En algunas modalidades, la enfermedad que se debe tratar con los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente es cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de células renales, cáncer de cuello uterino, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma cerebral, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, mesotelioma, y/o un tipo de cáncer de origen epitelial. En modalidades particulares, la enfermedad es cáncer colorrectal. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer de ovario. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer de mama. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer de pulmón. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer de cabeza y cuello. En algunas modalidades, la enfermedad es carcinoma de células renales. En algunas modalidades, la enfermedad es carcinoma cerebral. En algunas modalidades, la enfermedad es carcinoma endometrial.

[00219] En determinadas modalidades, la enfermedad que se debe tratar con los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente es mieloma múltiple. En modalidades específicas, el mieloma múltiple es de Etapa I, Etapa II, o Etapa III de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado. En algunas modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recientemente diagnosticado. En otras modalidades, dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante o resistente.

[00220] Según el Sistema de estadificación internacional (ISS), las etapas del mieloma múltiple son las siguientes: Etapa I: Beta-2-microglobulina en suero < 3,5 mg/l y albúmina en suero $\geq 3,5$ g/dl; Etapa II: No es la Etapa I o la Etapa III; Etapa III: Beta-2-microglobulina en suero $\geq 5,5$ mg/l. Según el Sistema de estadificación internacional revisado (R-ISS), las etapas de mieloma múltiple son las siguientes: Etapa I: Etapa I de ISS y anormalidades

cromosómicas de riesgo estándar mediante hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH)(es decir, sin alto riesgo) y nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero en o por debajo del límite superior de la normalidad; Etapa II: No es la Etapa I o III de R-ISS; Etapa III: Etapa III de ISS y anormalidades cromosómicas de alto riesgo mediante FISH (por ejemplo, presencia de del(17p) y/o translocación t(4;14) y/o translocación t(14;16)) o nivel de LDH en suero por sobre el límite superior de la normalidad.

[00221] El mieloma múltiple también se puede dividir en etapas usando el sistema Durie-Salmon. Según este sistema, el mieloma múltiple se clasifica como Etapa I, II o III (1, 2 o 3). Además, cada etapa se clasifica en A o B, en función de si la función renal fue afectada, en donde la clasificación B indica daño renal significativo. Etapa I: Las pacientes no muestran síntomas; sin embargo, si el cáncer afectó la función renal, el pronóstico puede ser peor sin importar la etapa. Los factores característicos de la Etapa I incluyen: La cantidad de glóbulos rojos está dentro del rango normal o levemente por debajo; cantidad normal de calcio en la sangre; bajos niveles de proteína M en la sangre u orina; proteína M <5 g/dl para IgG; <3 g/dl para IgA; <4 g/24 h para cadena liviana urinaria; y/o sin daño óseo en ratos x o solo 1 lesión ósea es visible. Etapa II: Más células cancerosas están presentes en el cuerpo en la Etapa II, y si se afecta la función renal, el pronóstico empeora sin importar la etapa. Los criterios para la Etapa II se definen como aquellos que no corresponden a la Etapa I ni a la Etapa III. Etapa III: Muchas células cancerosas están presentes en el cuerpo en la Etapa III. Los factores característicos de esta etapa incluyen: Anemia, con una hemoglobina <8,5 g/dl; hipercalcemia; daño óseo avanzado (3 o más lesiones óseas); altos niveles de proteína M en sangre u orina; y/o proteína M >7 g/dl para IgG; >5 g/dl para IgA; >12 g/24 h para cadena liviana urinaria.

13. *Aplicaciones de diagnóstico*

[00222] En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se usan en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-BCMA puede ser útil en ensayos de proteína BCMA. En algunos aspectos el conjugado de anticuerpo se puede usar para detectar la expresión de BCMA en diversas células y tejidos. Estos ensayos pueden ser útiles, por ejemplo, para elaborar un diagnóstico y/o pronóstico para una enfermedad, tales como un tipo de cáncer.

[00223] En algunas aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico, el conjugado de anticuerpo se puede etiquetar con una porción detectable. Las porciones detectables

adecuadas incluyen, entre otras, radioisótopos, etiquetas fluorescentes y etiquetas de sustratos enzimáticos. En otra modalidad, el conjugado de anticuerpo anti-BCMA no necesita ser etiquetado, y la presencia del conjugado de anticuerpo se puede detectar usando un anticuerpo etiquetado que se fija específicamente al conjugado de anticuerpo anti-BCMA.

14. Reactivos de purificación por afinidad

[00224] Los conjugados de anticuerpo proporcionados en la presente se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los conjugados de anticuerpo se pueden inmovilizar en una fase sólida, tal como una resina o un papel de filtro, mediante los métodos conocidos en el estado de la técnica. Se pone en contacto el conjugado de anticuerpo inmovilizado con una muestra que contiene la proteína BCMA (o un fragmento de esta) que se debe purificar, y posteriormente el soporte se lava con un solvente adecuado que retirará prácticamente todo el material en la muestra, excepto la proteína BCMA, que se fija al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado, tal como amortiguador de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína BCMA del anticuerpo.

15. Kits

[00225] En algunas modalidades, un conjugado de anticuerpo anti-BCMA proporcionado en la presente se proporciona en forma de un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo un procedimiento. En algunas modalidades, el procedimiento es un ensayo de diagnóstico. En otras modalidades, el procedimiento es un procedimiento terapéutico.

[00226] En algunas modalidades, el kit también comprende un solvente para reconstituir el conjugado de anticuerpo anti-BCMA. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo anti-BCMA se proporciona en forma de una composición farmacéutica.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-BCMA

Generación y selección de expresión de fagos

[00227] La expresión de fagos se usó para descubrir las guías iniciales de anticuerpo humano 2190-B01 y 2213-A06. Las colecciones de anticuerpo Fab se construyeron con el

uso de un codón de secuencia de Fab de trastuzumab optimizado en un vector fagémido p3 modificado disponible en el comercio (Antibody Design Labs). En síntesis, el vector fagémido se modificó para expresar cadenas pesadas de Fab como proteínas de fusión p3 del terminal C, y regiones reguladoras (codones de inicio, sitios de enzima de restricción, secuencias líder periplásmicas) se optimizaron para los niveles de expresión de Fab. Las colecciones se construyeron con el uso de un protocolo de PCR de extensión superpuesta estándar con cebadores mutagénicos que actúan sobre regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada. Ver Heckman y Pease, *Nat. Protoc.*, 2007, 2:924-932. Las colecciones se rescataron a través de electroporación en células *E. coli* SS320 infectadas con M13-K07. Las selecciones de colecciones se llevaron a cabo con el uso de protocolos de expresión de fagos estándar. Ver Rajan & Sidhu, *Methods Enzymol.*, 2012, 502:3-23; Marks & Bradbury, *Methods Mol Biol.*, 2004, 248:161-76. De acuerdo con varias rondas de selección, las agrupaciones de cadena pesada de Fab se transfirieron a vectores de expresión libres de células para la expresión como IgG1 marcada con His6 y FLAG.

Selecciones de expresión de ribosomas

[00228] La expresión de ribosomas se usó para descubrir las guías iniciales de anticuerpo humano 2137-A05 y 2137-C07. La expresión de ribosomas también se usó para 2137-C07, 2137-A05, 2190-B01 y 2213-A06 maduros por afinidad para generar un derivado 2265 mejorado, entre otros.

[00229] Las colecciones de anticuerpo Fab se construyeron con el uso de un protocolo de PCR de extensión superpuesta estándar con cebadores mutagénicos que actúan sobre regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Ver Heckman & Pease, *supra*. Las selecciones de anticuerpos novedosos se llevaron a cabo usando protocolos de expresión de ribosomas estándar. Ver Hanes & Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94:4937–4942. Específicamente, las selecciones de expresión de ribosomas a base de Fab se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos publicados. Ver Stafford *et al.*, 2014, *Protein Eng. Des. Sel.* 27:97-109; Dreier y Plückthun, 2011, *Methods Mol Biol* 687:283-306. Después de varias rondas de selección, el ADN de producción de RT-PCR se clonó en un vector optimizado para la expresión libre de células usando técnicas de biología molecular estándares. Ver Yin *et al.*, 2012, *mAbs* 4:217-225. Todos los constructos se etiquetaron con HIS y FLAG para optimizar la purificación y evaluación durante el cribado.

[00230] Los ejemplos de anticuerpos se informan en la Tabla 6. El anticuerpo 4 también se denomina “Anticuerpo 2265-F02” en la presente.

Tabla 6. Anticuerpos producidos por la expresión de ribosomas y fagos

Anticuerpo	V _H	SEQ ID NO.	V _L	SEQ ID NO.
4	2265-F02	13	Trastuzumab	14

EJEMPLO 2

CRIBADO PRIMARIO DE ANTICUERPOS

Cribado primario por ELISA de variantes de anticuerpo

[00231] Las colecciones de variantes de anticuerpos generadas mediante flujo de selección se transformaron en *E. coli* y se cultivaron en placas de agar con antibiótico (kanamicina). Las colonias individuales se cultivaron en caldo líquido (TB + antibiótico kanamicina), y se usaron como plantilla para la amplificación de ADN mediante la amplificación por círculo rodante (RCA). Las variantes se expresaron luego en una reacción de síntesis de proteínas libre de células, como se describe. Ver Yin et al., *mAbs*, 2012, 4:217-225. En síntesis, los extractos libres de células se trataron con 50 µM de yodoacetamida durante 30 min a temperatura ambiente (20 °C) y se agregaron a una premezcla que contenía componentes libres de células (ver Cai et al., *Biotechnol Prg*, 2015, 3:823-831), 10 % (v/v) de plantilla de ADN RCA (aproximadamente 10 µg/ml de ADN) para variantes de HC de interés, y 2,5 µg/ml de trastuzumab LC. Se incubaron 60 µl reacciones libres de células (CF) a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm en placas de 96 cavidades. Se cribaron 400-1500 colonias, en función de la diversidad prevista de diferentes campañas de selección. Luego de la síntesis, cada reacción se diluyó 1:200 y se evaluó para fijarse a la proteína BCMA-Fc humana o de *Macaca fascicularis* mediante ELISA. En síntesis, BCMA-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) se recubrió en placas Maxisorp de 384 cavidades en bicarbonato 0,1M (pH 8,9) y se bloqueó con 1 % de BSA en PBST. Los anticuerpos de una reacción de CF diluida en 1:200 se incubaron en las placas, se lavaron y se detectaron con anticuerpos Fab anti-humanos conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y sustrato ELISA de Pierce Pico Supersignal (ThermoFisher Scientific).

Fijación de células de alto rendimiento

[00232] Un cribado primario de alto rendimiento se llevó a cabo para evaluar rápidamente la fijación de células de anticuerpos producidos en reacciones libres de células en pequeña escala (60 µl). En este cribado, cuatro componentes se combinaron en iguales volúmenes en un volumen final de 100 µl/cavidad en una placa de fondo en forma de U de 96 cavidades (Greiner Catálogo #650201) o una placa de fondo plano de 384-cavidades (Greiner Catálogo #781201). Estos componentes son: 1) Células NCI-H929 que expresan BCMA diluidas en amortiguador de ensayo (1X PBS + 0,2 % de BSA, filtrado de manera estéril) para lograr una concentración final de 500.000 células/cavidad, 2) células MOLT-4 negativas para BCMA teñidas con CellTrace Oregon Green (Invitrogen Catálogo #34555) y diluidas en amortiguador de ensayo para lograr una concentración final de 500.000 células/cavidad, 3) una dilución 1:50 de reacción libre de células que produce el anticuerpo de interés diluido en amortiguador de ensayo, y 4) un anticuerpo anti-humano secundario (anti-IgG humana de asno de F(ab')₂ AffiniPure AlexaFluor 647, específica de Fc; Jackson ImmunoResearch Catálogo #709-606-098) diluido en 1:100 en amortiguador de ensayo. Luego, las placas se incubaron en hielo durante una hora. Las células se convirtieron en pelets girando a 1500 x *g* durante 5 minutos y se volvieron a suspender en amortiguador de ensayo. La citometría de flujo de alto rendimiento se llevó a cabo luego en células resuspendidas en un instrumento FACS (BD Biosciences FACSCanto II o BD Biosciences LSR II), y los datos se analizaron con *software* FlowJo. La fijación del anticuerpo se evaluó mediante el nivel proporcional de señal de anticuerpo secundario (presuntamente debido a la fijación al anticuerpo de interés) en células NCIH929 que expresan BCMA en comparación con la señal en células MOLT-4 que no expresan BCMA.

