

TERAPIA DE COMBINACIÓN

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO POR VÍA ELECTRÓNICA

5 El contenido de la lista de secuencias presentada por vía electrónica en el archivo de texto ASCII (nombre: BCMA-150-US-PSP-SequenceListing.txt; tamaño: 11,279 bytes; y fecha de creación: 28 de mayo de 2019) presentado con la solicitud se incorpora a la presente en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Cáncer sanguíneo es un término que se usa para describir muchos tipos diferentes de cáncer que afectan a las células sanguíneas, a la médula ósea o el sistema linfático. Se ha notificado que los cánceres sanguíneos representan casi el 10% de los nuevos casos de cáncer cada año en los EE. UU., viviendo más de 1.2 millones de personas con o en remisión de un cáncer sanguíneo solo en los EE. UU. Es el quinto cáncer más común en el RU, viviendo más de 240,000 personas con cáncer sanguíneo en el RU y diagnosticándose a 40,000 personas
15 cada año cáncer sanguíneo. Los tres grupos principales son leucemia, linfoma y mieloma, cada uno de los cuales representa un tumor maligno de células B.

Por ejemplo, el mieloma maligno de células B (por ejemplo, mieloma múltiple (MM)) es un tumor maligno de células plasmáticas clonales (por ejemplo, células B) con daño persistente en el ADN asociado con progresión desde gammopatía monoclonal premaligna de significación
20 indeterminada (MGUS) hasta MM activo. Los regímenes de tratamiento actuales para el mieloma incluyen corticosteroides convencionales, agentes alquilantes, inhibidores del proteasoma (PI) y fármacos inmunomoduladores (IMiD), que han ayudado a aumentar la tasa de supervivencia global de los pacientes con mieloma. Una posibilidad terapéutica particularmente interesante que se ha explorado en los últimos años ha sido la inmunoterapia
25 (por ejemplo, con anticuerpos monoclonales). Por ejemplo, los documentos WO 2010/104949 y WO 2019/025983 describen anticuerpos que se unen a un antígeno conocido como antígeno de maduración de células B (BCMA), que se ha mostrado que tiene buena selectividad para tumores malignos de células B (en particular, células de mieloma), mostrando los anticuerpos descritos una actividad anti-tumor maligno de células B.

30 A pesar del aumento de disponibilidad de diferentes tratamientos, el desarrollo de resistencia farmacológica subyace a la recidiva de la enfermedad (particularmente en mieloma), y la eficacia de cualquier tratamiento se ve limitada por la eficacia máxima que puede lograrse mediante una dosis tolerable.

35 Por tanto, existe la necesidad de un medicamento mejorado que tenga actividad anti-tumor maligno de células B. La presente invención aborda uno o más de los problemas mencionados anteriormente.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una terapia de combinación para un tumor maligno de células B.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que puede usarse un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib) para que funcione en sinergia con un conjugado de anticuerpo anti-BCMA-fármaco (y viceversa), aumentando la citotoxicidad de células de un tumor maligno de células B tras el contacto con una combinación de estos agentes. Por tanto, un hallazgo fundamental de la presente invención es que puede emplearse un inhibidor del proteasoma para potenciar la actividad anti-tumor maligno de células B de un conjugado de anticuerpo-fármaco (y viceversa), más particularmente donde el fármaco (o dicho conjugado de anticuerpo-fármaco) es un agente de reticulación de ácido nucleico.

En un aspecto, se proporciona en la presente un medicamento para tumores malignos de células B, que comprende:

- a. un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al antígeno de maduración de células B (BCMA), conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y

- b. un inhibidor del proteasoma;

en el que el medicamento proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con un medicamento por lo demás idéntico que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en el que el medicamento proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con un medicamento por lo demás idéntico que carece de dicho ADC.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento de un tumor maligno de células B, comprendiendo dicha combinación terapéutica:

- a. un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y

- b. un inhibidor del proteasoma;

en la que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en la que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho ADC.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar un tumor maligno de células B, comprendiendo el método administrar a un sujeto una combinación terapéutica que comprende:

- a. un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y
- b. un inhibidor del proteasoma;

en el que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en el que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho ADC.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método *in vitro* para potenciar la supresión por ADC de una célula B maligna, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula B maligna con (a) un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico, en combinación con (b) un inhibidor del proteasoma.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método *in vitro* para potenciar la supresión por un inhibidor del proteasoma de una célula B maligna, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula B maligna con (a) un inhibidor del proteasoma, en combinación con (b) un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra que M2 es más citotóxico contra células de MM que su homólogo de ADC de MMAF (M3). **A** Se añadieron diluciones en serie de M2 o M3 a cultivos celulares de MM durante 3d, seguido por ensayo de viabilidad celular de CCK8. Se muestran valores de ED₅₀ de M2 (círculo negro) y M3 (círculo en blanco) determinados a partir de un experimento representativo de tres repeticiones, por triplicado para cada dosis. Las células MM1S(R) y H929(R) derivadas de MM1S y H929, respectivamente, son resistentes a lenalidomida y pomalidomida. RPMI-BCMA, células RPMI8226 que sobreexpresan BCMA; RPMI, células RPMI8226. **B** Se añadieron M2 (círculo negro) o M3 (círculo en blanco) durante 3d, seguido por ensayo de proliferación celular usando incorporación de timidina [³H] (izquierda) y ensayo de viabilidad basado en CCK8 para RPMI8226 y crecimiento del título celular (CTG) basado en luminiscencia para células ANBL6 y ANBL6-BR (resistentes a bortezomib (btz)) emparejadas. **C** Se trataron pares de células de MM resistentes a dexametasona (Dex) y btz con M2 o M3

durante 2d, seguido por análisis de citometría de flujo (FCM) para determinar los porcentajes de células apoptóticas (anexina V+/Aqua- y anexina V+/Aqua+). ***, $p < 0.0005$; **, $p < 0.005$.

La **FIG. 2** muestra que M2, de manera más potente que M3, bloquea la viabilidad de células de MM inducida por BMSC y es citotóxico para células de MM derivadas de pacientes primarios. **A** Se trataron células MM1Sluc, solas o con BMSC, con M2 o M3 durante 4d, y se determinó la viabilidad celular mediante BLI. **B** Se incubaron células MM1S(R) o H929(R) resistentes a IMiD marcadas con CFSE con los fármacos indicados en presencia o ausencia de BMSC durante 2d, seguido por análisis de FCM usando tinción con anexina V y Aqua viva/muerta. Se muestran los porcentajes de células de MM anexina V-/Aqua- (viables) CFSE+ a partir de uno de tres experimentos, por triplicado a cada dosis. **C** Se trataron células H929, solas o con IL-6 (5 ng/ml), con M2 durante 2d, y se midieron los porcentajes de células anexina V-/Aqua- (viables). **D** Se incubaron células CD138+ de un paciente con RRMM representativo con M2 o M3 durante 3d, y se midieron las fracciones de células vivas/muertas. **E** Se incubaron células CD138+ de pacientes con RRMM (n=3) con M2 durante 3d, seguido por ensayo de CTG. **F** Se trataron BMMC de pacientes con MM (NDMM=4, RRMM=2) con M2 (10 µg/ml) durante 5d. Se determinaron los porcentajes de células CD38altoCD138+ viables mediante análisis de FCM.

La **FIG. 3** muestra que M2, de manera más potente que M3, bloquea la proliferación celular e induce la apoptosis en líneas celulares de MM independientemente de la sensibilidad a fármacos. **A** Se añadieron M1 (isotipo-PBD), M2 (anti-BCMA-PBD), M3 (homólogo anti-BCMA-MMAF) y M4 (isotipo-MMAF) a células de MM por triplicado durante 3d, seguido por ensayo de viabilidad de CCK8. **B** Se añadieron M2 o M3 durante 3d, seguido por ensayo de proliferación usando la incorporación de [H^3]-timidina. **C** Se confirmaron células ANBL6 (sensibles a btz) y ANBL6-BR (resistentes a btz) después de 2d de tratamiento con btz usando ensayo de supervivencia basado en CTG (izquierda) y ensayo de apoptosis basado en FCM usando tinción con anexina V y Aqua viva/muerta (derecha). **D** Se trataron células MM1S (panel superior) y MM1R (panel inferior) con los fármacos indicados. Se muestran los porcentajes de células de MM anexina V+.

La **FIG. 4** muestra que M2 induce citotoxicidad específica contra células de MM protegidas por BMSC e IL-6, y agota además células de MM de pacientes CD38altoCD138+. **A** Se trataron diversas líneas celulares de MM sensibles y resistentes a fármacos (n=6), solas o con BMSC, con M2 durante 3d, seguido por ensayo de CTG. **B** Se trataron BMSC, PBMC y células NK negativas para BCMA con M2 durante 5d. **C** Se trataron células H929, solas o con IL-6 (5 ng/ml), con M2 durante 3d. **D** Se incubaron BMMC de un paciente con NDMM representativo con M2 durante 5d. M2 disminuyó las células de MM CD38altoCD138+ de una manera dependiente de la dosis.

La **FIG. 5** muestra que M2, junto con bortezomib, induce de manera sinérgica la muerte de células de MM. **A-B** Se trataron células de MM con los fármacos indicados durante 2d, seguido por análisis de FCM usando tinción con PI y anexina V. Se muestran los resultados de una muestra representativa de cada línea celular (**A**) y los resúmenes de los porcentajes de células anexina V+ de tres repeticiones (**B**). *, $p < 0.01$; **, $p < 0.005$, ***, $p < 0.002$, **C** Se usan datos de ensayos de viabilidad celular basados en CTG para determinar el índice de combinación (CI). "Efecto" significa el grado de reducción en la viabilidad celular por M2 y btz. $CI < 1$ indica sinergismo de ambos fármacos. Se obtuvieron resultados similares a partir de 3 repeticiones adicionales.

La **FIG. 6** muestra que la combinación de bajas dosis de M2 y btz desencadenan la muerte de células de MM sinérgica. Se incubaron las líneas celulares de MM indicadas con M2 y btz durante 3d, solos o juntos, seguido por ensayo de viabilidad basado en CTG. "Efecto" representa la fracción de células que muestran una disminución en la viabilidad con el tratamiento combinado de M2 más el tratamiento con btz. Un índice de combinación (CI) de < 1 indica sinergia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y se muestra el valor medio.

La **FIG. 7** muestra que M2 combinado con bortezomib induce una actividad anti-MM *in vivo* más potente y una supervivencia prolongada en ratones, en comparación con el fármaco individual solo. **A** Se aleatorizaron ratones CB17 SCID ($n=7$ cada grupo) con implantes de tumor MM1S palpable y se trataron con vehículo de control, una única dosis de M2 (0.4 mg/kg), seis dosis de btz (0.4 mg/kg) o una combinación de M2 y btz (M2+btz) durante 2 semanas. Se inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa en el grupo tratado con la combinación en comparación con los controles (cnt). (M2 frente a M2+btz, $p=0.035$; btz frente a M2+btz, $p < 0.005$; cnt frente a M2+btz, $p=0.0012$; btz frente a cnt, $p < 0.005$; M2 frente a cnt, $p < 0.005$). *, $p < 0.04$, **, $p < 0.005$, **B** Se siguieron los pesos corporales de los animales. **C** Usando análisis de Kaplan-Meier y de rangos logarítmicos, la mediana de la supervivencia global de los animales tratados con la terapia de combinación se prolongó significativamente. (cnt, 22d; M2, 40.5d; btz, 35d; M2+btz, 57d) (M2 frente a M2+btz, $p < 0.045$; btz frente a M2+btz, $p < 0.023$; cnt frente a M2+btz, $p < 0.002$). **D** Se analizaron inmunohistoquímicamente secciones de tejido tumoral de cada grupo para determinar Ki-67 (aumentos originales, x400).

La **FIG. 8** muestra que los tratamientos combinados con M2 y btz disminuyeron significativamente el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de MM1S, demostrando el sinergismo *in vivo* de M2 y btz en el tratamiento del mieloma. Se extirparon los tumores el mismo día de tratamiento de ratones representativos.

La **FIG. 9** muestra que M2 induce significativamente la fosforilación de rutas de señalización de respuesta al daño en el ADN (DDR) en células de MM, independientemente del estado de p53 y la resistencia farmacológica. Se trataron células de MM con p53 de tipo natural

(MM1S, MM1R, H929) y mutada (*) con las dosis indicadas de M2 (a-d) durante periodos de tiempo indicados (a), durante la noche (b, d) o 2d (c). Se prepararon lisados celulares y se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para las moléculas indicadas. cPARP, PARP escindido; cCas3, caspasa 3 escindida. Se repitieron los experimentos tres veces.

La **FIG. 10** muestra que M2 induce significativamente cascadas de señalización de DDR seguido por apoptosis de una manera dependiente de BCMA. Se trataron las células de MM indicadas con las dosis indicadas de M2 (A-B, D-F) o M3 (A, F, G) durante la noche (A, D, G) o 2d (B, E-F). Se prepararon lisados celulares y se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para las moléculas indicadas. M2, pero no M3, induce rutas de señalización de DDR. cPARP, PARP escindido; cCas3, caspasa 3 escindida. (C) Se midieron los niveles de BCMA usando qRT-PCR. Se derivaron BCMA^{medio}, BCMA^{bajo} y BCMA^{alto} de la RPMI8226 original.

FIG. 11 El tratamiento con M2 induce expresión génica relacionada con DDR incluyendo RAD51. Se analizó el ARN de células de MM H929 viables tratadas con M2 en condiciones subletales usando el alineamiento de la ruta de reparación de ADN humano TagMan® (a). Se normalizaron los transcritos mediante la media geométrica de los controles internos, y se muestran los cambios en veces en grupos tratados con M2 en relación con los grupos de control (cnt). Se prepararon lisados celulares a partir de diversas líneas celulares de MM tratadas con M2 para la inmunotransferencia para determinar los niveles proteicos de RAD51 (b-c).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona en la presente un medicamento para tumores malignos de células B, que comprende:

- a. un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al antígeno de maduración de células B (BCMA), conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y
- b. un inhibidor del proteasoma;

en el que el medicamento proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con un medicamento por lo demás idéntico que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en el que el medicamento proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con un medicamento por lo demás idéntico que carece de dicho ADC.

Otro aspecto proporciona una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento de un tumor maligno de células B, comprendiendo dicha combinación terapéutica:

- a. un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y
- b. un inhibidor del proteasoma;

en la que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en la que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho ADC.

En un aspecto relacionado, se proporciona un método para tratar un tumor maligno de células B, comprendiendo el método administrar a un sujeto una combinación terapéutica que comprende:

- a. un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico; y
- b. un inhibidor del proteasoma;

en el que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho inhibidor del proteasoma; o

en el que la combinación terapéutica proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B en comparación con una composición por lo demás idéntica que carece de dicho ADC.

Dicha supresión potenciada de un tumor maligno de células B puede comprender uno o más seleccionados de un retraso potenciado en el crecimiento tumoral, una reducción potenciada en el tamaño tumoral, una reducción potenciada en la metástasis tumoral, una tasa de supervivencia potenciada en un sujeto que comprende un tumor maligno de células B, o una combinación de los mismos.

El término "tumor maligno de células B" abarca cualquier enfermedad en la que las células B se vuelven cancerosas y se dividen sin control (por ejemplo en la médula ósea y la sangre), y pueden invadir otros sitios (por ejemplo tejidos y sistemas linfáticos). En una realización, dicho tumor maligno de células B es uno o más seleccionados de linfoma de células B, leucemia de células B, mieloma (por ejemplo mieloma múltiple y o células progenitoras de mieloma), o una combinación de los mismos. El término "célula B" abarca tanto células B maduras (diferenciadas) como precursores de las mismas (por ejemplo células madre). Por ejemplo, se abarcan células madre de mieloma y células progenitoras de mieloma.

En una realización, el tumor maligno de células B se caracteriza por comprender una célula B maligna que expresa BCMA. En una realización, dicha célula B maligna expresa un alto

nivel de antígeno BCMA (en relación con una célula B no maligna de referencia). Se considera que una célula B maligna expresa un "alto nivel de BCMA" cuando el nivel de expresión de antígeno BCMA en la célula B maligna aumenta hasta un nivel estadísticamente significativo en comparación con un nivel de expresión de BCMA en una célula B no maligna (por ejemplo sana).

Los ejemplos de un linfoma de células B incluyen linfoma de células B grande difuso (DLBCL), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasma-cítico, linfoma primario del sistema nervioso central (CNS) y linfoma intraocular primario. Los ejemplos de leucemia de células B incluyen leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfoblástica aguda, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia linfoblástica B precursora y tricoleucemia.

En una realización, dicho tumor maligno de células B es mieloma (por ejemplo mieloma múltiple).

El mieloma múltiple (MM), también conocido como mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler, es un cáncer de células B (células plasmáticas), que son un tipo de glóbulos blancos normalmente responsables para la producción de anticuerpos. Las terapias actuales para el MM incluyen la quimioterapia, radiación, cirugía, biofosfonatos y el trasplante de células madre autólogas (ATCM). Aunque estas terapias provocan a menudo remisiones, casi todos los pacientes finalmente experimentan recidiva y mueren. El mieloma múltiple afecta a 1-4 de cada 100,000 personas al año. La enfermedad es más común en los hombres, y por razones aún desconocidas, es dos veces más frecuente en afroestadounidenses que en estadounidenses caucásicos.

El antígeno de maduración de células B (BCMA), también conocido como miembro 17 de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFRSF17), es un miembro de receptor de la familia de necrosis tumoral (TNFR) expresado en células del linaje de células B. La expresión de BCMA es máxima en células B diferenciadas de manera terminal. BCMA está implicado en la mediación de la supervivencia de células plasmáticas para mantener la inmunidad humoral a largo plazo. La expresión de BCMA se ha asociado con numerosos cánceres, trastornos autoinmunitarios y enfermedades infecciosas. Se ha detectado ARN de BCMA universalmente en células de mieloma múltiple, y la proteína BCMA se ha detectado en la superficie de células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple por varios investigadores. Como tal, BCMA representa una diana terapéutica para tumores malignos de células B, en particular mieloma múltiple.

La secuencia de nucleótidos de BCMA humano (TNFRSF17) se describe en Ensembl (véase el número de registro ENSG00000048462), que se incorpora en la presente por referencia. La secuencia de aminoácidos de BCMA (TNFRSF17) se describe en UniProt (véase

el número de registro Q02223, que se incorpora en la presente por referencia). La secuencia de aminoácidos de BCMA humano se proporciona en SEQ ID NO: 13.

BCMA también se expresa en células madre de mieloma múltiple. Como tal, el término "mieloma" abarca células "madre" de mieloma múltiple y células "progenitoras" de mieloma. Además, los métodos y usos de la invención abarcan el tratamiento de tumores malignos que comprenden células madre de mieloma múltiple (por ejemplo que expresan BCMA). Pueden identificarse células madre de mieloma múltiple (y/o células progenitoras de mieloma) en la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple por su expresión de superficie de CD19 y falta de expresión de superficie de CD138. Estas células son exclusivamente clonogénicas y se injertan en ratones inmunodeficientes, mientras que las células plasmáticas de mieloma, definidas como CD138+CD19-, no lo hacen.

El término "conjugado de anticuerpo-fármaco" significa un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) unido a un agente citotóxico (generalmente un fármaco de molécula pequeña con una alta toxicidad sistémica) por medio de ligadores químicos. Este término se usa en la presente para describir un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que está conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico. En una realización, un ADC puede comprender un agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo una citotoxina de molécula pequeña) que se ha modificado químicamente para que contenga un ligador. El ligador puede usarse entonces para conjugar el agente de reticulación de ácido nucleico (citotoxina) con el anticuerpo o con el fragmento de unión a antígeno del mismo. Tras la unión al antígeno diana en la superficie de una célula (por ejemplo BCMA), el ADC se internaliza y se transporta al lisosoma donde el agente de reticulación de ácido nucleico (citotoxina) se libera o bien por proteólisis de un ligador escindible (por ejemplo, mediante cathepsina B que se encuentra en el lisosoma) o bien por degradación proteolítica del anticuerpo, por ejemplo si está unido a la citotoxina por medio de un ligador no escindible. La citotoxina se transloca entonces del lisosoma al citosol o núcleo, donde puede unirse entonces a su diana, dependiendo de su mecanismo de acción.

En una realización, dicho agente de reticulación de ácido nucleico es un agente de reticulación de ácido nucleico citotóxico.

Los inhibidores del proteasoma han encontrado utilidad en varias terapias contra el cáncer. Los inventores han encontrado sorprendentemente que puede emplearse un inhibidor del proteasoma para potenciar (por ejemplo, potenciar de manera sinérgica) la actividad anti-tumor maligno de células B de un ADC de la invención, y a la inversa, puede emplearse un ADC de la invención para potenciar (por ejemplo, potenciar de manera sinérgica) la actividad anti-tumor maligno de células B de un inhibidor del proteasoma. Sin querer restringirse a la teoría, los presentes inventores creen que la actividad de un inhibidor del proteasoma puede potenciar

la actividad de un ADC de la invención provocando un efecto aguas abajo (molecular) que conduce a la supresión de molécula(s), por ejemplo que pueden inhibir normalmente la actividad del agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo citotoxina PBD) del ADC, y que pueden conducir incluso a resistencia al agente de reticulación de ácido nucleico. Esta actividad puede estar vinculada a o estar separada de su actividad 'normal' como inhibidor del proteasoma directo. Esta teoría se ve apoyada por la observación de que una combinación terapéutica de la invención muestra actividad potenciada incluso contra células B malignas que son resistentes a un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib) como monoterapia.

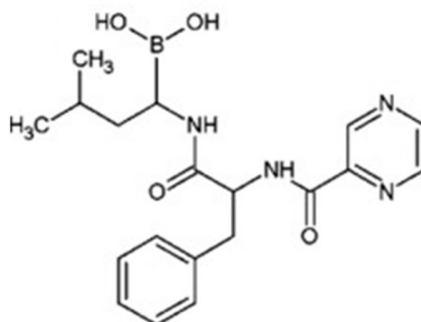
A la inversa, sin querer restringirse a la teoría, la actividad de un ADC de la invención puede potenciar la actividad de un inhibidor del proteasoma provocando un efecto aguas abajo (molecular) que conduce a la supresión de molécula(s), por ejemplo que inhiben normalmente la actividad del inhibidor del proteasoma, y que pueden conducir incluso a resistencia al inhibidor del proteasoma.

Los inhibidores del proteasoma generan varias consecuencias. Por ejemplo, pueden provocar niveles aumentados de proteínas biológicamente activas, tales como I κ B, que es el inhibidor del factor nuclear-kappaB (una proteína implicada en la supervivencia celular). Además, se acumulan también proteínas plegadas erróneamente y otras proteínas obsoletas y desencadenan la respuesta de proteínas desplegadas (UPR), lo que supone un estrés para el retículo endoplasmático (ER).

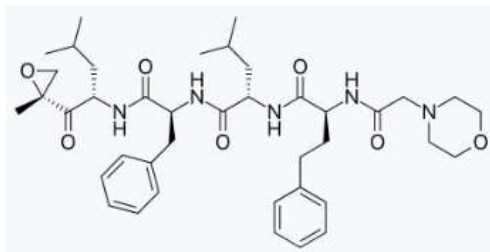
En una realización, el inhibidor del proteasoma es un inhibidor del proteasoma a base de ácido borónico (por ejemplo bortezomib).

En una realización, el inhibidor del proteasoma es uno o más seleccionados de bortezomib, carfilzomib, ixazomib, marizomib, oprozomib, delanzomib, o una combinación de los mismos. En una realización, el inhibidor del proteasoma es bortezomib.