EJEMPLO 3

CRIBADO SECONDARIO DE ANTICUERPOS

Preparación de IgG

[00233] Las guías principales de la ronda inicial del cribado se cultivaron y se miniprepararon a través del kit de minipreparación Qiaprep 96 Turbo (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 7,5 µg/ml de ADN de HC minipreparado y 2,5 µg/ml de LC de trastuzumab se agregaron a 4 ml de reacciones libres de células y se incubaron durante la noche por 12 h a 30 °C, 650 rpm. Las variantes expresadas de reacciones libres de células clarificadas se purificaron a través de la purificación de IMAC usando un método de

purificación de lotes de alto rendimiento semiautomatizado. En síntesis, las purificaciones se llevaron a cabo en un formato de placas de 96 cavidades, en donde 50 µl/cavidad de resina de IMAC (Ni Sepharose de alto rendimiento, GE Healthcare) se equilibraron en amortiguador de fijación a IMAC (50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol), incubadas con 1 ml de reacción libre de células durante 15 minutos seguidas de dos lavados en amortiguador de fijación de IMAC. Las variantes de anticuerpo etiquetadas con His se eluyeron luego usando 200 µl de amortiguador de elución de IMAC (50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol) y amortiguador intercambiado en PBS usando una placa Zeba de 96 cavidades (7 kD MWCO, Thermofisher). Los anticuerpos purificados se cuantificaron a través de electroforesis capilar de alto rendimiento con el uso de Labchip GXII (Perkin Elmer) contra una curva estándar de Herceptin, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de scFv

[00234] Un anticuerpo monocatenario está elaborado en orientación de V_HV_L o V_LV_H con una secuencia ligadora entre los dominios V_H y V_L . Normalmente, los ligadores de scFv están compuestos de $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 28) repeticiones en donde $n = 3, 4, 5$ o 6 para los ligadores de 15, 20, 25 o 30 residuos, respectivamente. Para la expresión libre de células, se agrega Met de terminal N, pero para la expresión de mamíferos se agrega un péptido líder. En el extremo de terminal C de scFv, se puede agregar una secuencia de Fc para extender la semivida *in vivo*, o se puede usar scFv directamente. Se puede incorporar una secuencia ligadora opcional entre scFv y Fc. Una secuencia ligadora de scFv-Fc de ejemplo es AAGSDQEPKSS (SEQ ID NO: 27). Se pueden agregar opcionalmente etiquetas de afinidad de terminal C para facilitar la purificación y el desarrollo de ensayo. Una etiqueta de afinidad de ejemplo es una etiqueta FlagHis de terminal C GSGDYKDDDDKSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 25). Normalmente se inserta un codón de detención en extremo de la secuencia. Un scFv de ejemplo puede incluir un residuo Met de terminal N, un dominio V_H , un ligador GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26), un dominio V_L , un ligador AAGSDQEPKSS (SEQ ID NO: 27), un dominio Fc, una etiqueta FlagHis y un codón de detención.

Fluorometría de barrido diferencial

[00235] Un ensayo de intercambio térmico de proteínas se llevó a cabo mezclando la proteína que se desea analizar con una tintura sensible al medio ambiente (SYPRO Orange, Life Technologies Catálogo #S-6650) en una solución amortiguada con fosfato (PBS), y

monitoreando la fluorescencia de la mezcla en tiempo real a medida que se sometía a desnaturalización térmica controlada. Las soluciones de proteínas entre 0,2-2 mg/ml se mezclaron en una relación volumétrica de 1:1 con una solución 1:500 diluida en PBS de SYPRO Orange (la tintura de reserva SYPRO Orange es 5000X en DMSO). 10 µl de alícuotas de la mezcla proteína-tintura se suministraron por cuadruplicado en una microplaca de 384 cavidades (Bio-Rad Catálogo #MSP-3852), y la placa se selló con una película de sellado ópticamente transparente (Bio-Rad Catálogo #MSB-1001) y se colocó en un termociclador en tiempo real con placa de 384 cavidades (sistema en tiempo real Bio-Rad CFX384). La mezcla proteína-tintura se calentó de 25 °C a 95 °C, en incrementos de 0,1 °C por ciclo (~1,5 °C por minuto), lo que permitió 3 segundos de equilibrio a cada temperatura antes de tomar una medición de fluorescencia. Al finalizar el experimento, las temperaturas de fusión de transición (TM1 y TM2) se determinaron usando el *software* de gestión Bio-Rad CFX. TM1 representa la temperatura de fusión del dominio Fc. TM2 representa la temperatura de fusión del dominio Fab.

Análisis cinético y de disociación Biacore

[00236] Los anticuerpos policlonales anti-Fab o anti-Fc se inmovilizaron en un chip CM5 (GE Life Sciences) usando química de acoplamiento de aminas (de Amine Coupling Kit, GE Life Sciences). Las etapas de inmovilización se llevaron a cabo a una velocidad de flujo de 25 µl/min en amortiguador 1x de HBS-EP+ (GE Life Sciences; 10x de reserva diluido antes de su uso). Las superficies del sensor se activaron durante 7 minutos con una mezcla de NHS (0,05 M) y EDC (0,2 M). Los anticuerpos anti-Fab o anti-Fc se inyectaron en las 4 células de flujo en una concentración de 25 µg/ml en 10 mM de acetato de sodio, pH 4,5, durante 7 min. Se inyectó etanolamina (1 M, pH 8,5) durante 7 min para bloquear cualquier grupo activado restante. Un promedio de 12.000 unidades de respuesta (RU) del anticuerpo de captura se inmovilizó en cada célula de flujo.

[00237] Los experimentos de fijación cinéticos y de disociación se llevaron a cabo a 25 °C con el uso de amortiguador 1x HBS-EP+. Los anticuerpos de prueba y control se inyectaron en la superficie anti-Fab o anti-Fc en concentraciones de 5-10 µg/ml durante 12 segundos a una velocidad de flujo de 10 µl/min en las células de flujo 2, 3 y 4, y luego mediante un lavado con amortiguador durante 30 segundos a la misma velocidad de flujo. La caracterización cinética de las muestras de anticuerpo se llevó a cabo con un rango de concentraciones de antígeno de 1-100 nM y 1 inyección de 0 nM de antígeno (por ejemplo, 100, 50, 25, 6,25, 1,56 y 0 nM). Después de capturar el ligando (anticuerpo) en la superficie

de anti-Fab o anti-Fc, el analito (BCMA-Fc humano, BCMA-Fc de *Macaca Fascicularis*, o BCMA humano de R&D Systems, producción de proteínas personalizada, o Sigma Aldrich, respectivamente) se fijó durante 180 segundos, y luego mediante una fase de disociación de 600 segundos a una velocidad de flujo de 50 µl/min. Entre cada captura de ligando y ciclo de fijación al analito, la regeneración se llevó a cabo usando 2 inyecciones de 10 mM de glicina pH 2,0 durante 30 segundos a 30 µl/min, y luego mediante una etapa de lavado de amortiguador de 30 segundos.

[00238] Los datos se ajustaron con el *software* Biacore T200 Evaluation, usando un modelo de fijación Langmuir 1-1. K_D (afinidad, nM) se determinó como una relación de las constantes de relación cinética calculadas a partir de los ajustes de las fases de asociación y disociación.

Líneas celulares y condiciones de cultivo celular

[00239] NCI-H929, U266B1, MOLT-4 y ARP-1, se obtuvieron de ATCC y Keats Lab (Tgen, Phoenix, AZ). Las células recombinantes 293T-cynoBCMA y 293T-ratBCMA se generaron mediante la transfección de células 293T con un plásmido que contiene secuencias de cADN de BMCA de *Macaca fascicularis* o rata y la selección de la mayor expresión estable de BCMA de *Macaca fascicularis* o BCMA de rata en la superficie celular. Las células NCI-H929, U266B1 y MOLT-4 se mantuvieron en RPMI-1640 (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) enriquecido con 20 % de suero bovino fetal inactivado con calor (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), 1 % de penicilina/estreptomicina (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) y 2 mmol/L-glutamax (Life Technology; Carlsbad, CA). Las células 293T-cynoBCMA y 293T-ratBCMA se mantuvieron en DMEM con alto contenido de glucosa F-12- de Ham (50-50) (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) enriquecido con 10 % de suero bovino fetal termoinactivado (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), 1 % de penicilina/estreptomicina (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) y 2 mmol/L-glutamax (Life Technology; Carlsbad, CA).

Experimentos de fijación celular

[00240] Las variantes para las cuales se purificó suficiente proteína en cribado secundario se evaluaron en un ensayo de fijación celular de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células NCI-H929 y 293T-cynoBCMA que expresan BCMA y las células 293T que no expresan BCMA se usaron para cribar aglutinantes de FACS. Las células 293T se trataron con 1 µM de DAPT 24 horas antes de la fijación de células para

prevenir el desprendimiento de BCMA. Las diluciones de 6-12 puntos de variantes anti-BCMA desde las concentraciones de alrededor de 100-200 nM de anticuerpo se suministraron en cada cavidad con el uso de BioMekFX (Beckman Coulter). Las células se incubaron luego en hielo durante 1 h, se lavaron con amortiguador FACS y se incubaron durante 1 h en hielo con 50 ml de amortiguador FACS con 2,5 µg/ml de anti-IgG humana de cabra conjugada con Alexa647 suministrada mediante BioMekFX (Beckman Coulter). Las células se lavaron luego 2x con amortiguador FACS y se fijaron durante 10 minutos en 200 ml de PBS con 2 % de paraformaldehído (PFA) antes de la detección por fluorescencia. Las muestras se adquirieron usando FACS LSRII de Beckton Dickinson. La media geométrica de la intensidad de fluorescencia de la fijación del anticuerpo contra BCMA se analizó usando el *software* FlowJo® (Tree Star, Inc.).

Análisis de inactivación celular

[00241] La internalización de los anticuerpos se evaluó mediante fármacos conjugados en anticuerpos secundarios en un ensayo de inactivación celular en células que expresan BCMA. Las líneas celulares ARP-1 y U266B1 que expresan BCMA se usaron para cribar las guías de internalización. Las células se lavaron dos veces con calcio y solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) libre de magnesio, se recolectaron con Accutase® (Innovative Cell Technologies; San Diego, CA) y se contaron mediante analizadores de viabilidad celular Vi-CELL (Beckman Coulter, Brea, CA). Se sembraron un total de 12.500 células en un volumen de 25 microlitros en una placa de poliestireno blanca de fondo plano de 384 cavidades (Greiner Bio-One, Monroe, NC) en el día del ensayo. Los anticuerpos guía se formularon en 4x concentraciones iniciales en el medio de cultivo celular y se filtraron a través de placas de filtro de 96 cavidades MultiScreenHTS (Millipore; Billerica, MA). 12,5 µl del anticuerpo diluido en serie (dilución en serie de 1:3 desde 100 nM) se agregaron en las cavidades de tratamiento y 12,5 µl de un nanocuerpo anti-humano conjugado de acuerdo con el Conjugado P (hemiassterlina a través de un ligador escindible) o de acuerdo con el Conjugado M (maitansinoide a través de un ligador no escindible) se agregaron luego en cada cavidad en una concentración final fija de 20 nM. Las placas de ensayo se cultivaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ durante 72 h antes del ensayo. Para las mediciones de viabilidad celular, se agregaron 30 µl de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp. Madison, WI) en cada cavidad, y las placas se procesaron de acuerdo con las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron en % de viabilidad con el uso de

células sin tratar como controles. Los datos se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando un ajuste log(inhibidor) vs. una pendiente variable de respuesta, de 4 parámetros con GraphPad Prism (GraphPad v 5.0, Software; San Diego, CA). Los datos se expresaron como % de viabilidad celular relativa (contenido de ATP) frente a dosis de anticuerpos.

EJEMPLO 4

CARACTERÍSTICAS DE ANTICUERPOS ANTI-BCMA ILUSTRATIVOS

[00242] Las Tablas 7A y 7B muestran los resultados obtenidos con anticuerpos producidos por la expresión de ribosomas y fagos de guías iniciales y después de la maduración por afinidad.