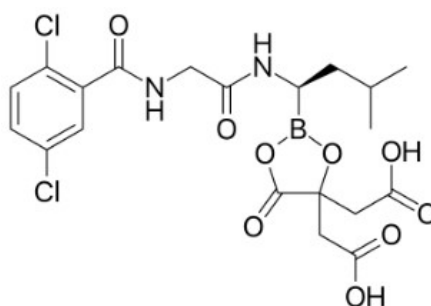
Bortezomib (por ejemplo Velcade), anteriormente conocido como PS-341 (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, EE. UU.) funciona como inhibidor del proteasoma 26S, un complejo proteico de múltiples subunidades que es responsable de la degradación de proteínas ubiquitinadas. Bortezomib es un boronato de péptido con la fórmula molecular $C_{19}H_{25}BN_4O$:



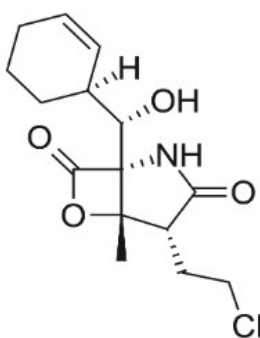
Carfilzomib (Kyprolis®), es un inhibidor del proteasoma de epoxiketona que se une de manera irreversible a la subunidad β 5 (PSMB5). Su fórmula es:



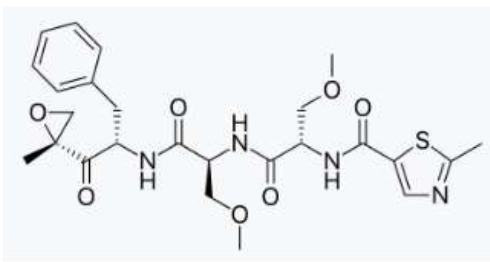
Ixazomib (Ninlaro®) inhibe de manera selectiva y reversible la subunidad proteica del proteasoma beta de tipo-5 (PSMB5). Su fórmula es:



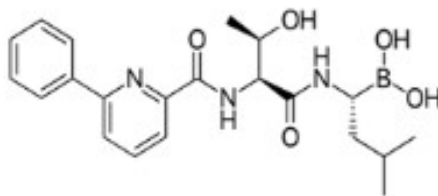
Marizomib (Salinosporamide A) inhibe la actividad del proteasoma modificando covalentemente los residuos de treonina del sitio activo del proteasoma 20S. Se une a 3 sitios catalíticos principales en las subunidades proteicas del proteasoma β 5, β 1 y β 2, de manera irreversible. Su fórmula es:



Oprozomib (conocido como ONX 0912) tiene la siguiente fórmula:



Delanzomib (conocido como CEP-18 770) tiene la siguiente fórmula:



En una realización, el medicamento y/o la composición terapéutica está comprendida dentro de una composición farmacéutica. La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la composición. Dicha composición puede ser estéril. El medicamento y/o la composición terapéutica puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador de ejemplo es solución salina fisiológica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender uno o más de un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico), un promotor de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

En una realización, un medicamento, combinación terapéutica o composición farmacéutica de la invención puede comprender un portador estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012). En una realización, un medicamento, combinación terapéutica o composición farmacéutica de la invención puede estar comprendido dentro de una o más formulaciones seleccionadas de una cápsula, un comprimido, una suspensión acuosa, una disolución, un aerosol nasal, o una combinación de los mismos. En una realización, una composición farmacéutica puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc.

Un agente que es "citotóxico" (denominado en la presente "citotoxina" o "agente citotóxico") es un agente que inhibe o impide la función de células y/o provoca la destrucción de células (muerte celular), y/o ejerce efectos antiproliferativos. Se apreciará que una citotoxina o agente citotóxico de un ADC también se denomina en la técnica "carga útil" del ADC.

El término "agente de reticulación de ácido nucleico" significa una molécula que reacciona con dos nucleótidos de un ácido nucleico, formando una unión covalente entre ellos. Esta reticulación puede producirse dentro de la misma cadena (intracatenaria) o entre cadenas opuestas de un ADN bicatenario (intercatenaria). Estas uniones (aductos) interfieren con el metabolismo celular, tal como la replicación y la transcripción del ADN, desencadenando

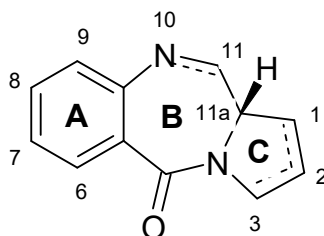
En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico es un agente que daña el ADN induciendo una rotura de la cadena de ADN (rotura monocatenaria y/o rotura bicatenaria), y conduciendo posteriormente a apoptosis normalmente. En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico es un agente de reticulación de ácido nucleico citotóxico.

En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico es uno o más seleccionados de una pirrolobenzodiazepina (PBD), una mostaza de nitrógeno, cisplatino, una cloroetilnitrosourea (CENU), un psoraleno, un antibiótico de mitomicina C (MMC), o una combinación de los mismos. Dicha mostaza de nitrógeno puede ser una o más seleccionadas de ciclofosfamida, clormetina (por ejemplo mecloretamina o mustina), uramustina, mostaza de uracilo, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, bendamustina o una combinación de los mismos. En una realización, dicha CENU es carmustina.

En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico es una pirrolobenzodiazepina (PBD).

El término "pirrolobenzodiazepina" abarca tanto una pirrolobenzodiazepina así como un derivado funcional de la misma.

Las PBD son una clase de agentes citotóxicos que se translocan al núcleo antes de la reticulación del ADN, impidiendo la replicación durante la mitosis, dañando el DNA al inducir una rotura de la cadena de ADN (rotura monocatenaria y/o rotura bicatenaria), y conduciendo posteriormente a apoptosis. Algunas PBD también tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN. En una realización, la PBD comprende la estructura general:



Las PBD difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en los anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay o bien una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o bien un metil éter de

10

15

20

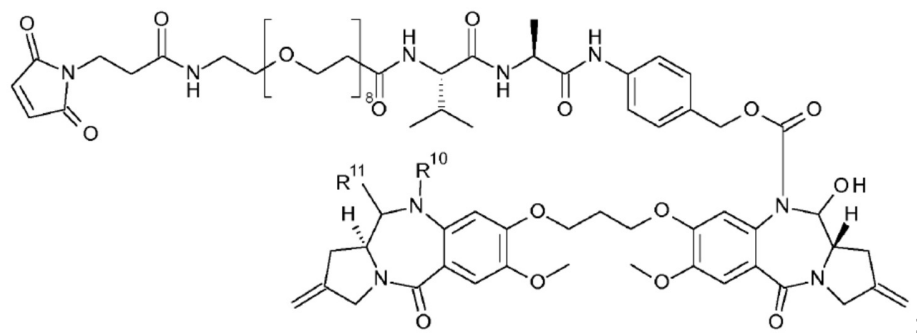


30



En una realización, la PBD (por ejemplo descrita en detalle en el documento WO 2017/137553, incorporado en la presente por referencia) comprende la fórmula:

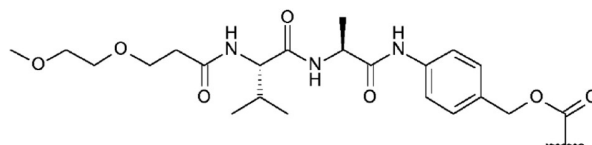
15



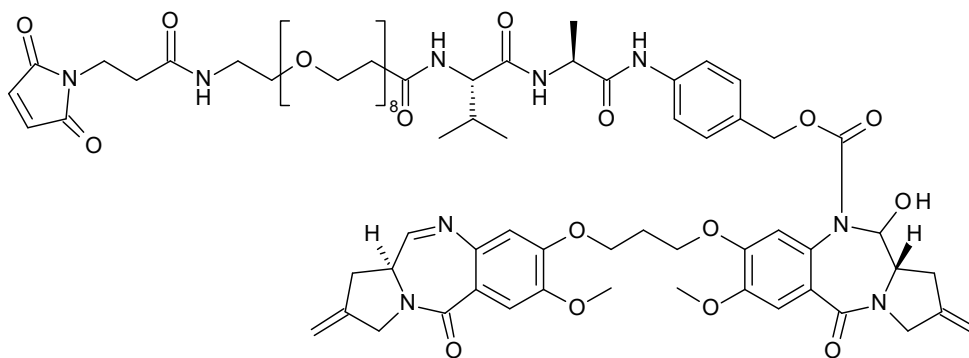
en la que o bien:

(a) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o bien

(b) R^{10} es OH, y R^{11} es:



En otra realización, la PBD es SG3400, también denominada compuesto 23 (por ejemplo descrito en detalle en el documento WO 2017/137553, incorporado en la presente por referencia) y tiene la siguiente estructura:



En una realización, la PBD es un dímero de PBD que comprende al menos dos monómeros de PBD. Por ejemplo, los al menos dos monómeros de PBD están unidos a través de sus posiciones C8 fenólicas del anillo A aromático por medio de una unión de propildioxi flexible.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede conjugarse con una citotoxina (un agente heterólogo) tal como PBD usando métodos de conjugación específicos de sitio o no específicos de sitio. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende uno, dos, tres, cuatro o más restos de

PBD. En una realización, todos los restos de PBD (conjugados con el anticuerpo o fragmento de antígeno del mismo) comprenden la misma estructura.

Un agente de reticulación de ácido nucleico (una citotoxina) de la invención puede unirse (por ejemplo conjugarse) al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por medio de un espaciador (por ejemplo al menos un espaciador). En una realización, el espaciador es un espaciador peptídico. En una realización, el espaciador es un espaciador no peptídico (por ejemplo, químico).

Las estrategias de conjugación convencionales para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se basan en la conjugación aleatoria de la carga útil (citotoxina) al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, a través de lisinas o cisteínas. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga aleatoriamente con un agente (por ejemplo citotoxina), por ejemplo, mediante reducción parcial del anticuerpo o fragmento, seguido por reacción con un agente deseado, con o sin un resto de ligador unido. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede reducirse usando DTT o un agente reductor similar. El agente con o sin un resto de ligador unido puede a continuación añadirse en un exceso molar al anticuerpo reducido o fragmento en presencia de DMSO. Después de la conjugación, puede añadirse cisteína libre en exceso para desactivar el agente que no ha reaccionado. Después, la mezcla de reacción puede purificarse e intercambiarse con tampón en PBS.

En una realización, un agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo una citotoxina) se conjuga con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante conjugación específica de sitio. En una realización, la conjugación específica de sitio de un agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo una citotoxina) con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo usando residuos de aminoácido reactivos en posiciones específicas produce una preparación de ADC homogénea con estequiometría uniforme.

La conjugación específica de sitio puede ser a través de un residuo de cisteína o un aminoácido no natural. En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo citotoxina) se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de al menos un residuo de cisteína.

En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo citotoxina) se conjuga químicamente con la cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, en una posición de Kabat específica en una región Fc del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico (por ejemplo citotoxina) se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de una sustitución de cisteína en cualquier posición adecuada de la región Fc, a través de una cisteína de al menos una de

las posiciones 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 y 446, en las que la numeración corresponde al índice EU en Kabat. En una realización, las posiciones específicas son 239, 442, o ambas, en las que la numeración corresponde al índice EU en Kabat. En una realización, las posiciones específicas son la posición 442, una inserción de aminoácido (cisteína) entre las posiciones 239 y 240, o ambas, en la que la numeración corresponde al índice EU en Kabat. En una realización, el agente de reticulación de ácido nucleico (citotoxina) se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de una unión de tiol-maleimida. En algunos aspectos, la cadena lateral de aminoácidos es una cadena lateral de sulfhidrilo, por ejemplo un grupo reactivo de sulfhidrilo ubicado en la bisagra y las cadenas pesada-ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- i. una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma;
- ii. una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una variante funcional de la misma;
- iii. una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una variante funcional de la misma;
- iv. una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una variante funcional de la misma;
- v. una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o una variante funcional de la misma; y
- vi. una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una variante funcional de la misma.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- i. una cadena pesada variable (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de identidad de secuencia con

una secuencia de aminoácidos de referencia de SEQ ID NO: 7, o una variante funcional de la misma; y/o

- ii. una cadena ligera variable (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 8, o una variante funcional de la misma.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una variante funcional de la misma. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o una variante funcional de la misma.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- i. una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una variante funcional de la misma; y
- ii. una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o una variante funcional de la misma.

SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 son versiones de línea germinal de una VH y VL. Alternativamente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una VH y/o VL que no es de línea germinal (por ejemplo una VH de SEQ ID NO: 9 y una VL de SEQ ID NO: 10).

La presente invención abarca los anticuerpos (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) definidos en la presente que tienen las secuencias de CDR mencionadas o las secuencias de cadena pesada variable y ligera variable (anticuerpos de referencia), así como también variaciones funcionales de estas. Una variante funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia (por ejemplo BCMA), y puede presentar la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia. Las variantes funcionales pueden tener una afinidad diferente por el antígeno diana en comparación con el anticuerpo de referencia. En una realización, las variantes funcionales tienen sustancialmente la misma afinidad.

En una realización, las variantes funcionales de un anticuerpo de referencia muestran variación de secuencia en una o más CDR en comparación con las correspondientes secuencias de CDR de referencia. Por tanto, una variante de anticuerpo funcional puede comprender una variante funcional de una CDR. Cuando se usa el término "variante funcional" en el contexto de una secuencia de CDR, esto significa que la CDR tiene como máximo 2, o como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de

referencia correspondiente, y cuando se combina con las restantes 5 CDR (o variantes de las mismas) permite que el anticuerpo variante se una al mismo antígeno diana (por ejemplo BCMA) que el anticuerpo de referencia. En una realización, la variante funcional presenta la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia.

5 En una realización, un anticuerpo variante funcional o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

 una CDR1 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

10 una CDR2 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

 una CDR3 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

 una CDR1 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

15 una CDR2 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente; y

 una CDR3 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

20 en el que la variante funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia. En una realización, la variante funcional presenta la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia.

 En una realización, un anticuerpo variante funcional o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

25 una CDR1 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

 una CDR2 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

 una CDR3 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

30 una CDR1 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

 una CDR2 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente; y

35 una CDR3 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con una secuencia de CDR de referencia correspondiente;

en el que la variante funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia. En una realización, una variante funcional presenta la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia.

Por ejemplo, una variante funcional del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender:

un CDR1 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 1;

un CDR2 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 2; y

un CDR3 de cadena pesada que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 3;

una CDR1 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 4;

una CDR2 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 5;

una CDR3 de cadena ligera que tiene como máximo 2 diferencias de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 6;

en el que el anticuerpo variante se une a BCMA (por ejemplo epítipo de polipéptido de BCMA), y/o en el que el anticuerpo variante puede presentar la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno.

En una realización, una variante funcional del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender:

una CDR1 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 1;

una CDR2 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 2; y

una CDR3 de cadena pesada que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 3;

una CDR1 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 4;

una CDR2 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 5;

una CDR3 de cadena ligera que tiene como máximo 1 diferencia de aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 6;

en el que el anticuerpo variante se une a BCMA (por ejemplo epítipo de polipéptido de BCMA), y/o en el que el anticuerpo variante puede presentar la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno.

Lo anterior puede aplicarse de manera análoga a variantes de los otros anticuerpos descritos en la presente, en los que las diferencias de aminoácido se definen en relación con las secuencias de CDR de los mismos, y en los que el anticuerpo variante se une al mismo antígeno diana que dichos anticuerpos, y/o en los que el anticuerpo variante puede presentar la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma).

En una realización, un anticuerpo variante funcional puede tener como máximo 5, 4 o 3 diferencias de aminoácido totales en las CDR del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que existan como máximo 2 (por ejemplo, como máximo 1) diferencias de aminoácido por CDR. En una realización, un anticuerpo variante funcional tiene como máximo 2 (por ejemplo, como máximo 1) diferencias de aminoácido totales en las CDR del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que existan como máximo 2 diferencias de aminoácido por CDR. En una realización, un anticuerpo variante funcional tiene como máximo 2 (por ejemplo, como máximo 1) diferencias de aminoácido totales en las CDR del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que exista como máximo 1 diferencia de aminoácido por CDR.

La diferencia de aminoácido puede ser una sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos. En una realización, la diferencia de aminoácido es una sustitución de aminoácidos conservadora tal como se describe en el presente documento.

En una realización, un anticuerpo variante funcional tiene las mismas secuencias de marco que los anticuerpos a modo de ejemplo descritos en la presente. En otra realización, el anticuerpo variante funcional puede comprender una región de marco que tiene como máximo 2, o como máximo 1 diferencia de aminoácido (en comparación con una secuencia de marco de referencia correspondiente). Por tanto, cada región de marco puede tener como máximo 2, o como máximo 1 diferencia de aminoácido (en comparación con una secuencia de marco de referencia correspondiente).

En una realización, un anticuerpo variante funcional puede tener como máximo 5, 4 o 3 diferencias de aminoácido totales en las regiones de marco del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que existan como máximo 2 (por ejemplo como máximo 1) diferencias de aminoácido por región de marco. En una realización, un anticuerpo variante funcional tiene como máximo 2 (por ejemplo, como máximo 1) diferencias de aminoácido totales en las regiones de marco del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que existan como máximo 2 diferencias de

aminoácido por región de marco. En una realización, un anticuerpo variante funcional tiene como máximo 2 (por ejemplo como máximo 1) diferencias de aminoácido totales en las regiones de marco del mismo en comparación con un anticuerpo de referencia correspondiente, con la condición de que exista como máximo 1 diferencia de aminoácido por región de marco.

5 Por tanto, un anticuerpo variante funcional puede comprender una cadena pesada variable y una cadena ligera variable tal como se describe en la presente, en el que:

la cadena pesada tiene como máximo 14 diferencias de aminoácido (como máximo 2 diferencias de aminoácido en cada CDR y como máximo 2 diferencias de aminoácido en cada región de marco) en comparación con una secuencia de cadena pesada descrita en la presente
10 (por ejemplo SEQ ID NO.: 7); y

la cadena ligera tiene como máximo 14 diferencias de aminoácido (como máximo 2 diferencias de aminoácido en cada CDR y como máximo 2 diferencias de aminoácido en cada región de marco) en comparación con una secuencia de cadena ligera descrita en la presente
(por ejemplo SEQ ID NO.: 8);

15 en el que el anticuerpo variante funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia, y/o en el que el anticuerpo variante funcional presenta la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia.

Dichas cadenas pesada o ligera variantes pueden denominarse "equivalentes funcionales" de las cadenas pesada o ligera de referencia.

20 En una realización, un anticuerpo variante funcional puede comprender una cadena pesada variable y una cadena ligera variable tal como se describe en la presente, en el que:

la cadena pesada tiene como máximo 7 diferencias de aminoácido (como máximo 1 diferencia de aminoácido en cada CDR y como máximo 1 diferencia de aminoácido en cada región de marco) en comparación con una secuencia de cadena pesada en la presente (por
25 ejemplo SEQ ID NO.: 7); y

la cadena ligera tiene como máximo 7 diferencias de aminoácido (como máximo 1 diferencia de aminoácido en cada CDR y como máximo 1 diferencia de aminoácido en cada región de marco) en comparación con una secuencia de cadena ligera en la presente (por
ejemplo SEQ ID NO.: 8);

30 en el que el anticuerpo variante funcional se une al mismo antígeno diana que el anticuerpo de referencia, y/o en el que el anticuerpo variante funcional presenta la misma reactividad cruzada de antígeno (o falta de la misma) que el anticuerpo de referencia.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BCMA (por ejemplo un BCMA humano) con una constante de disociación (KD) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ pM}$, $\leq 1 \text{ pM}$ o $\leq 0.1 \text{ pM}$. En una realización, el anticuerpo o
35 fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BCMA (por ejemplo un BCMA humano) con

una KD de entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 40 nM, entre aproximadamente 0.5 nM y aproximadamente 30 nM, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 20 nM o entre aproximadamente 1.5 nM y aproximadamente 20 nM. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BCMA (por ejemplo un BMCA humano) con una KD de entre aproximadamente 23 nM y aproximadamente 27 nM. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BCMA (por ejemplo un BCMA humano) con una KD de entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1.5 nM. Las mediciones de KD (afinidad de unión) pueden llevarse a cabo mediante cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore, ProteOn), interferometría de biocapa (BLI, por ejemplo, Octet), ensayo de exclusión cinética (por ejemplo, KinExA), perlas separables (por ejemplo, perlas magnéticas), cribado de antígenos, ELISA y/o el sistema ForteBio Octet. Los sistemas de exclusión cinética adecuados incluyen un sistema KinExA (por ejemplo, KinExA 3100, KinExA 3200 o KinExA 4000) (Sapidyne Instruments, Idaho).

Ventajosamente, esta combinación terapéutica proporciona un uso útil de tales inhibidores del proteasoma para seleccionar como diana células que normalmente no serían reactivas (por ejemplo, resistentes) a tales inhibidores del proteasoma. Por ejemplo, los inventores han demostrado que un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib) potencia la actividad anti-tumor maligno de células B de un ADC incluso cuando el tumor maligno de células B es resistente al inhibidor del proteasoma (véase el ejemplo 3).

Por tanto, la presente invención abarca administrar un ADC en combinación con un inhibidor del proteasoma a una dosis del inhibidor del proteasoma que por lo demás proporciona solo una supresión baja/escasa de un tumor maligno de células B, de manera que, tras dicha adición, la combinación es ahora capaz de demostrar una supresión mejorada de un tumor maligno de células B. Por tanto, la presente invención proporciona una 'readaptación' de un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib) para su uso como agente potenciador para un ADC, en contraposición con el uso de una monoterapia (independiente) (que por lo demás no sería eficaz contra tumores malignos resistentes).

De manera similar, la invención abarca administrar un inhibidor del proteasoma en combinación con un ADC a una dosis del ADC que por lo demás proporciona solo una supresión baja/escasa de un tumor maligno de células B, de manera que, tras dicha adición, la combinación es ahora capaz de demostrar una supresión mejorada de un tumor maligno de células B. Por tanto, la presente invención proporciona una 'readaptación' de un ADC para su uso como agente potenciador para un inhibidor del proteasoma, en contraposición con el uso

de una monoterapia (independiente) (que por lo demás no sería eficaz contra un tumor maligno de células B que expresa un bajo nivel de antígeno BCMA).

Por tanto, en una realización, el tumor maligno de células B es resistente a un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, un medicamento que comprende un inhibidor del proteasoma en ausencia de un ADC de la invención). En una realización, dicho inhibidor del proteasoma es bortezomib.

En una realización, el tumor maligno de células B es resistente a un ADC de la invención (por ejemplo, un medicamento que comprende un ADC en ausencia de un inhibidor del proteasoma de la invención). En una realización, un tumor maligno de células B que es resistente a un ADC de la invención se caracteriza por comprender una célula B maligna que no tiene un aumento o una disminución en un nivel de expresión de un antígeno BCMA en relación con una célula B no maligna de referencia.

Se ha mostrado también que la combinación terapéutica tiene una actividad potenciada contra un tumor maligno de células B que es resistente a varios de otros fármacos anticancerígenos comunes (véase el ejemplo 3). Por tanto, en una realización, el tumor maligno de células B es resistente a uno o más fármacos seleccionados de dexametasona, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, o una combinación de los mismos.

Además, debido a la naturaleza sinérgica de la combinación, pueden emplearse menores dosis de las partes componentes, reduciendo así el riesgo del desarrollo de resistencia (una amenaza de salud pública fundamental) a cualquiera de las partes componentes debido a un uso excesivo. De hecho, la presente invención reduce la necesidad de prescripción de regímenes de tratamiento crónicos. Por ejemplo, los inventores han mostrado que la eficacia *in vivo* de dosis subóptimas del ADC se potencia todavía cuando se administra en combinación con un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib).

Por tanto, en una realización, el ADC y/o el inhibidor del proteasoma se administra a una dosis subóptima.

El orden de aplicación/administración de las partes componentes de la combinación terapéutica puede variarse. El ADC y el inhibidor del proteasoma pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, ambos a su propia dosis óptima particular para lograr la sinergia), o bien como parte de una sola composición o bien dentro de composiciones separadas. Por ejemplo, el ADC puede estar presente en una primera composición (por ejemplo, adaptada para administración intravenosa a un sujeto) y el inhibidor del proteasoma puede estar presente en una segunda composición (por ejemplo, adaptada para administración intravenosa, subcutánea u oral a un sujeto). Por ejemplo, cuando el inhibidor del proteasoma es bortezomib, dicha segunda composición puede estar adaptada para inyección intravenosa o subcutánea. En

realizaciones en las que el inhibidor del proteasoma es ixazomib, dicha segunda composición puede estar adaptada adicional o alternativamente para administración oral.