Tabla 7A. Anticuerpos de la expresión de ribosomas y fagos.

ID de variante de Fab-HC	Fijación de células NCI-H929 (células BCMA+)		Fijación de células 293T-cynoBCMA		ARP-1, Inactivación celular de anticuerpo del conjugado M 2°		U266B1, Inactivación celular de anticuerpo del conjugado M 2°	
	B _{max} (MFI)	K _d (nM)	B _{max} (MFI)	K _d (nM)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
2265-F02	11728	5.2	23759	6.2	1.9	55	0.9	58

NK = sin activación

Tabla 7B. Anticuerpos de la expresión de ribosomas y fagos.

	Estabilidad térmica	Biacore, BCMA-Fc humano			Biacore, BCMA-Fc de <i>Macaca Fascicularis</i>		
ID de variante de Fab-HC	Fab TM2 (°C)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)
2265-F02	85.0	5.87E+05	2.93E-04	4.99E-10	3.15E+05	1.16E-03	3.68E-09

ND = no detectado

EJEMPLO 5

CONJUGACIÓN ANTICUERPO-FÁRMACO Y DETERMINACIÓN DE RELACIONES DAR

[00243] La conjugación de anticuerpo-fármaco se describe en Zimmerman ES, *et al.* 2014, *Bioconjugate Chem.*, 25 (2), pp 351-361. En síntesis, las variantes de anticuerpos anti-BCMA purificadas se conjugaron en un agente citotóxico. El fármaco de reserva se disolvió

en DMSO hasta una concentración final de 5 mM. El compuesto se diluyó con PBS hasta 1 mM y luego se agregó a la muestra de proteína purificada hasta una concentración de fármaco final de 100 μ M. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (20 °C) durante 17 horas. Los fármacos no incorporados se removieron haciendo pasar la muestra de reacción a través de resina 7000 MWCO en placas Zeba (Thermo Scientific) equilibradas en amortiguador de formulación. El filtrado se hizo pasar luego por una placa MUSTANG® Q (Pall Corp.) para remover la endotoxina.

[00244] Luego de la purificación, el anticuerpo purificado o las muestras de conjugados anticuerpo-fármaco se cuantificaron en un sistema Caliper GXII mediante la comparación con estándares de masa de corrida con HERCEPTIN® en el mismo Protein Express LabChip (Caliper Life Sciences # 760499). Las muestras se prepararon para análisis como se especifica en el kit de reactivos Protein Express (Caliper Life Sciences # 760328) con la excepción de que las muestras (mezcladas en amortiguador de muestras + 50mM de NEM) se calentaron a 65 °C durante 10 minutos antes del análisis en el sistema Caliper.

[00245] Los conjugados anticuerpo-fármaco se redujeron en 10 mM de TCEP (Pierce) durante 10 min a 37 °C. Se agregaron 30 μ l de TA30 (30 % de acetonitrilo, 70 % de 0,1 % de ácido trifluoroacético) a la muestra reducida. Se disolvieron 20 mg de super-DHB (Sigma, parte N.º 50862) en TA50 (50 % de acetonitrilo, 50 % de 0,1 % de ácido trifluoroacético) para generar una matriz de muestra. Luego se agregaron 0,5 μ l de muestra en TA30 a 0,8 μ l de matriz súper-DHB en TA50 y se depositaron en placa de muestras MALDI. Los espectros se adquirieron en un instrumento Bruker Autoflex Speed MALDI con los siguientes parámetros iniciales: Rango de masa 7000 – 70000Da, velocidad de muestra y parámetros de digitalizador de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, con atenuación en tiempo real ajustado en Alto y sin ajuste de compensación de valor inicial. Se encendió el alto voltaje, y la fuente iónica 1 se ajustó a 20 kV. Se extrajeron los iones de pulso a 200 ns, se suprimió la matriz en deflexión y se suprimió hasta 6000Da. El algoritmo de detección de pico era centroide con umbral de señal/ruido a 20, con ancho de pico a 150 m/z de altura a 80 % con sustracción de valor inicial TopHat. El algoritmo de atenuación es SavitzkyGolay con un ancho de 10 m/z y ciclos de 10. La relación fármaco-anticuerpo (DAR) para todas las muestras se determinó como un promedio en peso del área de espectro de masa deconvolucionada bajo la curva para cada conjugado.

EJEMPLO 6

ESTABILIDAD DE PLASMA IN VITRO

[00246] En este ejemplo, la estabilidad *in vitro* del Conjugado 4 se evaluó en el plasma de seres humanos, *Macaca fascicularis* y ratones. La estabilidad de la ojiva del ligador se midió mediante un ensayo a base de LC/MS que utiliza anticuerpo capturado por afinidad. Los ADC (50 µl a 100 µg /ml) se incubaron con muestras de PBS o plasma (litio-heparina) de seres humanos, *Macaca fascicularis* o ratones para distintas longitudes de tiempo (0, 2, 24, 72, 168, 336 y 504 h). Las muestras se tomaron en puntos temporales predeterminados y se agregaron a microesferas de Streptavidin Mag Sepharose (GE Healthcare, Catálogo # 28-9857-99,) que se recubrieron con anti-IgG humana de cabra Biotin- (Fab)2, anticuerpos (para PBS, muestras de plasma de *Macaca Fascicularis* y ratón) específicos de fragmento Fcγ (Jackson Immnoresearch, catálogo # 109-066-098) o ECD de BCMA humano biotinilado (para muestras de plasma humano) (10 ug/muestra). Las mezclas de microesferas/muestras de plasma se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con rotación suave. Las microesferas se lavaron luego tres veces en 1 ml de amortiguador HBS-E, y luego se lavaron dos veces con 1 ml de agua. La elución de ADC capturados se llevó a cabo con la adición de 25 µl de 1 % de solución de ácido fórmico a temperatura ambiente durante 5 min. El anticuerpo liberado se removió de las microesferas y se neutralizó con 15 µl de Tris-HCl 1M (pH 9,0).

[00247] Las DAR de los ADC desplegables se adquirieron en Agilent 6520A Accurate Mass Q-TOF MS conectado a un sistema HPLC de serie Agilent 1200 con una bomba Binary SL. Los rastros cromatográficos adicionales se adquirieron en Agilent DAD a 278 y 214 nm. La carga de método desplegable se optimizó para que el volumen total de muestra (40 µl) se inyecte en un cartucho Agilent Advance Bio Desalting HPLC (2,1×12,50 mm) a 80 °C y 0,4 ml/min. Se utilizaron fases móviles estándares para LC-MS: A: 0,1 % de ácido fórmico en agua; B: 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. Después de 1 min de tiempo de desalado a 10 % de B, la proteína se eluyó del cartucho de 1,5 – 4,5 min de 65 – 80 % de B. También se impidió la transferencia llevando a cabo una ejecución de limpieza entre cada inyección.

[00248] Se extrajeron todos los espectros y se combinaron a partir de un solo pico TIC usando MassHunter Qualitative (B.06.00) de Agilent. Los espectros se deconvolucionaron usando el algoritmo de entropía máxima en MassHunter Qualitative y su identidad se confirmó a partir de la masa neutral observada. La deconvolución se restringió a los iones que

se originaron del anticuerpo completamente ensamblado, se buscó un rango de masa de 140.000–160.000 Da con una etapa de masa de 1,0 Da.

[00249] Las áreas pico se asignaron en la calculadora DAR B.1.0 (Agilent Technologies). Cuando la selección del pico automático falló, los picos se definieron de forma manual. La tabla de pico resultante se exportó a una planilla de Excel, y los valores de DAR se volvieron a asignar como adecuados. Cuando se observó la degradación fármaco-ligador, solamente los fármacos restantes en las especies de producto se consideraron activos. Por ejemplo, un anticuerpo con un fármaco-ligador completo y solo un ligador (degradado de una especie de 2 fármacos) se consideró equivalente a una especie de un fármaco. El valor de DAR general se calculó como un promedio en peso de áreas pico deconvolucionadas. Los valores de DAR generales para las muestras replicadas se promediaron en conjunto.

[00250] Los resultados de estabilidad de plasma de ejemplo se proporcionan para el **Conjugado 4** en la Figura 11.

EJEMPLO 7

EVALUACIÓN DE RELACIÓN DE RESPUESTA DE DOSIS DE VARIANTES DE ADC DE BCMA EN TUMORES DE MIELOMA MÚLTIPLE ARP-1

[00251] Se llevó a cabo un estudio para comparar la eficacia del **Conjugado 4** (descrito en la Tabla 8) en tumores de mieloma múltiple ARP-1 subcutáneos.

Tabla 8. Lista de artículos de prueba

Conjugado	Descripción
4	El anticuerpo 2265-F02 se conjugó con una ojiva de maitansina no escindible (Conjugado M) en el sitio Y180/F404 (DAR4)

[00252] Los ADC anti-BCMA se generaron conjugando la carga útil del ligador con para-azido-metil-fenilalanina (pAMF) en el sitio F404 de los anticuerpos descritos en la presente. El **Conjugado 1**, un ADC sustituto para GSK2857916 (GSK, Trudel *et al.*, 2018, *Lancet Oncol.* 19:1641-1653; Trudel *et al.*, 2019, *Blood Cancer Journal* 9:37), se generó al conjugar una ojiva de ligador de autistatina F de monometilo maleimido-caproílo (mc-MMAF) en el anticuerpo anti-BCMA J6M0. El anticuerpo J6M0 se elaboró con una línea celular CHO, CHOEBNALT (Icosagen) y se purificó mediante ProA. La ojiva de ligador mc-MMAF se conjugó con J6M0 para producir el **Conjugado 1**. A diferencia de GSK2857916, el

Conjugado 1 no usa un anticuerpo afucosilado, que puede optimizar las interacciones de Fc-gammaRIII.

[00253] Los ratones hembra color beige de 9 semanas de vida, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) se anestesiaron con isoflurano y se implantaron de manera subcutánea en el flanco de la pata derecha con una mezcla 1:1 de 1×10^7 células ARP-1 MM humanas y matrigel. La aleatorización y el inicio del tratamiento se iniciaron cuando el tamaño promedio de tumor fue de aproximadamente 150 mm^3 (correspondientes a 15 días después del implante). Los grupos de tratamiento se detallaron en la Tabla 9. Todos los artículos de prueba se formularon en 10 mM de citrato pH 6,0, 10 % de sacarosa. El peso corporal y el tamaño del tumor se monitorearon 1 - 2 veces por semana. El criterio de valoración de estudio primario fue cuando la media del tamaño del tumor del grupo de control de vehículo fue de $> 1.500 \text{ mm}^3$.

Tabla 9. Lista de grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
1	PBS	-	single	IV	8
2	Conjugado 4	0.1	single	IV	8
3	Conjugado 4	0.5	single	IV	8
4	Conjugado 4	2	single	IV	8
5	Conjugado 4	8	single	IV	8
10	Conjugado 1	2	single	IV	8

[00254] El peso corporal y el tamaño del tumor se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró que una probabilidad de menos de 5 % ($p < 0,05$) era estadísticamente significativa.

[00255] En este estudio, los animales con tumores ARP-1 establecidos se trataron una vez con 4 niveles de dosis de **Conjugado 4** que varían de 0,1 a 8 mg/kg o 2 mg/kg de **Conjugado 1**. Todos los artículos de prueba fueron bien tolerados y ninguno exhibió toxicidad alguna en función de la pérdida de peso corporal de la Figura 2.

[00256] Los efectos del tratamiento en el crecimiento tumoral ARP-1 se ilustran en la Figura 3A y la Figura 3B y muestran una correlación positiva entre el aumento de actividad y dosis para ambos fármacos. Ambas variantes de ADC de BCMA tuvieron poca a ninguna actividad, similar al control de vehículo, en las dos dosis menores (0,1 y 0,5 mg), mientras

que se observó actividad moderada con 2 mg/kg (FIG. 3A). La mayor dosis de **Conjugado 4** a 8 mg/kg dio como resultado la estasis del tumor con la vuelta de crecimiento del tumor observadas aproximadamente 10 días después del tratamiento (Figura 3A).

[00257] Los resultados de este estudio muestran que la actividad del **Conjugado 4** no fue estadísticamente distinta en comparación con el **Conjugado 1** en este modelo.

EJEMPLO 8

EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE RESPUESTA DE DOSIS DE LOS CONJUGADOS 4 Y 5 DE VARIANTES DE ADC DE BCMA EN EL MODELO DE MIELOMA MÚLTIPLE MM.1S DISEMINADO

[00258] Se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia del **Conjugado 4** en el modelo MM.1S diseminado en ratones NSG.

[00259] Los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) hembra NOD gamma (NSG) de 8-9 semanas de vida fueron inoculados con 5×10^6 células MM.1S de mieloma múltiple en la vena de la cola. La aleatorización por peso corporal y el inicio del tratamiento se inició 7 días después de la inoculación tumoral. Los grupos de tratamiento se detallaron en la Tabla 10. Todos los artículos de prueba de investigación se formularon en 10 mM de citrato pH 6,0, 10 % de sacarosa. Los grupos 1-10 (n=6/grupo) se monitorearon para el criterio de valoración de supervivencia caracterizado por > 20 % de pérdida de peso corporal y signos clínicos que incluyen letargo, parálisis del miembro posterior o mortalidad. Los grupos 11-20 (n=3/grupo) se usaron para la recolección de la médula ósea y el análisis de la carga tumoral el día 28 después de la inoculación de células tumorales. Para todos los grupos, los pesos corporales se monitorearon 1 - 2 veces/semana.

Tabla 10. Lista de grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
1	PBS	-	única	IV	6
2	Conjugado 4	0.02	única	IV	6
3	Conjugado 4	0.1	única	IV	6
4	Conjugado 4	0.5	única	IV	6
5	Conjugado 4	2.5	única	IV	6
10	Conjugado 1	0.5	única	IV	6
11	PBS	-	única	IV	3
12	Conjugado 4	0.02	única	IV	3

13	Conjugado 4	0.1	única	IV	3
14	Conjugado 4	0.5	única	IV	3
15	Conjugado 4	2.5	única	IV	3
20	Conjugado 1	0.5	única	IV	3

[00260] La carga tumoral se evaluó y cuantificó mediante la detección de células hCD138 positivas (hCD138 +) en la médula ósea. Las células de la médula ósea del fémur y la tibia de ratón se agruparon y se evaluaron para determinar la expresión de CD138+ humana usando el clon MI15 de anti-CD138 humana de ratón Alexa Fluor 647 (BD Biosciences # 562097) de acuerdo con el protocolo del fabricante. CD138 es un antígeno de superficie específica para MM y las células plasmáticas en la médula ósea (Chilosi M et. Al. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc (1999): 12, 1101–1106). El análisis de citometría de flujo de inmunofluorescencia directa se llevó a cabo usando un citómetro de flujo LSRII y *software* FACS Diva. Los datos se analizaron usando Flowjo (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

[00261] La media de supervivencia, el retardo de supervivencia y la carga tumoral durante y en el criterio de valoración del estudio se analizaron usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró que una probabilidad de menos de 5 % ($p < 0,05$) era estadísticamente significativa.

[00262] En este estudio, los animales con tumores MM.1S establecidos se trataron una vez con 4 niveles de dosis de **Conjugado 4** que varían de 0,02 a 2,5 mg/kg o 0,5 mg/kg de **Conjugado 1** sustituto en el día 7 después de la inoculación.

[00263] La Figura 4 muestra que todos los grupos de tratamiento indujeron pérdidas de peso corporal mínimas (~5 % de pérdida de peso corporal) y fueron bien tolerados. La pérdida de peso corporal en animales con control de vehículo comenzó el día 30 después de una pérdida de peso corporal progresiva (hasta > 20 %) que coincide con el desarrollo de signos clínicos que incluyen parálisis del miembro posterior, piloerección y letargo. Las curvas de supervivencia se ilustran en la Figura 5. La media de supervivencia para el grupo del vehículo fue de 34,2 días. Se observó un incremento lineal en la media de supervivencia con dosis en aumento de **Conjugado 4**, que se inician aproximadamente el día 43 con 0,1 mg/kg y duran hasta aproximadamente 77 días con 2,5 mg/kg (Figura 5). Todas las dosis $\geq$ 0,1 mg/kg aumentaron significativamente la supervivencia en comparación con el control de vehículo (Figura 3).

[00264] Los resultados de este estudio mostraron que el **Conjugado 4** en el modelo MM.1S diseminado fue significativamente más eficaz que una dosis equivalente de **Conjugado 1** en la reducción de la carga tumoral y la prolongación de la supervivencia.

EJEMPLO 9

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL CONJUGADO 4 EN COMBINACIÓN CON SOC MM VELCADE/BORTEZOMIB O DARZALEX/DARATUMUMAB EN EL MODELO MM.1S DISEMINADO EN RATONES NSG

[00265] Se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia del **Conjugado 4** en combinación con los agentes de tratamiento de referencia (SOC) MM Velcade y Daratumumab en el modelo MM.1S diseminado en ratones NSG.

[00266] Los ratones hembra NOD gamma (NSG) de 9-12 semanas de vida, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), fueron inoculados con 5×10^6 células MM.1S de mieloma múltiple en la vena de la cola. La aleatorización por peso corporal y el tratamiento se iniciaron 7 días después de la inoculación tumoral. Los grupos de tratamiento se detallaron en la Tabla 11. Todos los artículos de prueba de investigación Sutro se formularon en 10 mM de citrato pH 6,0, 10 % de sacarosa. Daratumumab y Velcade de grado clínico (Pharmaceutical Buyers International) se formularon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los artículos de prueba se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV). Los pesos corporales se monitorearon 1 - 2 veces por semana. El criterio de valoración de estudio fue la supervivencia y se caracterizó por > 20 % de pérdida de peso corporal y signos clínicos que incluyen letargo, parálisis del miembro posterior o mortalidad.

Tabla 11. Lista de grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
1	Vehículo/PBS	NA	única	IV	5
2	Conjugado 4	0,25	única	IV	5
3	Daratumumab	3	única	IP	5
4	Daratumumab	10	única	IP	5
5	Velcade	0,8	q7dx2	IP	5
6	0,25 mg/kg de Conjugado 4 + 3 mg/kg de	Ver tratamientos de agente			5

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
	Daratumumab	único			
7	0,25 mg/kg de Conjugado 4 + 10 mg/kg de Daratumumab	Ver tratamientos de agente único			5
8	0,25 mg/kg de Conjugado 4 + 0,8 mg/kg de Velcade	Ver tratamientos de agente único			5
9	Conjugado 4	10	única	IV	5

[00267] La media de supervivencia (días) se analizó para comparar el efecto del tratamiento frente al vehículo o grupos de tratamiento relevantes entre sí usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con las pruebas de comparación múltiples de Dunnett y Sidak, respectivamente. Se consideró que una probabilidad de menos de 5 % ($p < 0,05$) era significativa.

[00268] En este estudio, los animales con tumores MM.1S establecidos se trataron el día 7 después de la inoculación con 0,25 mg/kg de **Conjugado 4** (dosis única), 3 mg/kg de Daratumumab (dosis única), 10 mg/kg de Daratumumab (dosis única), 0,8 mg/kg de Velcade (q7dx2) o una combinación de 0,25 mg/kg de **Conjugado 4** con cada dosis de Daratumumab o Velcade. Además, se administró una sola dosis alta de **Conjugado 4** de 10 mg/kg.

[00269] La Figura 6 muestra que todos los tratamientos indujeron inicialmente pérdidas de peso corporal mínimas (~5 % de pérdida de peso corporal) y fueron bien tolerados. Como se espera en este modelo, la pérdida de peso corporal en animales con control de vehículo comenzó aproximadamente el día 24, y a continuación se produjo una pérdida de peso corporal progresiva (hasta > 20 %) que coincidió con el desarrollo de signos clínicos que incluyen parálisis del miembro posterior, piloerección y letargo. La Figura 7A-7C muestra las curvas de supervivencia Kaplan-Meier en respuesta a 0,25 mg/kg de **Conjugado 4** y tratamientos SOC MM como agentes simples o combinaciones. La media de supervivencia para el grupo de vehículo fue de 30,6 días (Figura 7A-7C). El tratamiento de agente único con 0,25 mg/kg de **Conjugado 4** o 0,8 mg/kg de Velcade dio como resultado una media de supervivencia significativamente más extensa (50,2 y 40,6 días, respectivamente) en comparación con el control de vehículo (Figura 7A). Al parecer, la coadministración de **Conjugado 4** + Velcade tuvo un efecto aditivo en la media de supervivencia a los 61,2 días lo cual fue significativamente diferente en comparación con cualquier agente único. Mientras tanto, el agente único Daratumumab en 3 o 10 mg/kg no tuvo efecto significativo en la supervivencia en comparación con el control de vehículo (Figura 7A, Figura 7B y Figura 7C).

Sin embargo, el **Conjugado 4** + Daratumumab en cualquier dosis dio como resultado una media de supervivencia significativamente prolongada (71,6 y 75,6 días, respectivamente) en comparación con solo agentes únicos (Figuras 7B y 7C). La falta de eficacia del agente único Daratumumab sugiere un efecto sinérgico en combinación con el **Conjugado 4**.

[00270] La Figura 8A muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en respuesta a una dosis mayor del **Conjugado 4** en 10 mg/kg. La media de supervivencia de animales tratados con 10 mg/kg de **Conjugado 4** fue de 89,4 días, que se extendió significativamente en comparación con el control de vehículo o 0,25 mg/kg de **Conjugado 4** (Figura 8B).

[00271] Los resultados de este estudio mostraron que el **Conjugado 4** en combinación con Velcade o Daratumumab potenció significativamente la eficacia en comparación con **Conjugado 4** o solo los agentes únicos SOC MM. Cabe destacar que dado que los ratones NSG carecen de células NK, el beneficio de combinación observado con Daratumumab en este modelo se puede atribuir a sus funciones independientes de NK (Phipps C et al., 2015, Ther. Adv. Hem. 63:120-127). Además, el tratamiento con 10 mg/kg de **Conjugado 4** extendió notablemente la supervivencia en comparación con el vehículo o 0,25 mg/kg de **Conjugado 4**.

EJEMPLO 10

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE VARIANTES DE ADC DE BCMA CON DIFERENTES ANTICUERPOS ANTI-BCMA EN TUMORES ARP-1 SUBCUTÁNEOS

[00272] Este ejemplo evalúa la actividad de las variantes de ADC de BCMA en ARP-1 subcutáneo.

[00273] Los ratones SCID hembra color beige de 10 semanas de vida se anestesiaron con isoflurano y se implantaron de manera subcutánea en el flanco de la pata derecha con una mezcla 1:1 de 8×10^6 células ARP-1 MM humanas y matrigel. La aleatorización y el inicio del tratamiento (Día 0 después del tratamiento) se iniciaron cuando el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 150 mm^3 (14 días después del implante). Los artículos de prueba y los grupos de tratamiento se detallaron en la Tabla 12. Todos los artículos de prueba de investigación se formularon en 10 mM de citrato pH 6,0, 10 % de sacarosa. El peso corporal y el tamaño del tumor se monitorearon al menos 1 - 2 veces por semana. El criterio de valoración de estudio primario fue cuando la media del tamaño del tumor del grupo de control de vehículo fue de $> 1.200 \text{ mm}^3$.

Tabla 12. Lista de grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
1	PBS	-	única	IV	8
2	Conjugado 4	3	única	IV	8

[00274] El tamaño del tumor se analizó con el uso de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró que una probabilidad de menos de 5 % ($p < 0,05$) era estadísticamente significativa.

[00275] En este estudio, los animales con tumores ARP-1 establecidos se trataron una vez con 3 mg/kg de variantes de ADC de BCMA con distintos anticuerpos anti-BCMA y Conjugado 1. Todos los artículos de prueba fueron bien tolerados y no mostraron toxicidad sustancial definida como >20 % de disminución en peso corporal.

[00276] Los análisis estadísticos del tamaño del tumor el día 14 (cuando la media de los tumores de control de vehículo era de $> 1.200 \text{ mm}^3$) mostraron que todos los grupos de tratamiento fueron significativamente eficaces en comparación con el control. Los **Conjugados 4** (~70 % de TGI, $p < 0,001$) fueron eficaces en función de los valores p. El monitoreo continuo mostró que los **Conjugados 4** fueron potentes. El **Conjugado 1** fue el más potente en la inducción de la regresión tumoral y la estasis hasta ~ día 17.