Además, el ADC y el inhibidor del proteasoma puede administrarse en diferentes momentos (por ejemplo, un inhibidor del proteasoma puede administrarse previamente para sensibilizar una célula B maligna al ADC). Por tanto, en una realización adicional, se administran un ADC y un inhibidor del proteasoma a un sujeto en diferentes momentos, dentro de composiciones separadas.

En una realización, se administra un inhibidor del proteasoma antes de un ADC. En una realización, se administra un inhibidor del proteasoma simultáneamente con un ADC. En una realización, se administra un inhibidor del proteasoma secuencialmente a un ADC.

El término "tratar" o "que trata" tal como se usa en la presente abarca tratamiento profiláctico (por ejemplo, para prevenir la aparición de un tumor maligno de células B) así como tratamiento corrector (tratamiento de un sujeto que ya padece un tumor maligno de células B). En una realización, el término "tratar" o "que trata" tal como se usa en la presente significa tratamiento corrector. El término "tratar" o "que trata" abarca tratar tanto el tumor maligno de células B como un síntoma del mismo. En algunas realizaciones, "tratar" o "que trata" se refiere a un síntoma de un tumor maligno de células B.

Por tanto, puede administrarse un medicamento y/o combinación terapéutica a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad del medicamento y/o combinación terapéutica, que cuando se administra sola o en combinación a un sujeto para tratar un tumor maligno de células B (o un síntoma del mismo) es suficiente para efectuar tal tratamiento del tumor maligno de células B, o síntoma del mismo.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" es cualquier cantidad del medicamento y/o combinación terapéutica que, cuando se administra sola o en combinación a un sujeto inhibe o retrasa la aparición o reaparición de un tumor maligno de células B (o un síntoma del mismo). En algunas realizaciones, la cantidad profilácticamente eficaz previene la aparición o reaparición de un tumor maligno de células B totalmente. "Inhibir" la aparición significa o bien disminuir la probabilidad de aparición del tumor maligno de células B (o síntoma del mismo), o prevenir la aparición totalmente.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método *in vitro* para potenciar la supresión por ADC de una célula B maligna, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula B maligna con (a) un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico, en combinación con (b) un inhibidor del proteasoma.

En otro aspecto, se proporciona un método *in vitro* para potenciar la supresión por un inhibidor del proteasoma de una célula B maligna, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula B maligna con (a) un inhibidor del proteasoma, en combinación con (b) un ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BCMA, conjugado con un agente de reticulación de ácido nucleico.

El término "suprimir" o "que suprime" en el contexto de cualquier medicamento, método o uso descrito en la presente abarca "inhibir el crecimiento de", "inhibir la proliferación de" o "destruir" una célula B maligna. La referencia a una "célula B maligna" abarca un "tumor que comprende una célula B maligna".

El término "inhibe" o "que inhibe" son sinónimos con el término "retarda el crecimiento de" o "retrasa la proliferación de" una célula B maligna, o "retrasa el crecimiento de" un tumor que comprende una célula B maligna. En una realización, una combinación terapéutica de la invención puede "destruir" una célula B maligna o "usarse para destruir" una célula B maligna, o tumor que comprende una célula B maligna. El término "suprimir" también abarca prevenir el crecimiento (por ejemplo proliferación) de una célula B maligna, o un tumor que comprende una célula B maligna.

En una realización, una supresión potenciada de un tumor maligno de células B puede comprender uno o más seleccionados de un retraso potenciado en el crecimiento tumoral, una reducción potenciada en el tamaño tumoral, una reducción potenciada en la metástasis tumoral, una tasa de supervivencia potenciada en un sujeto que comprende un tumor maligno de células B, o una combinación de los mismos. En una realización, una supresión potenciada de un tumor maligno de células B comprende uno o más seleccionados de un retraso potenciado en el crecimiento tumoral, una reducción potenciada en el tamaño tumoral, o una combinación de los mismos.

En una realización, un medicamento y/o combinación terapéutica de la invención suprime un tumor maligno de células B en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90% o aproximadamente el 100% más que un medicamento y/o composición por lo demás idénticos que carecen de un inhibidor del proteasoma. En una realización, un medicamento y/o combinación terapéutica de la invención suprime un tumor maligno de células B en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90% o aproximadamente el 100% más que un medicamento y/o composición por lo demás idénticos que carecen de un ADC de la invención.

La supresión puede medirse midiendo la proliferación celular, que puede someterse a ensayo usando técnicas reconocidas en la técnica que miden una tasa de división celular y/o la

fracción de células dentro de una población celular que experimenta división celular, y/o la tasa de pérdida de células de una población celular debido a diferenciación terminal o muerte celular (por ejemplo, incorporación de timidina).

Una evaluación de dicha "supresión potenciada de un tumor maligno de células B" se demuestra por referencia a los ejemplos adjuntos, y puede evaluarse usando la metodología descrita en los ejemplos (por ejemplo, ejemplo 3). Por ejemplo, el ejemplo 3 describe un método que comprende análisis de FMC basado en anexina V/PI, que mide el valor de "% observado de células apoptóticas" en un cultivo *in vitro* de células B malignas tras el contacto con una muestra de prueba. Esto permite la comparación directa de la supresión del tumor maligno de células B entre un medicamento de la invención, y un medicamento por lo demás idéntico que carece de un inhibidor del proteasoma o ADC.

En una realización, se considera que la supresión de un tumor maligno de células B está potenciada cuando el valor de "% observado de células apoptóticas" obtenido para una combinación de los dos compuestos activos principales (por ejemplo, un ADC de la invención y un inhibidor del proteasoma) es mayor que el valor de "% observado de células apoptóticas" obtenido cuando o bien un ADC de la invención, o bien un inhibidor del proteasoma (adecuadamente un inhibidor del proteasoma) está ausente (pero en condiciones por lo demás idénticas).

Por tanto, en una realización, puede determinarse una supresión potenciada de un tumor maligno de células B comparando el valor de "% observado de células apoptóticas" obtenido para una combinación de un ADC de la invención y un inhibidor del proteasoma con el valor de "% observado de células apoptóticas" obtenido para la misma formulación (por ejemplo medicamento) estando ausente un ADC de la invención, o un inhibidor del proteasoma (adecuadamente que carece de un inhibidor del proteasoma) en las mismas condiciones.

En una realización, la presente invención proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B que es de al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% mayor (% observado de células apoptóticas) que un % observado de células apoptóticas proporcionado por la misma formulación (por ejemplo medicamento) estando ausente un ADC de la invención, o un inhibidor del proteasoma (adecuadamente que carece de un inhibidor del proteasoma) en las mismas condiciones. En una realización, la presente invención proporciona una supresión potenciada de un tumor maligno de células B que es de al menos aproximadamente el 65% mayor (% observado de células apoptóticas) que un % observado de células apoptóticas proporcionado por la misma formulación (por ejemplo medicamento) estando ausente un ADC de la invención, o un inhibidor del proteasoma (adecuadamente que carece de un inhibidor del proteasoma) en las mismas condiciones.

En una realización, una combinación de un ADC de la invención y un inhibidor del proteasoma puede presentar supresión sinérgica de un tumor maligno de células B.

El término "sinérgico" tal como se usa en la presente significa que la supresión de un tumor maligno de células B presentada es mayor que la suma de sus partes. En otras palabras, la supresión de un tumor maligno de células B es más que aditiva.

El sinergismo puede medirse determinando el "índice de combinación" (CI) usando herramientas de análisis tales como un programa CompuSyn (ComboSyn, Inc.), en el que un CI de <1 indica sinergismo entre una combinación de los componentes activos principales de la invención, un CI de >1 indica antagonismo y un CI de 1 indica que el efecto es aditivo. Dicho CI puede medirse comparando el rendimiento, en cualquier ensayo de viabilidad celular conocido en la técnica (por ejemplo, alternativa o adicionalmente a la metodología de los ejemplos 1-3, tal como el ensayo de "viabilidad celular basado en CellTiter-Glo" descrito en el ejemplo 3), de una composición que comprende el medicamento / combinación terapéutica de la invención con el rendimiento de una composición por lo demás idéntica que carece de un ADC de la invención, o un inhibidor del proteasoma (adecuadamente que carece de un inhibidor del proteasoma).

En referencia a los ejemplos (por ejemplo, ejemplo 3), la supresión sinérgica de un tumor maligno de células B puede considerarse presente cuando el CI es menor de aproximadamente 0.95, 0.9, 0.85, 0.8, 0.75, 0.7, 0.65, 0.6, 0.55, 0.5, 0.45, 0.4, 0.35, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 o 0.05. En una realización, dicho CI puede ser menor de aproximadamente 0.7. En una realización, dicho CI puede ser menor de aproximadamente 0.6.

En una realización, un "ensayo de viabilidad celular" comprende: incubar una muestra de prueba que comprende células B malignas en presencia de una cantidad de una composición que comprende la combinación terapéutica (un ADC de la invención y un inhibidor del proteasoma); y comparar el número de células no viables (por ejemplo células apoptóticas) en la muestra de prueba posteriormente a la incubación (por ejemplo tras al menos 0.5, 1, 1.5 o 2 días de incubación) con el número de células no viables en una muestra de control incubada en presencia de una composición por lo demás idéntica que carece de (a) dicho inhibidor del proteasoma, o (b) dicho ADC (adecuadamente que carece de dicho inhibidor del proteasoma).

En una realización, la combinación terapéutica se administra a un sujeto. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto mamífero. En una realización, el "sujeto" es un ser humano, un animal de compañía (por ejemplo una mascota tal como un perro, gato y/o conejo), ganado (por ejemplo un cerdo, oveja, res y/o una cabra), y/o un caballo. En una realización, el sujeto es un ser humano.

En métodos de la invención, el sujeto puede no tener un diagnóstico previo de que presenta un tumor maligno de células B. Alternativamente, el sujeto puede tener un diagnóstico previo de que presenta un tumor maligno de células B. El sujeto puede ser también uno que

presenta factores de riesgo de la enfermedad, o uno que es asintomático para un tumor maligno de células B. El sujeto puede ser también uno que padece o corre el riesgo de desarrollar un tumor maligno de células B. En una realización, al sujeto se le ha administrado previamente una terapia para un tumor maligno de células B.

5 En una realización, los métodos y usos de la invención comprenden una o más etapas de administración seleccionadas de oral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal, inhalación, tópica o una combinación de las mismas. En una realización, la administración es una o más seleccionadas de intravenosa, intraarterial (por ejemplo mediante inyección o goteo), subcutánea, o una combinación de las mismas.

10 Preparación de anticuerpos

 Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por expertos en la técnica y su utilidad confirmada mediante estudios de unión convencionales (se describe un método a modo de ejemplo en el ejemplo 2). A modo de ejemplo, un ensayo de unión simple es incubar la célula que expresa un antígeno con el anticuerpo. Si el anticuerpo está etiquetado con un fluoróforo, la unión del anticuerpo al antígeno puede detectarse mediante análisis de FACS.

15 Se describen métodos para generar anticuerpos frente a BCMA y fragmentos de anticuerpos de los mismos de la presente invención en los documentos WO 2010/104949 y WO 2019/025983 (en particular, el documento WO 2019/025983), ambos de los cuales se incorporan en la presente por referencia.