EJEMPLO 11

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS TUMORES DE MIELOMA MÚLTIPLE ARP-1 SUBCUTÁNEA EN DOSIS MAYORES DE CONJUGADO 4

[00277] Se llevó a cabo un estudio para evaluar la respuesta de los tumores de mieloma múltiple ARP-1 subcutánea en dosis mayores de **Conjugado 4**.

[00278] Los ratones hembra color beige de 9 semanas de vida, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) se anestesiaron con isoflurano y se implantaron de manera subcutánea en el flanco de la pata derecha con una mezcla 1:1 de 1×10^7 células ARP-1 MM humanas y matrigel. La aleatorización y el inicio del tratamiento (Día 0 después del tratamiento) se iniciaron cuando el tamaño promedio del tumor fue de aproximadamente 150 mm^3 (14 días después del implante). Los grupos de tratamiento se detallaron en la Tabla 13. Todos los artículos de prueba de investigación Sutro se formularon en 10 mM de citrato pH

6,0, 10 % de sacarosa. El peso corporal y el tamaño del tumor se monitorearon 1 - 2 veces por semana. El criterio de valoración de estudio primario fue cuando la media del tamaño del tumor del grupo de control de vehículo fue de $> 1.500 \text{ mm}^3$.

Tabla 13. Lista de grupos de tratamiento

Grupo		Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de dosis	Vía	N
1		Vehículo	-	única	IV	8
2		Conjugado 4	5	única	IV	8
3		Conjugado 4	10	única	IV	8
4		Conjugado 4	15	única	IV	8
5		Conjugado 4	20	única	IV	8
6		Conjugado 1	5	única	IV	8

[00279] El peso corporal y el tamaño del tumor se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró que una probabilidad de menos de 5 % ($p < 0,05$) era estadísticamente significativa.

[00280] En este estudio, los animales con tumores ARP-1 establecidos se trataron una vez con 4 niveles de dosis de **Conjugado 4** que varían de 5 a 20 mg/kg o 5 mg/kg de Conjugado 1. Todos los artículos de prueba fueron bien tolerados y ninguno exhibió toxicidad alguna en función de la pérdida de peso corporal (Figura 9). Sin embargo, a medida que avanzaba el estudio, se observó un aumento en el peso corporal en todos los grupos de tratamiento restantes, en donde la mayor parte de cambio de peso corporal fue en animales tratados con 5 mg/kg de **Conjugado 1**. El aumento continuo de peso corporal, así como el abdomen distendido observado en algunos animales, sugirieron la formación de tumores ARP-1 internos normalmente observados en este modelo. Por este motivo, el estudio finalizó el día 52.

[00281] Los efectos del tratamiento con **Conjugado 4** y **Conjugado 1** de ADC de BCMA en el crecimiento tumoral de ARP-1 se ilustran en la Figura 10A y 10B. Se observó el incremento de potencia en las dosis de **Conjugado 4** en aumento que indicó una relación de dosis-respuesta lineal (Figura 10A). El análisis del tamaño de tumor el día 11, cuando la media del tamaño de tumor del grupo de vehículo alcanzó el criterio de valoración de estudio ($> 1.500 \text{ mm}^3$), mostró que el **Conjugado 4** exhibió una eficacia significativa en comparación con el control de vehículo que inicia en 10 mg/kg (Figura 10B). Las dosis de $\geq$

10 mg/kg del **Conjugado 4** y 5 mg/kg del **Conjugado 1** indujeron la regresión tumoral. Se observó la vuelta de crecimiento del tumor en 4 de 8 animales desde aproximadamente el día 11 para los 10 mg/kg del grupo de **Conjugado 4**, mientras que la supresión de crecimiento se mantuvo hasta el día 52 para dosis mayores de **Conjugado 4** o 5 mg/kg de **Conjugado 1** (Figura 10A y la Figura 10B).

[00282] Los resultados de este estudio mostraron que el **Conjugado 4** en las dosis de > 15 mg/kg indujo regresión tumoral y supresión de crecimiento prolongado durante > 50 días después del tratamiento.

EJEMPLO 12

ANÁLISIS DE REACTIVIDAD CRUZADA DEL RECEPTOR

[00283] El presente ejemplo evalúa la potencial fijación de reacción cruzada de **Conjugado 4** y el reconocimiento de los receptores de BCMA humana, BAFF-R y TACI en células 293T estables modificadas por ingeniería genética. Los resultados demostraron que el **Conjugado 4** se fijan específicamente a BMCA, pero no a BAFF-R o TACI en líneas celulares 293T modificadas por ingeniería genética. El control fue el **Conjugado 1**.

[00284] BCMA, receptor del factor de activación de las células B (BAFF-R, también denominado TNFRSF13C) y el activador transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando de ciclofilina (TACI, también denominado TNFRSF13B) son receptores transmembrana de tipo III relacionados con homología con perfiles de expresión diferencial y afinidades para TNF (factor de necrosis tumoral) ligandos, factor de activación de las células B (BAFF, también denominado BLyS) y un ligando que induce a la proliferación (APRIL) para promover la supervivencia de la célula B y maduración (Hengeveld y Kerstan, 2015, Blood Cancer Journal 2015 Feb 27; 5:e282).

[00285] Se compraron las células 293T de ATCC (American Type Culture Collection) y se transfectaron con plásmidos que codifican BCMA humano, BAFF-R y TACI usando el reactivo Lipofectamine LTX con reactivo PLUS (ThermoFisher Scientific). La expresión de BCMA humano, BAFF-R y TACI en las líneas celulares estables se confirmó con anticuerpos comerciales de BioLegend, anti-BCMA (clon 19F2), BAFF-R (clon 11C1) y TACI (clon 1A1).

[00286] Las células 293T modificadas por ingeniería genética que expresaban de manera estable BCMA humano se trataron con 1 μ M de DAPT, un inhibidor de γ -secretasa (Santa Cruz Biotechnology), durante la noche antes de los estudios de fijación celular para mantener

un alto nivel de expresión de BCMA. Las células 293T parentales y modificadas por ingeniería genética que expresaron de manera estable BCMA, BAFF-R y TACI se recolectaron, se lavaron y se volvieron a suspender en amortiguador FACS (amortiguador DPBS con 1 % de albúmina de suero bovino y 0,05 % v/v de azida de sodio). Las células se colocaron en placas de 96 cavidades (100K por cavidad) y se incubaron con anticuerpos. Los ADC de BcMA anti-humano en 67nM se incubaron durante 1 hora en hielo. Se detectó fijación de ADC con Ab anti-Fc humana conjugada con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 hora en hielo. Se analizaron las células usando un sistema BD FACS Canto. Los datos de FACS se analizaron usando el *software* Flowjo para generar histogramas de fijación celular.

[00287] Ambos ADC de referencia sustitutos de **Conjugado 4** y **Conjugado 1**, se evaluaron en una concentración de saturación (67nM), mostraron fijación específica en células 293T que expresaron BCMA humano, pero no BAFF-R y TACI (Figura 12). Estos resultados indicaron que el **Conjugado 4** se fijó específicamente a BCMA, pero no a BAFF-R y TACI.

EJEMPLO 13

CITOTOXICIDAD IN VITRO DE ADC FRENTE A CATABOLITOS DE FÁRMACO

[00288] El presente ejemplo compara la actividad relativa de inactivación celular of **Conjugado 4** y **Conjugado 1** (maleimidocaproil monometilauristatín F) y sus respectivos catabolitos libres de fármacos contra un panel de diferentes líneas celulares de mieloma múltiple.

[00289] Los efectos citotóxicos de ADC y sus catabolitos libres de fármacos respectivos se evaluaron en un ensayo de proliferación de células tumorales en dos experimentos separados. Se agregaron 20.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades de área media de fondo plano y ADC o catabolito libre de fármacos a células en medios de cultivo celular (n = 3 replicados para cada experimento) partiendo de 12,5 nM a 0,049 nM (diluciones en 2 veces) y de 2 µM a 0,03 nM para catabolitos libres de fármacos (diluciones en 4 veces). Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ durante 3 días. Para la medición de la viabilidad celular, se agregó reactivo Cell Titer-Glo[®] (Promega Corp, Madison, WI) y se procesaron las placas y se leyeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION[®] (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron en % de viabilidad con el uso de

células sin tratar como controles. Los datos se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando un log(inhibidor) frente a una respuesta, pendiente variable, ecuación ajustada con 4 parámetros usando el *software* estadístico GraphPad Prism. Los datos se expresaron como % de viabilidad en relación con células de control sin tratar frente a dosis de ADC en nM en donde las barras de error indican la desviación estándar (SD) de los triplicados.

[00290] En dos experimentos independientes, el **Conjugado 4** (Tabla 14) muestra una actividad potente similar contra tres líneas celulares MM que expresan BCMA (NCI-H929, OPM2 y U266B1) (Tabla 14) en donde los valores de EC₅₀ varían de 0,8 a 1,8 nM. En comparación, el **Conjugado 1**, el ADC de referencia sustituto J6M0-mcMMAF (Tabla 14), muestra una potencia de inactivación celular apenas superior en función de los valores de EC₅₀ (0,2 a 0,9 nM), pero con % similar de alcance de inactivación celular como **Conjugado 4**. Ambos ADC no muestran actividad contra la línea celular K562 negativa para BCMA.

[00291] Los catabolitos activos de **Conjugado 4** como compuestos libres de fármacos, **4-1** y **4-2** (Tabla 14), mostraron una actividad mucho más débil que el **Conjugado 4** contra las tres líneas celulares MM que expresan BCMA, que incluyen la línea celular K562 que expresa BCMA. Además, el catabolito activo del **Conjugado 1** como un compuesto libre de fármacos, **1-1** (Tabla 14), también mostró una actividad de inactivación celular más débil en comparación con el **Conjugado 4** en las cuatro líneas celulares.

[00292] Los datos de estos experimentos indican que el **Conjugado 4** de ADC anti-BCMA es más potente que el catabolito liberado, lo cual sugiere que la citotoxicidad del **Conjugado 4** se debe principalmente al direccionamiento de BCMA y la internalización en células MM.

Tabla 14: Inactivación celular *in vitro*: ADC y catabolitos

Experimento 1								
ADC/ catabolito	NCI-H929		U266B1		OPM2		K562	
	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
Conjugado 4	0.8	85	0.8	80	1.7	91	NK	NK
Catabolito 4-1	135	86	61	84	183	97	NC	NC
Catabolito 4-2	73	90	59	85	165	97	NC	NC
Conjugado 1	0.2	85	0.2	85	0.8	95	NK	NK

Catabolito 1-1	398*	100*	106	94	480*	100*	NC	NC
Experimento 2								
ADC/ Catabolito	NCI-H929		U266B1		OPM2		K562	
	EC₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC₅₀ (nM)	Alcance (%)
Conjugado 4	0.8	85	0.9	81	1.8	90	NK	NK
Catabolito 4-1	86	83	39	82	161	97	NC	NC
Catabolito 4-2	70	92	54	85	159	96	NC	NC
Conjugado 1	0.2	86	0.3	84	0.9	94	NK	NK
Catabolito 1-1	393*	94*	110	89	514*	100*	NC	NC

* : Valor estimado

NC: No calculable debido a la curva de dilución incompleta

NK: No se observa inactivación

ADC: Conjugado anticuerpo-fármaco

EJEMPLO 14

COMPARACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE FRENTE AL CONTROL DE GFP

[00293] El presente ejemplo evalúa la actividad de inactivación celular de **Conjugado 4** en comparación con el conjugado de control negativo para anti-GFP de **Conjugado 20** respectivo en DAR4 en tres líneas celulares MM que expresan BCMA (NCI-H929, U266B1 y OPM-2) y una línea celular que expresa BCMA (K562).

[00294] Como ADC de control negativo para este experimento, se generó IgG anti-GFP como un anticuerpo producido por (CF) libre de células. El anticuerpo se conjugó en el mismo ligador de fármaco, ver **Conjugado M**, en los mismos sitios Y180 y F404 en la cadena pesada de anti-GFP para obtener el **Conjugado 20**.

[00295] Los efectos citotóxicos de **Conjugado 4** y el ADC de control negativo para anti-GFP respectivo, **Conjugado 20**, se evaluaron en un ensayo de proliferación de células tumorales en dos experimentos separados. En ambos experimentos, el **Conjugado 4** mostró actividad de inactivación celular potente en las tres líneas celulares MM que expresan BCMA (NCI-H929, OPM-2 y U266B1) en donde los valores de EC₅₀ variaron de 0,7 a 2,0 nM (Tabla 15). No se observó inactivación celular para el **Conjugado 4** en la línea celular K562 negativa para BCMA. En comparación, el ADC de control negativo para **Conjugado 20** de

anti-GFP no mostró actividad alguna de inactivación celular contra cualquiera de las cuatro líneas celulares evaluadas. Los datos de estos experimentos sugieren que el efecto de inactivación celular *in vitro* del **Conjugado 4** está mediado a través de la internalización mediada por direccionamiento de BCMA del ADC en líneas celulares MM que expresan BCMA.

Tabla 15: Síntesis de EC₅₀ de inactivación celular y alcance contra diferentes líneas celulares

Experimento 1								
Conjugado No.	NCI-H929		OPM2		U266B1		K562	
	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
4	0.7	89	1.7	87	0.7	78	NK	NK
Experimento 2								
Conjugado No.	NCI-H929		OPM2		U266B1		K562	
	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
4	0.8	89	2	88	0.8	79	NK	NK

NK=Sin activación

EJEMPLO 15

ESPECIFICIDAD DE LA ACTIVIDAD DE INACTIVACIÓN CELULAR DEL CONJUGADO

[00296] El ejemplo evalúa la actividad de inactivación celular específica del **Conjugado 4** para células de mieloma múltiple que expresan BCMA.

[00297] Los efectos citotóxicos de los ADC (**Conjugado 4**, **Conjugado 1**) en ausencia o presencia de exceso de anticuerpo anti-BCMA no conjugado, 2265-F02, y proteína de dominio extracelular (ECD) BCMA humano recombinante (catálogo 310-16, PeproTech, NJ, EE. UU.) se evaluaron en un ensayo de proliferación de células tumorales. Se colocaron 20.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades de área media de fondo plano. Se incubó previamente proteína de ECD BCMA humano recombinante a una concentración de 2 µM (exceso de 100 veces la concentración más alta de ADC) con los ADC durante 1 hora a temperatura ambiente antes de agregar células para bloquear los sitios de fijación a BCMA en los ADC. El anticuerpo anti-BCMA no conjugado, 2265-F02, Se agregó a células en una concentración de 500 nM (exceso de 25 veces la concentración más alta de ADC) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se agregaron diluciones en serie 2 veces de los ADC en la cavidad con la concentración inicial de 20 nM y la concentración final de 0,078

nM. Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ durante 3 días. Para la medición de la viabilidad celular, se agregó reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp, Madison, WI) y se procesaron las placas y se leyeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron en % de viabilidad con el uso de células sin tratar como controles. Los datos (la media de los duplicados) se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando un log(inhibidor) frente a una respuesta, pendiente variable, ecuación ajustada con 4 parámetros usando el *software* estadístico GraphPad Prism. Los datos se representaron como % de la viabilidad celular en relación con la cavidad de control sin tratar frente a dosis de ADC en nanomolar (nM) en donde las barras de error indican la desviación estándar (SD) de los duplicados.

[00298] Los ADC de referencia sustitutos **Conjugado 4** y **Conjugado 1** (Tabla 16) mostraron actividad de inactivación celular potente en las cuatro líneas celulares MM que expresan BCMA (Tabla 16) con valores de EC₅₀ que variaban de 0,4 a 3,3 nM (Tabla 16). No se observó inactivación celular para el **Conjugado 4** o **Conjugado 1** en presencia of exceso de Ab anti-BCMA no conjugado, 2265-F02, o proteína de ECD BCMA humano recombinante entre las cuatro líneas celulares que expresan BCMA. Los datos de este experimento indican que el efecto de inactivación celular *in vitro* del **Conjugado 4** es específico para BCMA.

Tabla 16: Síntesis de EC₅₀ de inactivación celular y alcance contra diferentes líneas celulares

Conjugado No.	Reactivo de competencia	NCI-H929		OPM2		U266B1		ARP-1	
		EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
4	ninguno	0.9	85	3.3	85	0.9	84	0.7	95
	2µM de BCMA ECD	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
	0.5µM 2265-F02	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
1	ninguno	0.4	86	2.3	92	0.4	90	0.6	97
	2µM de dBCMA ECD	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK

NK=sin activación

EJEMPLO 16

FIJACIÓN CELULAR E INACTIVACIÓN CELULAR *IN VITRO*: LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE

[00299] Este ejemplo compara la potencia de fijación celular e inactivación celular *in vitro* del **Conjugado 4** frente al **Conjugado 1** (maleimidocaproil monometilauristatín F) ADC de referencia sustituto en un panel grande de líneas celulares de mieloma múltiple (MM) que expresan BCMA. En este experimento, el **Conjugado 4** mostró mejor fijación celular y similar potencia de inactivación celular en comparación con el ADC de referencia sustituto.

[00300] Se compraron células NCI-H929, U266B1, RPMI-8226, MM.1S, MC/CAR y K-562 de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.). Se compraron células OPM-2 de The Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Alemania). Las células ARP-1 se licenciaron del laboratorio del Dr. Jonathan J. Keats del Translational Genomics Research Institute (Phoenix, Arizona, EE. UU.). Todas las líneas celulares se mantuvieron en medios RPMI de glucosa de alta (Corning, Corning, NY) enriquecidos con 20 % de suero bovino fetal inactivado con calor (Thermo Scientific, Grand Island, NY), 2 mM de glutamax (Thermo Scientific, Grand Island, NY), y 1x penicilina/estreptomicina (Corning, Corning, NY).

[00301] Se recolectaron células tumorales, se lavaron y se volvieron a suspender en amortiguador FACS (amortiguador DPBS con 1 % de albúmina de suero bovino y 0,05 % v/v de azida de sodio). Se colocaron en placas las células MM incubadas previamente con 2,5 µg de Human Fc Block (BD Biosciences, cat 564220) durante 10 minutos a temperatura ambiente en placas de 96 cavidades (100-200 K por cavidad) y se incubaron con anticuerpos (titulados de 66,7 nM con 3 diluciones en serie) durante 1 hora en hielo. Se detectó fijación del anticuerpo con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 hora en hielo. Se analizaron las células usando un sistema BD FACS Canto. Los datos de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) se analizaron usando *software* Flowjo para calcular la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) (n=3 réplicas) y se generaron datos (media de MFI +/- error estándar de la media [SEM] frente a nM del anticuerpo) usando el *software* GraphPad Prism.

[00302] Los efectos citotóxicos del **Conjugado 4**, 2265-F02 (como la versión del anticuerpo no conjugado negativa del **Conjugado 4**) y el **Conjugado 1** ADC de referencia sustituto se evaluó en un ensayo de proliferación de células tumorales.

[00303] El **Conjugado 4** y su versión de anticuerpo no conjugado, 2265-F02, mostraron afinidad de fijación similarmente alta en 6 líneas celulares MM (NCI-H929, ARP-1, OPM-2, U266B1, MM.1S y RPMI-8226) con K_D en el rango de 0,9 a 3,9 nM. En comparación, el ADC de referencia sustituto de mMMAF **Conjugado 1** mostró fijación más débil. Las curvas de fijación para 2265-F02 no estaban saturadas en 66.7nM. Los 3 anticuerpos evaluados no mostraron fijación significativa en células MC/CAR de mieloma negativas para BCMA (Tabla 17). Los resultados indican que la conjugación fármaco-ligador en los sitios F404/Y180 no afecta la fijación del anticuerpo anti-BCMA y el ADC **Conjugado 4** tiene afinidad de fijación alta para líneas celulares MM que expresan BCMA.

[00304] El **Conjugado 4** y el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** mostraron una actividad de inactivación celular de potencia similar en 5 de las 6 líneas celulares MM que expresan BCMA. EC_{50} de la potencia de inactivación celular varió de 0,70 a 2.1 para el ADC **Conjugado 4** y 0,29 a 1.4 nM para el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1**, respectivamente (Tabla 18). Se observó baja actividad de inactivación celular para ambos ADC en la línea celular MM RPMI-8226 con expresión baja de BCMA. Los resultados indican que el **Conjugado 4** tiene potencial de inactivación celular potente contra múltiples líneas celulares MM.

[00305] El **Conjugado 4** se fija a líneas celulares MM que expresan BCMA con alta afinidad y muestra actividad de inactivación celular potente, similar al ADC de referencia sustituto **Conjugado 1**, en 5 de las 6 líneas celulares MM que expresan BCMA.

Tabla 17: Síntesis de fijación de K_D y B_{max} en distintas líneas celulares MM

Línea celular	BCMA Copia#/Célula	2265-F02		Conjugado 4		Conjugado 1	
		K_D (nM)	B_{max}	K_D (nM)	B_{max}	K_D (nM)	B_{max}
NCI-H929	171,234	0.9	450	2.4	469	NC	NC
ARP-1	47,937	1	112	1.2	115	2.4	45
OPM-2	47,221	1.3	389	2.3	381	NC	NC
U266B1	29,649	1.4	151	3.9	133	NC	NC
MM.1S	21,447	0.9	162	1.6	141	NC	NC
RPMI-8226	20,640	1.3	193	1.8	249	NC	NC
MC/CAR	<LOD	NSB	NSB	NSB	NSB	NSB	NSB

<LOD = Por debajo del límite de detección

NC = Fijación observada, pero K_D y B_{max} no se pueden calcular debido a la curva de dilución incompleta

NSB = Sin fijación significativa

Tabla 18: Síntesis de EC₅₀ y alcance de inactivación celular en diferentes líneas celulares de MM

Línea celular	BCMA Copia#/Célula	2265-F02		Conjugado 4		Conjugado 1	
		EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)	EC ₅₀ (nM)	Alcance (%)
NCI-H929	171,234	NK	NK	0.8	89	0.29	91
ARP-1	47,937	NK	NK	0.7	95	0.52	95
OPM-2	47,221	NK	NK	2.1	88	1.4	93
U266B1	29,649	NK	NK	0.86	84	0.32	90
MM.1S	21,447	NK	NK	0.82	77	0.68	86
RPMI-8226	20,640	NK	NK	NC	15	NC	40
MC/CAR	<LOD	NK	NK	NK	NK	NK	NK
K-562	<LOD	NK	NK	NK	NK	NK	NK

<LOD = Por debajo del límite de detección

NC = Inactivación celular observada, pero EC₅₀ y el alcance no se pueden calcular debido a la curva de dilución incompleta

NK = sin inactivación

EJEMPLO 17

FIJACIÓN CELULAR E INACTIVACIÓN CELULAR *IN VITRO*:

REACTIVIDAD CRUZADA DE ESPECIES

[00306] Este ejemplo compara la potencia de fijación celular e inactivación celular *in vitro* del **Conjugado 4** frente al ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** (maleimidocaproyl monometilauristatín F) en células 293T estables que sobreexpresan BCMA humano, de primate *Macaca fascicularis*, de rata o de ratón.

[00307] Las células 293T se compraron de ATCC (American Type Culture Collection) y se transfectaron con plásmidos que codifican BCMA humano, de primate *Macaca fascicularis* o rata usando el reactivo Lipofectamine LTX con reactivo PLUS (ThermoFisher Scientific). Se generaron células 293T de BCMA de ratón transfectando células HEK293T con plásmidos que codifican BCMA de ratón (Invivogen) usando reactivo FUGENE HD (Promega).

[00308] Las células 293T modificadas por ingeniería genética que expresaban de manera estable BCMA humano, de primate *Macaca fascicularis* o rata se trataron con 1 µM de DAPT, un inhibidor de γ-secretasa (Santa Cruz Biotechnology), durante la noche antes de los estudios de fijación celular para mantener un alto nivel de expresión de BCMA. Se recolectaron las células, se lavaron y se volvieron a suspender en amortiguador FACS (amortiguador DPBS con 1 % de albúmina de suero bovino y 0,05 % v/v de azida de sodio).

Las células se colocaron en placas de 96 cavidades (100 K por cavidad) y se incubaron con anticuerpos (titulados de 200 nM con 2 diluciones en serie) durante 1 hora en hielo. Se detectó fijación del anticuerpo con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 hora en hielo. Se analizaron las células usando un sistema BD FACS Canto.