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse en diversos animales incluyendo ratones, ratas, conejos, cabras, oveja, monos o caballos. Los anticuerpos pueden generarse tras la inmunización con polisacáridos capsulares individuales o con una pluralidad de polisacáridos capsulares. La sangre aislada de estos animales contiene anticuerpos policlonales (anticuerpos múltiples que se unen al mismo antígeno). Los antígenos pueden inyectarse también en pollos para la generación de anticuerpos policlonales en yema de huevo. Para obtener un anticuerpo monoclonal que sea específico para un único epítipo de un antígeno, se aíslan linfocitos que secretan anticuerpos de un animal y se immortalizan fusionándolos con una línea celular de cáncer. Las células fusionadas se denominan
25 hibridomas, y crecerán continuamente y segregarán anticuerpos en el cultivo. Las células de hibridoma individuales se aíslan mediante clonación por dilución para generar clones de células que producen todos el mismo anticuerpo; estos anticuerpos se denominan anticuerpos monoclonales. Los métodos para producir anticuerpos monoclonales son técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (véase por ejemplo, Making and Using
30 Antibodies: A Practical Handbook. GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280). Los
35

anticuerpos policlonales y monoclonales se purifican con frecuencia usando cromatografía de afinidad a antígeno o proteína A/G.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede prepararse como anticuerpo monoclonal, que puede prepararse usando métodos de hibridoma, tal como los descritos por Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975). Utilizando el método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, como se describe anteriormente, para provocar la producción de anticuerpos por parte de linfocitos, que se unirán específicamente a un antígeno de inmunización. También pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que se pueden seleccionar a continuación separándolas de los linfocitos no fusionados y de las células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o un ensayo de unión *in vitro*, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), pueden propagarse entonces o bien en cultivo *in vitro* utilizando métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o bien *in vivo* como tumores con ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse a continuación a partir del medio de cultivo o líquido ascítico, utilizando métodos conocidos.

Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, como anticuerpos monoclonales) pueden prepararse también utilizando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o célula de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células huéspedes, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen por lo demás proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células huéspedes. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la especie deseada, a partir de bibliotecas de presentación en fago que expresan las CDR de la especie deseada, como se describe en McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

El (los) polinucleótido(s) que codifica(n) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede(n) modificarse adicionalmente de varias maneras distintas utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, pueden sustituir (1) a aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) a un polipéptido que no es una inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas realizaciones, las regiones constantes están truncadas o eliminadas para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede utilizarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. Se pueden preparar directamente anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido frente a un antígeno diana. Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, J. Immunol. 147 (1):86-95 (1991); patente de los EE. UU. 5.750.373.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse de una biblioteca en fagos, donde esa biblioteca en fagos expresa anticuerpos humanos como se describe, por ejemplo, en Vaughan *et al.*, Nat. Biotech. 14:309-314 (1996); Sheets *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991). Las técnicas para la generación y el uso de bibliotecas de anticuerpos en fagos se describen también en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; y 7.264.963; y Rothe *et al.*, J. Molec. Biol. 376:1182-1200 (2008), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

Se conocen en la técnica estrategias de maduración de la afinidad y estrategias de combinación de cadenas, y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Véase Marks *et al.*, BioTechnology 10:779-783 (1992), incorporado por referencia en su totalidad.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) puede ser un anticuerpo humanizado. También pueden utilizarse, y se conocen bien en la técnica, métodos para diseñar por ingeniería genética, humanizar o acondicionar la superficie de anticuerpos no humanos o humanos. Un anticuerpo humanizado, con la superficie acondicionada o diseñado por ingeniería genética de manera similar puede tener uno o más restos de aminoácido de una fuente que es no humana, por

ejemplo, pero sin limitación, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácido no humanos son reemplazados por restos que se denominan a menudo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio "importado" variable, constante o diferente de una secuencia humana conocida. Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, constante de asociación, constante de disociación, avidez, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. Adecuadamente, los residuos de CDR pueden estar directa y lo más sustancialmente implicados en la influencia de la unión a antígeno (por ejemplo BCMA). Por consiguiente, parte de o todas las secuencias de CDR no humanas o humanas pueden mantenerse preferiblemente, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden reemplazarse con aminoácidos humanos u otros.

Opcionalmente, los anticuerpos también pueden humanizarse, acondicionarse su superficie, modificarse por ingeniería genética o ser anticuerpos humanos modificados por ingeniería genética que conservan una afinidad alta por el antígeno (por ejemplo BCMA) y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, pueden prepararse opcionalmente anticuerpos humanizados (o humanos) o modificados por ingeniería genética y anticuerpos con la superficie acondicionada, mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales, y diversos productos diseñados por ingeniería genética y humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, diseñadas por ingeniería genética y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están habitualmente disponibles y los expertos en la materia están familiarizados ellos. Se puede disponer de programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que afectan a la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno (por ejemplo, BCMA). De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos de la FW a partir de las secuencias consenso e importada, de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana.

La humanización, acondicionamiento de la superficie o modificación por ingeniería genética de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención pueden realizarse utilizando cualquier método conocido tal como, pero sin limitación, los descritos en Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534 (1988); Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993); patente de los EE. UU. N.º 5.639.641, 5.723.323;

5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567, 7.557.189; 7.538.195; y 7.342.110; Solicitudes Internacionales N.º PCT/US98/16280; PCT/US96/18978; PCT/US91/09630; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB89/01334; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; Solicitud de Patente Internacional N.º de Publicación WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; y Patente Europea N.º de Publicación EP 229246; cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad, incluyendo las referencias citadas en ellas.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede prepararse también en ratones transgénicos que contienen locus de inmunoglobulinas humanas que son capaces, tras la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016.

En una realización, se proporciona un fragmento (por ejemplo, fragmento de anticuerpo) del anticuerpo de la invención. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Los términos "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "fragmento funcional de un anticuerpo" y "porción de unión a antígeno" se usan indistintamente en la presente y se refieren a uno o más fragmentos o porciones de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo BCMA) al que se une el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo "completo" o "parental"). Por tanto, la referencia a "fragmento de unión a antígeno del mismo" significa un fragmento de unión a antígeno que se une a BCMA (por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno BCMA del anticuerpo).

De manera tradicional estos fragmentos se obtienen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, como describen, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993) y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985). En una realización, los fragmentos de anticuerpo anti-BCMA se producen de manera recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse en *E. coli* u otras células huéspedes, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpo anti-BCMA pueden aislarse también de las bibliotecas de anticuerpos en fagos comentadas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo anti-BCMA pueden ser también anticuerpos lineales tal como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 5.641.870. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia.

Un anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se proporciona en el presente documento, puede comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo o polipéptido con BCMA. En este sentido, la región variable puede comprender, u obtenerse de, cualquier tipo de mamífero en el que pueda

inducirse la aparición de una respuesta humoral y generarse inmunoglobulinas frente al antígeno deseado. Como tal, la región variable de un anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o de origen lupino. En una realización, tanto la región variable como la constante del anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo son humanas. En una realización, las regiones variables de un anticuerpo compatible (habitualmente derivado de una fuente no humana) se pueden diseñar por ingeniería genética o adaptar de forma específica para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este sentido, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

En una realización, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, están alterados por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR y/o por el reemplazo parcial de la región marco conservada, y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden obtener a partir de la misma clase o incluso subclase del anticuerpo a partir del cual se obtienen las regiones marco conservadas, se contempla que las CDR se obtengan de un anticuerpo de una clase distinta y, en determinadas realizaciones, de un anticuerpo de una especie distinta. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, tan solo es necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de Estados Unidos N.º 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará totalmente dentro de las competencias del experto en la materia llevar a cabo experimentación rutinaria para obtener un anticuerpo funcional con una inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que un anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo de esta invención comprenderá un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de longitud completa o fragmento de unión a antígeno del mismo) en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha deletado o modificado de otra manera para proporcionar características bioquímicas deseadas, tales como un emplazamiento tumoral aumentado o una semivida en suero reducida, en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no modificada. En una realización, la región constante del anticuerpo modificado comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención comprenden adiciones, delecciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más

dominios. Es decir, el anticuerpo modificado divulgado en el presente documento puede comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En una realización, se contempla una región constante modificada donde uno o más dominios se han delecionado de forma parcial o completa. En una realización, un anticuerpo modificado comprenderá variantes o construcciones con dominios delecionados en las que se ha eliminado el dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). En una realización, el dominio de la región constante omitido puede reemplazarse por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 restos) que proporcione parte de la flexibilidad molecular que normalmente confiere la región constante ausente.

Además de la delección de los dominios de la región constante enteros, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento puede modificarse mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos aminoácidos, o incluso de uno solo, en una región constante. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión del Fc y aumentar de este modo la localización tumoral. De manera similar, se puede delecionar total o parcialmente uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión a C1Q del complemento). Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, la semivida en suero) mientras se dejan otras funciones convenientes asociadas con el dominio de la región constante correspondiente intactas. Además, las regiones constantes del anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, que potencie el perfil de la construcción resultante. En este sentido, es posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, puede existir una adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características convenientes, tales como la disminución o el aumento de la función efectora, o proporcionar más unión a citotoxina o hidratos de carbono. En una realización, puede ser conveniente insertar o repetir secuencias específicas obtenidas a partir de dominios de la región constante seleccionados.

La presente invención abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogas a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención (por ejemplo, anticuerpo murino, quimérico, humanizado o humano o fragmentos de unión a antígeno del mismo). Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativas, es decir,

la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se pretende mediante una sustitución conservativa de aminoácido es bien conocido en la técnica.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Estas fracciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquiera de los efectos secundarios convenientes de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión general de estas fracciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

HOMOLOGÍA DE SECUENCIA

Cualquiera de una variedad de métodos de alineamiento de secuencias puede usarse para determinar el porcentaje de identidad, incluyendo, sin limitación, métodos globales, métodos locales y métodos híbridos, tal como por ejemplo métodos de aproximación de segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos rutinarios dentro del alcance de un experto en la técnica. Los métodos globales alinean secuencias desde el comienzo hasta el final de la molécula y determinan el mejor alineamiento sumando puntuaciones de pares de residuos individuales e imponiendo penalización de huecos. Los métodos no limitativos incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, véase, por ejemplo, Julie D. Thompson *et al.*, CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y refinamiento repetitivo, véase, por ejemplo, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los métodos locales alinean secuencias mediante identificación de uno o más restos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Los métodos no limitativos incluyen, por ejemplo, caja de apareamiento, véase, por ejemplo, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501 -509 (1992); muestreo de Gibbs, véase, por ejemplo, C. E. Lawrence *et al.*, Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); alineamiento-M, véase, por ejemplo, Ivo Van Walle *et al.*, Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004).

Por tanto, el porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 y Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de huecos de 10, una penalización de extensión de huecos de 1, y la matriz de puntualización "blosum 62" de Henikoff and Henikoff (*ibid.*) tal como se muestra a continuación (se indican aminoácidos mediante los códigos de una letra convencionales).

El "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos o más secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por tanto, el % de identidad puede calcularse como el número de nucleótidos / aminoácidos idénticos dividido por el número total de nucleótidos / aminoácidos, multiplicado por 100. Los cálculos de % de identidad de secuencia pueden tener en cuenta también el número de huecos y la longitud de cada hueco que se necesita introducir para optimizar el alineamiento de dos o más secuencias. Las comparaciones de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos o más secuencias pueden llevarse a cabo usando algoritmos matemáticos específicos, tal como BLAST, que será familiar para un experto en la técnica.

Los polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan como que tienen una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza minoritaria, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras (véase a continuación) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o actividad del polipéptido; deleciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones del extremo amino o carboxilo terminal, tal como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido ligador de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una etiqueta de afinidad.

SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS CONSERVADORAS

Básica:	arginina
	lisina
	histidina
Ácida:	ácido glutámico
	ácido aspártico
Polar:	glutamina
	asparagina
Hidófoba:	leucina
	isoleucina
	valina

Aromática: fenilalanina
 triptófano
 tirosina
 Pequeña: glicina
 alanina
 serina
 treonina
 metionina

Además de los 20 aminoácidos convencionales, los aminoácidos no convencionales (tal como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de polipéptido. Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender también residuos de aminoácidos que no se producen de manera natural.

Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos que no se producen de manera natural y aminoácidos no naturales pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de polipéptidos de la presente invención.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por escaneo de alanina (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica pueden determinarse también mediante análisis físico de estructura, tal como se determina mediante tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de supuestos aminoácidos de sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, Science 255:306-12, 1992; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales pueden deducirse también a partir de análisis de homologías con componentes relacionados (por ejemplo, los componentes de translocación o proteasa) de los polipéptidos de la presente invención.