[00309] Se recolectaron células 293T de BCMA de ratón, se lavaron y se suspendieron en amortiguador FACS (amortiguador DPBS con 1 % de albúmina de suero bovino y 0,05 % v/v de azida de sodio). Las células se colocaron en placas de 96 cavidades (100 k por cavidad) y se incubaron con anticuerpos (diluciones en serie semilogarítmicas tituladas de 200nM) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron, luego se detectó fijación del anticuerpo con anticuerpo secundario anti-Fc humana conjugado con ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 hora en hielo. Se analizaron las células usando un sistema de citometría de flujo BD LSR-Fortessa X-20. Los datos de FACS se analizaron usando *software* Flowjo para calcular la geométrica de la intensidad de fluorescencia (gMFI) (n=3 réplicas) y datos (media geo. MFI +/- SEM frente a log nM de anticuerpo) se generaron usando *software* GraphPad Prism.

[00310] Los efectos citotóxicos de ADC SP8919 y el ADC de referencia sustituto J6M0-mcMMAF se evaluaron en un ensayo de proliferación de células tumorales. Se colocaron 500 células por cavidad en placas de 96 cavidades de área media de fondo plano durante la noche y se agregaron ADC a las células el día siguiente en medios de cultivo celular (n = 3 réplicas) comenzando a 20 nM (2 diluciones). Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ durante 5 días. Para la medición de la viabilidad celular, se agregó reactivo Cell Titer-Glo[®] (Promega Corp, Madison, WI) y se procesaron las placas y se leyeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION[®] (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron en % de viabilidad con el uso de células sin tratar como controles. Los datos se ajustaron con análisis de regresión no lineal, usando un log(inhibidor) frente a una respuesta, pendiente variable, ecuación ajustada con 4 parámetros usando el *software* estadístico GraphPad Prism. Los datos se expresaron como % de viabilidad celular relativa frente a dosis de ADC (media +/- SEM).

[00311] El **Conjugado 4** y su versión de anticuerpo no conjugado, 2265-F02 Y180/F404, mostraron afinidad de fijación similarmente alta en células 293T que sobreexpresan células 293T humanas y de *Macaca fascicularis*, pero no parentales o células transfectadas de

manera estable para expresar BCMA de rata o BCMA de ratón. La fijación K_d a células 293T que expresan BCMA humano y de *Macaca fascicularis* varió de 1,4 a 2,8 nM (Tabla 19). En comparación, el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** mostró actividad de fijación más débil con valores de K_d que variaban de 7,1 a 8,6 nM (Tabla 19). Los resultados indican que la conjugación de ligador y carga útil en los sitios F404/Y180 no afecta la fijación del **Conjugado 4** anti-BCMA en comparación con el anticuerpo de control no conjugado y que el **Conjugado 4** se fija a BCMA humano y de primate *Macaca fascicularis*, pero no a BCMA de rata o ratón.

[00312] En función de los resultados de fijación celular de reacción cruzada de las especies positivos, la actividad de inactivación celular del **Conjugado 4** y el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** se comparó en células 293T que expresan BCMA humano o de primate *Macaca fascicularis*. Tanto el **Conjugado 4** como el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** mostraron actividad de inactivación celular similar en células 293T que expresan BCMA humano o de primate *Macaca fascicularis* transfectadas de manera estable, pero no en células 293T parentales. Los resultados indican que el **Conjugado 4** tiene reactividad a la fijación de BMCA de primate *Macaca fascicularis* similar al ADC de referencia sustituto **Conjugado 1**, lo que se confirmó mediante el ensayo de inactivación celular.

[00313] En general, los resultados de este experimento indicaron que el **Conjugado 1** y **Conjugado 4** mostraron reconocimiento de fijación celular específica y sensibilidad de inactivación celular contra células 293T que sobreexpresan BCMA humano o de primate *Macaca fascicularis*, pero no se fijaron a BCMA de rata o ratón. Este sugiere que, de manera similar al **Conjugado 1**, el ADC de referencia sustituto **Conjugado 4** se puede evaluar para evaluación de toxicidad en primates *Macaca fascicularis*.

Tabla 19: Síntesis de fijación de K_d y $B_{máx}$ en células 293T que expresan de manera estable BCMA humano, de *Macaca Fascicularis*, rata o ratón

Línea celular	2265-F02 Y180/F404 (unconjugated Ab)		Conjugado 4		Conjugado 1	
	Kd (nM)	B _{máx}	Kd (nM)	B _{máx}	Kd (nM)	B _{máx}
293T	NB	NB	NB	NB	NB	NB
293T-hBCMA	2.1	1186	1.4	994	7.1	856
293T-cBCMA	2.8	1104	2.7	913	8.6	981
293T-rBCMA	NB	NB	NB	NB	NB	NB
293T-mBCMA	NB	NB	NB	NB	NB	NB

hBCMA: BCMA humano, cBCMA: BCMA de *Macaca Fascicularis*, rBCMA: BCMA de rata, mBCMA: BCMA de ratón, NB: Sin fijación

EJEMPLO 18

BLOQUEO DE ADC DE FIJACIÓN DE BCMA A LIGANDOS BAFF Y APRIL

[00314] Este ejemplo compara el ADC **Conjugado 4** y el ADC de referencia sustituto **Conjugado 1** en el bloqueo del receptor de BCMA que se fija a ligandos BAFF (factor activador de linfocitos B) y APRIL (un ligando inductor de la proliferación).

[00315] BCMA se fija a ligandos, BAFF y APRIL, para mediar la supervivencia de plasmablastos y células plasmáticas de la médula ósea, así como crecimiento y supervivencia de células MM. Tai *et al.*, 2014, Blood 123(20):3128-38. Se informó que el anticuerpo J6M0 bloquea la fijación a BAFF y APRIL como un mecanismo de acción terapéutico adicional, además de ser un ADC para actuar sobre células MM que expresan BCMA. Tai *et al.*, *supra*.

[00316] La proteína de ECD BCMA humano recombinante (Acro Biosystems) se recubrió a 0,5 µg/ml en amortiguador de carbonato/bicarbonato de pH 9,6 (Sigma-Aldrich) durante la noche a 4 °C en placas de 96 cavidades Nunc MaxiSorp. Todas las siguientes etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con amortiguador PBST (DPBS + 0,05 % de Tween-20) y se bloquearon con amortiguador de bloqueo de ELISA (DPBS + 1 % de BSA) durante 1 hora. Los anticuerpos y ligandos se diluyeron en amortiguador diluyente de ELISA (DPBS + 0,5 % de BSA + 0,05 % de Tween-20) y se mezclaron en una relación de volumen de 1:1 empezando a una concentración final de 200 nM con dos diluciones en serie para probar los anticuerpos con ligandos recombinantes, BAFF o APRIL, a concentraciones finales de 1 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. Ligandos y anticuerpos mezclados se agregaron a placas recubiertas con BCMA humano para fijación durante 2 horas. Las placas se lavaron y se diluyó anticuerpo HRP conjugado con estreptavidina (Jackson ImmunoResearch) 1000 veces en amortiguador diluyente de ELISA y se agregó a placas durante 1 hora en la oscuridad. Las placas se lavaron y se agregó sustrato de TMB (SureBlue Reserve, KPL) durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción de sustrato se inactivó con un volumen igual de ácido fosfórico 1 M y las placas se leyeron a 450 nm en el lector de placas M5 SpectraMax (Molecular Devices). Los valores de OD se graficaron, y se usó el *software* GraphPad Prism para crear un sitio de fijación específica con curvas de pendiente Hill (log transform) para determinar valores de IC₅₀ (media ± SEM, n = 2).

[00317] El ADC **Conjugado 4** y el ADC de referencia sustituto Conjugado 1 mostraron actividad equivalente en el bloqueo de fijación de ligandos BAFF (Tabla 20) y APRIL (Tabla 21) a BCMA recombinante mediante ELISA con valores de IC₅₀ que variaban de 6,8 a 8,9 nM. Se agregó anticuerpo Anti-Her2 Trastuzumab como control negativo en los ensayos y no bloqueó la fijación de BAFF ni APRIL a BCMA.

[00318] Los resultados indican que el ADC **Conjugado 4** bloquea la fijación de ligandos BAFF y APRIL a BCMA y sugieren que el ADC **Conjugado 4** puede compartir el mismo mecanismo de acción adicional que el Conjugado 1 en la reducción potencial de la proliferación de células MM.

Tabla 20: Resumen de BAFF IC50

Conjugado No.	Experimento No.1	Experimento No.2
	IC50 (nM)	IC50 (nM)
Conjugado 4	6.8	6.9
Conjugado 1	7	7.4

Table 21: Resumen de APRIL IC50

Conjugado No.	Experimento No.1	Experimento No.2
	IC50 (nM)	IC50 (nM)
Conjugado 4	8.3	8.9
Conjugado 1	6.8	8.5

EJEMPLO 19

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL CONJUGADO 4

[00319] El Conjugado 4 es un conjugado de anticuerpo y fármaco-ligador. El Conjugado 4 es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) IgG1 humanizado anti-antígeno de maduración de células B (anti-BCMA) aglucosilado compuesto de un anticuerpo (2265-F02 aglucosilado) humanizado IgG1 anti-BCMA conjugado de manera covalente en el residuo de aminoácido no natural (nnAA) para-azidometil-L-fenilalanina (pAMF) en las posiciones nominales 180 y 404 según numeración de la UE (posiciones reales 186 y 410) con un fármaco-ligador 20-metil-1-(3-metil-3,9-dihidro-8Hdibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-il)-1,5,21-trioxo-8,11,14,17-tetraoxa-4,20- diazapentacosan-25-oílo (desacetilo) maitansinoide. El ADC, Conjugado 4, es una especie conjugada predominante única (que existe como una mezcla

~1:1 de dos regioisómeros) con una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de 4. El peso molecular del Conjugado 4 es aproximadamente 151 kDa. Una muestra del Conjugado 4, preparada usando métodos descritos en la presente, exhibió una DAR de 3,9 a 4, según se midió y calculó usando los métodos descritos en la presente (ver, por ejemplo, el Ejemplo 6).

[00320] Los enlaces disulfuro en el Conjugado 4 son los siguientes: Intercadena (LC1): Cys 24-Cys 89; Cys 135-Cys 195. Intercadena (HC1): Cys 23-Cys 97; Cys 150-Cys 206; Cys 267-Cys 327; Cys 373-Cys 431. Intercadena (HC2): Cys 23-Cys 97; Cys 150-Cys 206; Cys 267-Cys 327; Cys 373-Cys 431. Intercadena (LC2): Cys 24-Cys 89; Cys 135-Cys 195. Intra-LC1-HC-1: Cys 215-Cys 226. Intra-LC2-HC-2: Cys 215-Cys 226. Intra-HC-HC-bisagra-1: Cys 232-Cys 232. Intra-HC-HC-bisagra-2: Cys 235 - Cys 235.

EJEMPLO 20

SECUENCIAS

[00321] La Tabla 22 proporciona las secuencias mencionadas en la presente.

Tabla 22. Secuencias

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
1	BCMA humano (Isoforma 1, UniprotKB - Q02223)			MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIP CQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFV LMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSG LGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLE YTVVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLP AALSATEIEKSISAR
2	BCMA humano (Isoforma 2, UniprotKB - Q02223)			MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIP CQLRCSSNTPPLTCQRYCNARSGL LGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLE YTVVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLP AALSATEIEKSISAR
3	BCMA de <i>Macaca Fascicularis</i> (secuencia de referencia NCBI prevista: XP_001106892.1)			MLQMARQCSQNEYFDSLHDCPK CQLRCSSNTPPLTCQRYCNASMTNS VKGMNAILWTCLGLSLIISLAVFV LTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSG LGMANIDLEKGRTGDEIVLPRGLE YTVVEECTCEDCIKNKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNSL SAALSVTEIEKSISAR

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
4	BCMA murino (secuencia de referencia NCBI: NP_035738.1)			MAQQCFHSEYFDSLHACKPCHL RCSNPPATCQPYCDPSVTSSVKGT YTVLWIFLGLTLVLSLALFTISFLL RKMNPEALKDEPQSPGQLDGSAQ LDKADTELTRIRAGDDRIFPRSLEY TVEECTCEDCVKSKPKGDS DHFFP LPAMEEGATILVTTKTGDY GKSSV PTALQSVMGMEKPTHTR
5	2265-F02	CDR-H1	Chothia	GFNISAP
6	2265-F02	CDR-H1	Kabat	APGIH
7	2265-F02	CDR-H2	Chothia	NPAGGY
8	2265-F02	CDR-H2	Kabat	FINPAGGYTDYADSVKG
9	2265-F02	CDR-H3		DYIRQYW TYVLDY
10	trastuzumab	CDR-L1		RASQDVNTAVA
11	trastuzumab	CDR-L2		SASFLYS
12	trastuzumab	CDR-L3		QQHYTTPPT
13	2265-F02	V _H		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNISAPGIHWVRQAPGKGLE WVGFINPAGGYTDYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARDYIRQYW TYVLDYWGQG TLVTVSS
14	trastuzumab	V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIK

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
15	Anticuerpo 2265-F02	Cadena pesada		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNISAPGIHWVRQAPGKGLE WVGFINPAGGYTDYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARDYIRQYWTYVLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK Los residuos en negrita se reemplazan con p-azidometil-fenilalanina en el anticuerpo 2265-F02.