Las sustituciones de aminoácidos múltiples pueden realizarse y someterse a ensayo usando métodos conocidos de mutagénesis y cribado, tal como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989). En resumen, estos autores divulgan métodos para la aleatorización simultánea de dos o más posiciones en un polipéptido, selección de polipéptido funcional y después secuenciación de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en

cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner *et al.*, patente de los EE. UU. N.º 5.223.409; Huse, publicación de la WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, Gene 46:145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7:127, 1988).

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido normalmente por una persona normalmente versada en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS
10 DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto en la técnica un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Esta descripción no se limita por los métodos y materiales a modo de ejemplo divulgados en el presente documento, y cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de realizaciones de
15 esta descripción. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha, en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha, en orientación de amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los
20 diversos aspectos o realizaciones de esta descripción.

Los aminoácidos se denominan en el presente documento usando el nombre del aminoácido, la abreviación de tres letras o la abreviación de una sola letra. El término "proteína", tal como se usa en el presente documento, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el
25 término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "enzima". Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente. En la presente descripción y reivindicaciones pueden usarse los códigos de una letra y de tres letras convencionales para residuos de aminoácidos.
30 El código de 3 letras para aminoácidos se define de acuerdo con la IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Debe entenderse que un polipéptido puede codificarse por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Otras definiciones de términos pueden aparecer por toda la memoria descriptiva. Antes de que se describan las realizaciones a modo de ejemplo en más detalle, ha de entenderse que
35 esta descripción no se limita a realizaciones particulares descritas, y como tal puede variar. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene como

objetivo únicamente describir realizaciones particulares y no se pretende ser limitativo, ya que el alcance de la presente divulgación se definirá únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Si se proporciona un intervalo de valores, ha de entenderse que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango también se divulga específicamente. Cualquier intervalo más pequeño entre cualquier valor citado o valor intermedio en un intervalo citado y cualquier otro valor citado o intermedio en ese intervalo citado está englobado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse de manera independiente en el intervalo, y cualquier intervalo donde cualquier, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también se engloba dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo citado. Si el intervalo citado incluye uno de o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos también se incluyen en esta descripción.

Debe señalarse que, tal como se utiliza en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto claramente dictamine de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una citotoxina" incluye una pluralidad de tales citotoxinas y la referencia a "la citotoxina" incluye la referencia a una o más citotoxinas y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento ha de interpretarse como una admisión de que tales publicaciones constituyen técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas a esto.

EJEMPLOS

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo solo, con referencia a los siguientes ejemplos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de anticuerpos anti-BCMA

Se generaron anticuerpos tal como se describe en los documentos WO 2010/104949 y WO 2019/025983, ambos de los cuales se incorporan en la presente por referencia. Se generaron anticuerpos adecuados tal como se describe en Kinneer *et al* (2018), Leukemia 33, 766-771 y el documento WO 2019/025983.

Generación de ADC anti-BCMA

Se preparó un ADC anti-BCMA (un anticuerpo anti-BCMA conjugado con PBD se denomina en la presente "M2") a través de conjugación específica de sitio del dímero de PBD,

tesirina (SG3249), con el anticuerpo BCMA-Ab1 descrito en Kinneer *et al* (2018), Leukemia 33, 766-771 ("Kinneer *et al* (2018)"), usando un ligador escindible por proteasa, tal como se describió anteriormente (véase por ejemplo Kinneer *et al* (2018); incorporado en la presente por referencia). Un ejemplo de anticuerpo frente a BCMA es BCMA-Ab2, también descrito en Kinneer *et al* (2018). Dichos anticuerpos se describen además en el documento WO 2019/025983 (incorporado en la presente por referencia) como 15B2GL y J6M0-mc, respectivamente. El ADC "M3" se generó de manera similar uniendo una carga útil de monometilauristatina F (MMAF) al anticuerpo BCMA-Ab1. Ambas cargas útiles se conjugaron de manera específica de sitio con una cisteína modificada por ingeniería genética insertada después de la posición 239 (C239i) en el dominio CH2 del anticuerpo frente a BCMA, tal como se describió anteriormente. En resumen, el BCMA-Ab1 se redujo con un exceso molar de 40 de TCEP durante tres horas a 37°C seguido por tres diálisis sucesivas para eliminar el TCEP. Entonces se oxidó el anticuerpo con un exceso molar de 20 de DHAA durante cuatro horas a temperatura ambiente y se conjugó usando una equivalente molar de ocho de la carga útil. Tras la conjugación, la carga útil libre y el agregado proteico se eliminaron mediante purificación con hidroxipatita cerámica.

Modelo de xenoinjerto murino de MM humano

Se aprobaron experimentos con animales según y de conformidad a las normas regulatorias relevantes del Comité Institucional de Uso y Cuidado de animales en el Dana-Farber Cancer Institute. A ratones CB-17 SCID se les inoculó por vía subcutánea 5.0×10^6 células MM.1S en 100 μ l de medio RPMI 1640 libre de suero. Cuando fueron medibles tumores aproximadamente 3 semanas después de la inyección de células MM, se aleatorizaron los ratones (8 ratones/grupo) y se trataron con vehículo solo, M2, btz, o M2 con btz. Se midió el tamaño tumoral cada tres días en 2 dimensiones usando calibres, y se calculó el volumen tumoral usando la siguiente fórmula: $V = 0.5a \times b^2$, donde "a" y "b" son el diámetro largo y corto del tumor, respectivamente. Se sacrificaron los animales cuando sus tumores alcanzaron 2 cm³.

Análisis de tumores recogidos de los ratones usando inmunotransferencia e inmunotinción

Tras el tratamiento de 3d, se recogió un tumor de cada grupo y se prepararon lisados celulares para la inmunotransferencia. Se sometieron secciones de tumores recogidos de los ratones a tinción inmunohistoquímica para determinar la proliferación mediante Ki67 (BCR CRM325). Se tomaron imágenes inmunohistoquímicas en un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss para Ki67. Se usó una lente objetivo Plan-Apochromat 63X/1.40 Oil DIC M27.

Células y cultivo celular

Se cultivaron líneas celulares de MM en RPMI que contenía suero bovino fetal al 10% (GIBCO, 10437028), L-glutamina 2 mM/L, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL

(GIBCO, 15140122). Se comprueban rutinariamente mediante el servicio Human STR Profiling Cell Authentication para determinar su autenticidad y para detectar contaminación por microplasma. Se obtuvieron muestras de donantes normales y MM de pacientes tras proporcionarse el consentimiento informado, según la Declaración de Helsinki y bajo los auspicios de un protocolo aprobado por la Junta de revisión institucional del Dana-Farber Cancer Institute. Se purificaron células plasmáticas CD138+ primaria (> 95% de pureza) a partir de células mononucleares de médula ósea (BMMC) de aspirados de BM de pacientes con MM usando microperlas anti-CD138 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Se cultivaron además BMMC negativas para CD138 residuales para derivar BMSC. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de PB usando gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Se adquirió Bortezomib de Selleckchem (Selleck Chemicals).

Ensayo de viabilidad celular y apoptosis

Se analizó la viabilidad celular mediante CCK8 (Abcam, Cambridge, MA), CellTiter-Glo (CTG) (Promega) y medición de BLI. Se evaluó la apoptosis mediante análisis de citometría de flujo tras la tinción con FITC anexina-V (BD Biosciences), PE-anexina-V (BioLegend) y/o LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (Invitrogen, L34957), según las instrucciones del fabricante. Se marcaron células de MM con CFSE (Invitrogen), y luego se cultivaron durante 2 días, solas o con BMSC, seguido por tinción con anexina V/Aqua y análisis de citometría de flujo.

Ensayo de proliferación de luciferasa

Se sembraron BMSC en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas para permitir que las células se adhirieran. Se cultivaron células MM1S-luc a una razón de 100:1 sobre capas confluentes de BMSC en medio RPMI durante 4d. Se midió la proliferación usando el ensayo de luciferasa, según el protocolo del fabricante (Promega, Madison, WI).

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos tres veces, y los datos se representan como media $\pm$ DE. Se analizaron los datos usando pruebas de la t de Student para comparaciones de 2 grupos o un análisis de la varianza de 1 vía (ANOVA) para comparaciones múltiples usando el software Graphpad (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Un valor de $p < 0.05$ era estadísticamente significativo. Se evaluaron las interacciones farmacológicas mediante el software CompuSyn para determinar el índice de combinación (CI). $CI < 1$ indica sinergismo mientras que $CI > 1$ antagonismo y $CI = 1$ efecto aditivo.

EJEMPLO 1

Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran que un conjugado de anticuerpo anti-BCMA-PBD (M2) induce una citotoxicidad más potente contra células de MM resistentes a fármacos que su homólogo de ADC de MMAF (M3).

La citotoxicidad de un ADC compuesto por un anticuerpo anti-BCMA conjugado con una PBD (M2) se comparó con la citotoxicidad de su homólogo de ADC de MMAF (M3) contra un panel de líneas celulares de MM con diversos niveles de expresión de BCMA y respuesta a fármacos anti-MM actuales. Ambos ADC se componen del mismo AcM anti-BCMA (BCMA-Ab1 / 15B2GL, tal como se describió anteriormente) pero están conjugados con diferentes cargas útiles: una PBD de reticulación del ADN para M2 (por ejemplo tesirina), y una MMAF de unión a microtúbulos para M3. Usando el ensayo de viabilidad basado en CCK8 de 3d, los valores de ED₅₀ de M2 son inferiores a los de M3 en todas las líneas celulares de MM sometidas a prueba (n=10), independientemente de la sensibilidad a terapias anti-MM incluyendo dexametasona e IMiD (FIG. 1A, FIG. 3A). En 8 líneas celulares de MM, sin incluir RPMI8226 (RPMI) y su RPMI-BCMA derivada que sobreexpresa BCMA, los valores de ED₅₀ oscilan entre 11.85 y 3499 ng/ml y 21.28 y 271431 ng/ml para M2 y M3, respectivamente. Todas las células de MM albergan diversas mutaciones de p53, excepto las células MM1S y H929 de las cuales se derivan dos células MM1S(R) y H929(R) resistentes a IMiD, respectivamente. M2, pero no M3, es citotóxica para células RPMI8226 que expresan los niveles más bajos de BCMA y resistencia a IMiD (FIG. 1A-B). Usando un ensayo de síntesis de ADN, M2 muestra mayor potencia (>1-2-log) que M3 en el bloqueo de la proliferación de todas las células de MM (FIG. 1B, FIG. 3B). Por ejemplo, las ED₅₀ para M2 frente a M3 son de 189.7 frente a 21427 ng/ml en células RPMI8226. Además, M2, pero no M3, disminuyó la viabilidad de tanto ANBL6 como sus células ANBL6-BR derivadas resistentes a bortezomib (btz) (FIG. 3C) cultivadas con IL-6. Estas células ANBL6 dependientes de IL-6 emparejadas son insensibles a M3 y expresan proteína BCMA de membrana celular comparable como las células RPMI8226 (datos no mostrados). Por tanto, células de MM con expresión de BCMA relativamente inferior son también significativamente más susceptibles a M2 frente a M3.

Usando análisis de citometría de flujo (FCM) tras la tinción con anexina V y Aqua viva/muerta, se mostró que M2 induce una apoptosis más temprana y aumentada en líneas celulares de MM emparejadas sensibles o resistentes a dexametasona (dex) o bortezomib (btz) de una manera dependiente de la dosis y el tiempo, en comparación con M3 (FIG. 1C, FIG. 3D). Estos resultados *in vitro* indican que M2 supera la resistencia a fármacos anti-MM actuales (dexametasona, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib) en un mayor grado que M3 en células de MM, independientemente de los niveles de BCMA y el estado de p53.

EJEMPLO 2

Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran que M2 es más eficaz que M3 en la inducción de citotoxicidad contra células de MM en el microentorno de la médula ósea y células de MM del paciente.

A continuación, se evaluaron los efectos de M2 y M3 sobre células de MM cocultivadas con células estromales de la médula ósea (BMSC) e IL-6, que promueven el crecimiento, la supervivencia y la resistencia farmacológica de las células de MM. Usando medición de BLI, se mostró que las BMSC aumentan significativamente el crecimiento y la supervivencia de células MM1Sluc (FIG. 4A). En ensayos basados en BLI y CTG, M2, de manera más potente que M3, inhibe la viabilidad de MM1Sluc y todas las demás líneas celulares de MM sometidas a prueba (n=6) cocultivadas con BMSC (FIG. 2A, FIG. 4A), con un impacto mínimo sobre subconjuntos de células que no son de MM negativas para BCMA, incluyendo BMSC, PBMC y células NK (FIG. 4B). Usando análisis de FCM para identificar células de MM viables, M2, de manera más eficaz que M3, disminuye la supervivencia de células MM1S(R) y H929(R) resistentes a IMiD, incluso en presencia de BMSC (FIG. 2B). En análisis cuantitativos basados en FCM (FIG. 2C) y CTG (FIG. 4C), M2 redujo el crecimiento y la supervivencia de células de MM H929 en presencia o ausencia de IL-6.

Tras el tratamiento de 3d, se cuantificaron las fracciones de células de BM CD138+ vivas o muertas de pacientes con RRMM mediante análisis de FCM. De manera importante, M2, de una manera dependiente de la dosis, aumentó (>2 veces) las células de MM de pacientes CD138+ apoptóticas en comparación con M3 (FIG. 4D). En ensayos basados en CTG, M2 también mostró toxicidad dependiente de la dosis en células de BM purificadas con CD138 a partir de 3 pacientes adicionales con RRMM (FIG. 2E), así como agota de manera significativa células de BM CD38altoCD138+ viables de 4 pacientes con diagnóstico reciente de MM (NDMM) (FIG. 2F, izquierda, FIG. 4D) y 2 pacientes con RRMM (FIG. 2F, derecha). Estos datos indican que M2 agota células de MM del paciente independientemente del estado de la enfermedad y es significativamente más citotóxica para las células de MM en el microentorno de la BM que M3.

EJEMPLO 3

Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran que M2, combinada con bortezomib, induce citotoxicidad sinérgica contra células de MM *in vitro* e *in vivo*.

Se eligió bortezomib (btz) como coterapia candidata para M2, ya que btz es una terapia contra el mieloma existente. El análisis de FMC basado en anexina V/PI, combinado con M2 y btz a dosis bajas durante 2d, potencia adicionalmente la apoptosis en células JJN3 y RPMI8226, en comparación con cualquier agente solo (FIG. 5A-B, $p<0.01$). También se observa muerte celular significativamente aumentada tras los tratamientos combinados en células ANBL6-BR resistentes a btz cultivadas en IL-6 (apoyando la observación de que la adición de btz proporciona un efecto que es más que aditivo). A continuación, se analizaron los resultados de los ensayos de viabilidad basados en CTG para calcular los índices de combinación (CI). Se

derivaron $CI < 1$ en más de 6 células de MM representativas, indicando efectos sinérgicos de M2 más btz (FIG. 5C, FIG. 6).

A continuación se evaluó la eficacia *in vivo* de dosis subóptimas de M2 con btz en el modelo de ratón con xenoinjerto de MM1S. Se aleatorizaron ratones con tumores MM1S palpables en 4 grupos que recibieron o bien control de vehículo, un único tratamiento de M2 o bien 6 tratamientos de btz (0.4 mg/kg) solo o con M2. A los 24d después del tratamiento, una sola dosis de M2 o un total de 6 dosis de btz retrasan significativamente el crecimiento tumoral de MM1S en los ratones, en comparación con el control de vehículo (FIG. 7A, $p < 0.005$). El tratamiento de combinación disminuyó significativamente el volumen tumoral frente a cualquier agente individual solo ($p < 0.04$). El tratamiento con M2 más btz se toleró bien, puesto que no se vio afectado el peso corporal de todos los animales (FIG. 7B). El seguimiento durante 177d muestra una prolongación significativa en la mediana de la supervivencia global en el grupo tratado con la combinación frente a las cohortes tratadas con cualquier agente solo (cnt, 22d; M2, 40.5d; btz, 35d; M2+btz, 57d) ($p < 0.045$) (FIG. 7C). A los 177d, el 15% de los ratones estaban todavía vivos sin ningún crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación.

La inmunohistoquímica (IHC) para Ki67 (un marcador celular de proliferación) confirmó además una potente inhibición de la proliferación tras el tratamiento combinado frente a agente individual (FIG. 7D) (obsérvese el número reducido de células teñidas (color oscuro) en el tratamiento con M2+btz).

Los tratamientos combinados con M2 y btz disminuyeron significativamente el crecimiento *in vivo* de xenoinjertos de MM1S (FIG. 8), demostrando el sinergismo *in vivo* de M2 y btz en el tratamiento del mieloma.

Como conclusión, la actividad sinérgica de M2 con btz observada *in vitro* al nivel celular se traduce en una eficacia *in vivo* superior en el modelo de plasmacitoma de MM.

DISCUSIÓN DE LOS EJEMPLOS 1-3

La reaparición de la enfermedad debido a resistencia farmacológica sigue siendo un importante obstáculo para una supervivencia más prolongada en MM. Por tanto, se necesitan terapias novedosas para superar la resistencia farmacológica y abordar la necesidad médica no satisfecha en RRMM. En la presente, los inventores muestran por primera vez que un ADC (M2; un anticuerpo anti-BCMA conjugado con una PBD) tiene una citotoxicidad superior contra todas las líneas celulares de MM sometidas a prueba y células de MM del paciente que su homólogo de ADC de MMAF. Los dímeros de PBD provocan muerte celular tanto en células en división rápida como células más quiescentes, a diferencia de MMAF que selecciona como diana predominantemente células tumorales proliferativas por medio de unión a tubulina. M2 provoca un efecto más potente sobre la proliferación de células de MM que su homólogo de ADC de MMAF, incluyendo células con bajos niveles de expresión de BCMA y resistencia a las terapias

actuales, incluso en presencia de BMSC e IL-6. Estos datos sugieren que M2 puede ser más eficaz que su homólogo de ADC de MMAF en el tratamiento de MM agresivo.

De manera importante, un tratamiento combinado de M2 y btz induce *in vitro* muerte sinérgica de todas las células de MM sometidas a prueba, tal como se demuestra por un CI < 1. De manera notable, M2 produce sinergia con btz incluso en células ANBL6-BR resistentes a btz, indicando que otras moléculas no definidas son también responsables de la citotoxicidad potenciada.

En ratones que llevan tumores MM1S, M2 es significativamente más eficaz que btz como terapia con agente individual. De manera importante, la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* se potencia además cuando se combina M2 con btz. Se observa una necrosis tumoral significativa más temprano en ratones que reciben ambos fármacos que cualquier agente solo, y a los 177d, el 15% de los ratones en el grupo de tratamiento de combinación siguen vivos y sin tumor. De manera importante, no se observa pérdida de peso en todos los grupos, indicando un perfil de seguridad favorable de M2 *in vivo*, lo que sugiere que el tratamiento de combinación de M2 y btz podría administrarse de manera segura *in vivo*.

En resumen, M2 desencadena específicamente una potente inhibición del crecimiento y muerte, incluso en células de MM resistentes a las terapias contra el MM actuales y protegidas por el microentorno de la BM. *In vivo*, M2 es más eficaz que btz, y la combinación de M2 con btz potencia además la eficacia y prolonga la supervivencia del huésped.

EJEMPLO 4

Los resultados de los experimentos reflejados en este ejemplo demuestran que M2 activa significativamente la respuesta al daño en el ADN y cascadas de señalización de la reparación, seguido por apoptosis, en células de MM sensibles a fármacos y resistentes a fármacos.

Se usó análisis de inmunotransferencia para determinar la inducción de cascadas de señalización de respuesta al daño en el ADN (DDR) desencadenadas por M2 en líneas celulares de MM de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. M2, pero no M3, induce la fosforilación de ATM, cinasa 1 de punto de control del ciclo celular (CHK1) y CHK2 (CHK1/2), así como histona 2AX (H2AX), un acontecimiento temprano en la respuesta a la rotura bicatenaria (DSB) del ADN (Figs. 9A y 10A). Se detecta fosforilación estimulada por M2 de ATM y CHK1/2 a las 4 h y se mantiene durante >1d tras el tratamiento. Se observó una activación más temprana y más pronunciada de ATM y CHK1/2 desencadenada por M2 en células H929 que expresan niveles de BCMA significativamente más altos que células MM1S (Fig. 10A, C). La intensidad de la fosforilación de ATM y CHK1/2 inducida por M2 también se correlacionó con los niveles de BCMA derivados de las células de MM RPMI8226 parentales (Fig. 10D). La fosforilación de ATM y CHK1/2 inducida por M2 se produce en un grado

significativamente mayor que la fosforilación de ATR, en células de MM sometidas a prueba. Tras el tratamiento de 2d con M2, se induce la escisión de PARP (cPARP) y caspasa 3 (cCas3) de una manera dependiente de BCMA (Fig. 10B, E-F), asociada con un aumento de la fosforilación de H2AX (γ H2AX) (Fig. 10B), indicando que M2 induce daños en el ADN seguido por apoptosis en células de MM. De manera importante, M2 induce, de manera dependiente de la dosis, la fosforilación de ATM y CHK1/2 en todas las células de MM, incluyendo 6 líneas celulares con mutaciones de p53 (Fig. 9b-c). En las mismas condiciones de tratamiento que M2, M3 no induce ni ATM/ATR ni CHK1/2 (Fig. 10A). M2 es más eficaz que M3 en la inducción de cPARP y cCas3 (Fig. 10F), consecuente con su mayor potencia que M3 en el desencadenamiento de la apoptosis de células de MM. De manera significativa, M2 desencadenó rutas de señalización de ATM/ATR y CHK1/2 aguas abajo, la escisión de γ H2AX y PARP en ANBL6 y las células ANBL6-BR resistentes a btz emparejadas (Fig. 9c). También se observa una activación prominente de ATM y CHK1/2 por M2 en células H929(R) resistentes a IMiD en un grado similar que las células de MM H929 parentales (Fig. 9d). Por tanto, en células de MM resistentes a btz y len, M2 todavía induce rutas de señalización de DDR dependientes de BCMA por medio de la activación de la cascada de señalización de ATR/ATM-CHK1/2, seguido por apoptosis.

El análisis del alineamiento TagMan® del mecanismo de reparación del ADN muestra que M2 cambia la expresión de los genes asociados a la reparación del daños en el ADN (51 de 72) en células de MM H929 (Fig. 11a). En diversas células de MM sensibles y resistentes a fármacos (n>6), M2, de un modo dependiente de la dosis, induce RAD51, que se une a ICL de ADN antes de que se genere una DSB (Fig. 11b-c), mientras que M3 no (Fig. 10G). Por tanto, en células de MM, M2 activa específicamente cascadas de señalización de DDR mediadas por ATM/ATR-CHK1/2 e induce que moléculas relacionadas con DDR aguas abajo se asocien con γ H2AX y RAD51 aumentados, seguido por apoptosis.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en el presente documento por referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos descritos y sistema de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance ni la naturaleza de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse de manera indebida a tales realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados se pretenden que se encuentren en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

SECUENCIAS

	Identificador	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	CDR1 de cadena pesada (HCDR1)	SYSMN	1
	HCDR2	SISGSSNYIYYADSVKG	2
	HCDR3	GGNYVEYFQY	3
10	CDR1 de cadena ligera (LCDR1)	RASQYISSNYLA	4
	LCDR2	GASNRAT	5
	LCDR3	QQYGSSPIT	6
15	VH (de línea germinal)	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFRSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQYWGQGTLV TVSS	7
20	VL (de línea germinal)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	8
25	VH (WT)	EIQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFRSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTALYYCARGGNYYVEYFQYWGQGTLV VSS	9
30	VL (WT)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTGFTLTISRLEP EDFAVFYCQQYGSSPITFGQGTKLEIK	10
35	región constante de cadena pesada: (inserción de cisteína subrayada):	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	11

Cadena ligera kappa humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	12
5 Secuencia de BCMA humano; UniProtKB - Q02223	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQR YCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKIN SEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYT VEECTCEDCIKSKPKVDSDDHCFPLPAMEEGATILVTTKTN DYCKSLPAALSATEIEKSISAR	13

10

15

20

25

30

35