<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
16	Anticuerpo 2265-F02	Cadena pesada	99	GAAGTTCAGTTAGTGGAATCAGG CGGCGGTTTAGTTCAACCAGGCG GTTCAATTGCGTCTGTGCATGCGCG GCTTCCGGTTTCAACATCAGTGC GCCTGGGATCCATTGGGTGCGTC AGGCCCCAGGCAAGGGTCTGGA GTGGGTCGGTTTTATCAATCCTG CTGGCGGTTATACCGACTATGCG GACTCTGTGAAGGGTCGCTTCAC CATTAGCGCGGATACCTCGAAGA ATACGGCGTATTTACAGATGAAT TCCCTGCGTGCAGAGGACACTGC CGTCTACTATTGTGCGCGCGATT ACATTCGGCAGTACTGGACCTAC GTTCTTGACTACTGGGGCCAGGG TACGCTGGTCACCGTGTCGTCGG CGTCAACCAAGGGTCCGTCCGGTT TTCCGCTGGCGCCGTCGTCAAA ATCTACGTCCGGTGGTACCGCCG CTCTGGGTTGCCTGGTTAAAGAC TACTTTCCGGAGCCGGTCACGGT TTCGTGGAACCTCTGGTGCCCTGA CTTCTGGCGTCCACACGTTCCCA GCCGTTTTGCAGTCATCCGGTCT GTAGTCGTTGTCCTCTGTGGTCA CGGTGCCGTCATCGTCTCTGGGC ACCCAAACCTATATCTGCAATGT CAACCACAAACCGTCCAATACG AAAGTTGACAAAAAAGTCGAGC CGAAATCTTGCGACAAGACCCAC ACGTGCCCTCCGTGCCCGGCACC GGAAGTCTGGGCGGTCCGTCCG TGTTCCCTGTTCCCGCCGAAGCCG AAAGATACTCTGATGATCTCACG TACCCCGGAAGTCACGTGTGTTG TTGTTGACGTGTCACACGAAGAT CCAGAGGTGAAATTCAATTGGTA TGTGGACGGTGTCGAAGTGCATA ATGCCAAAACCAAACCGCGCGA GGAACAGTACAACCTCCACCTACC GCGTCCGTGTCGGTGTTGACCGTC CTGCATCAAGACTGGCTGAACGG TAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTT CAAATAAGGCACTGCCTGCGCCG ATTGAAAAGACCATCTCTAAGGC AAAGGGCCAGCCGCGTGAGCCA CAGGTGTATACCCTGCCGCCGTC GCGTGAAGAAATGACCAAGAAC CAAGTTTCACTGACGTGTCTGGT CAAGGGCTTTTATCCGTCCGATA TTGCGGTGGAGTGGGAGTCTAAT GGCCAGCCGGAACAATTACA AAACGACTCCGCCGGTGCTGGAT TCCGACGGTTTCGTAGTTCCTGTA

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
17	Anticuerpo 2265-F02	Cadena liviana		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQGHYTPPTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
18	Anticuerpo 2265-F02	Cadena liviana		GACATTCAAATGACCCAGTCTCC GTCGTCACGTGCCGCATCCGTTG GCGACCGCGTTACCATCACGTGC CGTGCGTCGCAAGATGTGAACAC CGCCGTGGCGTGGTATCAGCAAA AACCGGGCAAAGCTCCGAAGCT GCTGATCTATTCAGCCTCTTTCCT GTACTCGGGTGTTCGGTCCCGTT TCTCAGGCTCTCGCTCGGGTACG GATTTCAACCTGACTATTTCTTCA CTGCAACCGGAAGATTTTGCGAC GTACTACTGTCAGCAGCATTACA CGACTCCGCCGACCTTTGGTCAG GGTACCAAGGTCGAGATTAAGC GTACCGTGGCTGCACCATCCGTG TTTATCTTCCCTCCGTCTGATGAG CAGCTGAAATCCGGTACGGCGTC GGTCGTCTGCTTGCTGAATAACT TCTATCCGCGTGAAGCGAAGGTG CAATGGAAGGTTGACAATGCCCT GCAGTCAGGTAACCTCCCAAGAGT CTGTTACCGAACAAGATTCGAAA GACTCAACCTACTCCCTGTCTTC GACGCTGACGTTGTCCAAAGCGG ACTATGAGAAACACAAGGTTTAC GCATGTGAAGTGACCCACCAGG GCCTGTCATCTCCGGTCACCAAA TCATTTAATCGCGGTGAGTGC

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
19	Constante de HC de IgG1 humana			ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	Constante de IgG LC humana Ckappa			RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLST LTLTKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
21	Constante de HC de IgG1 de ratón			AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSETVTCNVAHPASSTKVVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP PKPKDVLITLTPKVTCVVVDISK DDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQP REEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK GRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPA ENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN HTEKSLSHSPG
22	Constante de IgG LC de ratón Ckappa			RADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPPKDINVKWKIDGSERQ NGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
23	Kappa LC			HMTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS STLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
24	Lambda LD			GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS

<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>Molécula</u>	<u>Región</u>	<u>Esquema</u>	<u>Secuencia</u>
25	Etiqueta FlagHis			GSGDYKDDDDKSGHHHHHH
26	Ligador			GGGGSGGGGSGGGGS
27	Ligador			AAGSDQEPKSS

Equivalentes

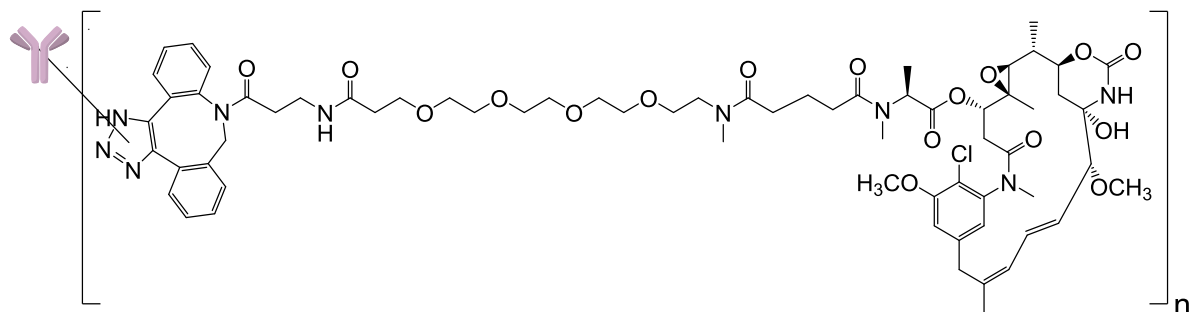
[00322] La divulgación indicada anteriormente puede abarcar una gran variedad de invenciones con utilidad independiente. Aunque cada una de estas invenciones se divulgó en su forma preferida, las modalidades de estas divulgadas e ilustradas en la presente no deben considerarse en un sentido limitado, dado que son posibles numerosas variaciones. El objeto de las invenciones incluye todas las combinaciones novedosas y no evidentes y las subcombinaciones de los diversos elementos, características, funciones y/o propiedades divulgadas en la presente. Las siguientes reivindicaciones señalan en particular determinadas combinaciones y subcombinaciones consideradas novedosas y no evidentes. Las invenciones incorporadas en otras combinaciones y subcombinaciones de características, funciones, elementos y/o propiedades se pueden reivindicar en esta solicitud, en solicitudes que reivindican prioridad de esta solicitud o en solicitudes relacionadas. Dichas reivindicaciones, ya sea que se dirijan a una invención diferente o a la misma invención, y que sean más amplias, más limitadas, iguales o diferentes en alcance en comparación con las reivindicaciones originales, también se consideran incluidas dentro del objeto de las invenciones de la presente divulgación.

[00323] Se pueden combinar una o más características de cualquier modalidad descrita en la presente o en las figuras con una o más características de cualquier otra modalidad descrita en la presente o en las figuras sin apartarse del alcance de la invención.

[00324] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia, como si se indicara de manera específica e individual que cada publicación o solicitud de patente se incorpora por referencia. Si bien la invención que antecede se describió en detalle mediante ilustraciones y ejemplos para una mayor claridad, será evidente para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que se pueden realizar algunos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo de acuerdo con la fórmula:



en donde **n** es de 1 a 4;

el anticuerpo comprende una región V_H de SEQ ID NO: 13, y una región V_L de SEQ ID NO: 14; el anticuerpo también comprende un residuo de p-azidometil-fenilalanina que se sustituye en cada uno de los sitios HC-F404 y HC-Y180 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE; y cada estructura dentro de los corchetes de la fórmula se une al anticuerpo en uno de los residuos de p-azidometil-fenilalanina.

2. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 1 en donde **n** es 1.
3. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 1 en donde **n** es 2.
4. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 1 en donde **n** es 3.
5. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 1 en donde **n** es 4.
6. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende al menos un dominio de región constante.
7. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 6, en donde la región constante comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 19 y 20, o ambas.
8. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

9. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es una IgA, una IgD, una IgE, una IgG o una IgM.

10. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es humano o humanizado.

11. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es aglicosilado.

12. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

13. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona de un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento scFv (sFv) y un fragmento scFv-Fc.

14. El conjugado de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo es un fragmento scFv.

15. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo es un fragmento scFv-Fc.

16. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se fija específicamente al receptor de BCMA de *Macaca fascicularis*.

17. El conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se fija específicamente al receptor de BCMA de ratón.

18. Un kit que comprende un conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, e instrucciones para el uso del conjugado de anticuerpo.

19. El kit de la reivindicación 18, en donde el conjugado de anticuerpo está liofilizado.

20. El kit de la reivindicación 19, que comprende que además un fluído para la reconstitución del anticuerpo liofilizado.
21. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
22. Un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o la composición farmacéutica de la reivindicación 21.
23. Un método para diagnosticar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o la composición farmacéutica de la reivindicación 21.
24. El método de las reivindicaciones 22 a 23, en donde la enfermedad o afección es cáncer.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde la enfermedad o afección es leucemia.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde la enfermedad o afección es linfoma.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde la enfermedad o afección es mieloma múltiple.
28. El método de la reivindicación 27, en donde w dicho mieloma múltiple es de Etapa I de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado.

29. El método de la reivindicación 27, en donde w dicho mieloma múltiple es de Etapa II de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado.

30. El método de la reivindicación 27, en donde dicho mieloma múltiple es de Etapa III de acuerdo con el Sistema de estadificación internacional o el Sistema de estadificación internacional revisado.

31. El método de la reivindicación 27, en donde dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recientemente diagnosticado.

32. El método de la reivindicación 27, en donde dicho mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante o resistente.

RESUMEN

CONJUGADO DE ANTICUERPO ANTI-BCMA, COMPOSICIONES QUE LO COMPRENDEN, Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y USO DEL MISMO

Conjugados de anticuerpo con especificidad de fijación para BCMA (BCMA) y sus isoformas y homólogos, y composiciones que comprenden los conjugados de anticuerpo, que incluyen composiciones farmacéuticas. También métodos para producir los conjugados de anticuerpo y las composiciones, además de métodos para usar los conjugados de anticuerpo y composiciones, por ejemplo, en métodos de diagnóstico y tratamiento.