

ANTICUERPOS ANTI-BCMA**CAMPO DE LA INVENCION**

Esta divulgación se refiere a nuevos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), y a métodos de uso de estos.

5

ANTECEDENTES

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) es un miembro de la familia de receptores de necrosis tumoral (TNFR) y se expresa en células del linaje de linfocitos B. La expresión de BCMA es la más alta en los linfocitos B terminalmente diferenciados y está involucrada en la mediación de la supervivencia de las células plasmáticas para mantener la inmunidad humoral a largo plazo. La expresión de BCMA se ha relacionado con una serie de cánceres y neoplasias malignas de células plasmáticas, tales como el mieloma múltiple (MM). Varios investigadores han detectado ARN universalmente en células de mieloma múltiple, y han detectado la proteína BCMA en la superficie de células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple. En este sentido, se ha investigado BCMA como una posible diana terapéutica para el mieloma múltiple.

Por consiguiente, en la técnica se necesita disponer de composiciones que puedan utilizarse en métodos para tratar el mieloma múltiple.

COMPENDIO

La presente memoria descriptiva proporciona anticuerpos anti-BCMA y fragmentos de unión a antígeno de estos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo, en donde el dominio VH comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y el dominio VL comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX¹SSTGX²VTPX³X⁴YAN (SEQ ID NO: 25), en donde X¹ es R o A, X² es T o A, X³ es S o G, y X⁴ es N o Y, una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX⁵X⁶PP (SEQ ID NO: 26), en donde X⁵ es S, I o N y X⁶ es R o K, y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 27), en donde X⁷ es W o Y, X⁸ es F o Y, y X⁹ es N o G.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5), CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 6) o

CASSTGAVTPGYYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), DNNIKPP (SEQ ID NO: 10) o DNNNKPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13), ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 14) o ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15).

5 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que es al menos aproximadamente un 90 % idéntico o al menos un 95 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y un dominio VL que es al menos aproximadamente un 90 % idéntico o al menos un 95 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

10 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

15 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, y SEQ ID NO: 24.

20 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

25 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

35 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene una cadena pesada que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

5 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ
10 ID NO: 5), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprenden una cadena pesada que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 %
15 idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una
20 cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

30 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

35 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 6), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNIKPP (SEQ ID NO: 10), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 14).

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNNKPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15).

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera del anticuerpo que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo multiespecífico.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa que comprenden una región Fc.

En determinadas realizaciones ilustrativas, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana.

En determinadas realizaciones ilustrativas, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión. En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona una célula hospedadora que es una célula de mamífero.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un método para preparar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este, que comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica tal como se proporciona en el presente documento.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica tal como se proporciona en el presente documento.

5 En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno de células plasmáticas, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica tal como se proporciona en el presente documento.

En determinadas realizaciones ilustrativas, en el presente documento se proporciona un método para tratar mieloma múltiple en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este.

10 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es para su uso como medicamento.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno.

15 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer.

En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de mieloma múltiple.

20 En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una neoplasia maligna de células plasmáticas.

El compendio de la divulgación descrito anteriormente es no limitante y otras características y ventajas de las proteínas de unión a antígeno y los métodos divulgados serán evidentes a partir de la siguiente breve descripción de los dibujos, descripción detallada de la divulgación y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Lo anterior y otras características y ventajas de la presente invención se comprenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomadas en conjunto con los dibujos adjuntos. Este archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o de solicitud de patente con dibujo(s) en color tras la solicitud y el pago de las tasas necesarias.

30 **FIG. 1A:** muestra las siete variantes del dominio VL del anticuerpo anti-BCMA y su porcentaje de identidad de secuencia respecto a VL de la línea germinal humana.

FIG. 1B: muestra la alineación de secuencias del dominio VL original y las siete variantes del dominio VL.

35 **FIG. 1C:** muestra la alineación de secuencias del dominio VL original de CA10 con el dominio VL de la línea germinal humana.

FIG. 2: es una tabla que muestra la expresión y pureza de las variantes de anticuerpos anti-BCMA. La pureza se determinó utilizando SDS-PAGE y SEC.

FIG. 3: muestra la reactividad cruzada de las variantes del clon CA10 respecto a las proteínas BCMA humanas y de macaco cangrejero.

FIG. 4: muestra la unión entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y las proteínas BCMA en las superficies de la membrana de células HEK.

FIG. 5A – FIG. 5B: muestran la unión entre las variantes de anticuerpos mAb anti-BCMA (**FIG. 5A**) y el anticuerpo original (**FIG. 5B**) con proteínas BCMA en las superficies de la membrana de células MM1R.

FIG. 6: muestra los sensorgramas y las constantes de afinidad entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y la proteína humana BCMA Avi-His.

FIG. 7: muestra los sensorgramas y las constantes de afinidad entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y la proteína humana BCMA DTA-His.

FIG. 8: muestra los sensorgramas y las constantes de afinidad entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y la proteína de macaco cangrejero BCMA Avi-His.

FIG. 9: muestra los sensorgramas y las constantes de afinidad entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y la proteína de macaco cangrejero BCMA DTA-His.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente divulgación, debe entenderse que la divulgación no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

Si bien se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente divulgación, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia para describirlas en su totalidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "BCMA" se refiere al antígeno de maduración de linfocitos B. BCMA (que también se conoce como TNFRSF17, BCM o CD269) es un miembro de la familia de receptores de necrosis tumoral (TNFR) y se expresa predominantemente en linfocitos B terminalmente diferenciados, p. ej., linfocitos B de memoria y células plasmáticas. Su ligando se denomina activador de linfocitos B de la familia de TNF (BAFF) y ligando inductor de la proliferación (APRIL). BCMA está involucrado en la mediación de la supervivencia de las células plasmáticas para mantener la inmunidad humoral a largo plazo. El gen para BCMA está codificado en el cromosoma 16 y produce un transcrito primario de ARNm de 994 nucleótidos de longitud (acceso de NCBI NM_001192.2) que codifica una proteína de 184 aminoácidos (NP_001183.2). Se ha descrito un segundo transcrito antisentido derivado del locus de BCMA, que puede desempeñar una función en la regulación de la expresión de BCMA (Laabi Y. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22:1147-1154). Se han descrito variantes

de transcritos adicionales de transcendencia desconocida (Smirnova A S *et al. Mol Immunol.*, 2008, 45(4):1179-1183). Se ha identificado una segunda isoforma, también conocida como TV4 (identificador de Uniprot Q02223-2). Tal como se utiliza en el presente documento, "BCMA" incluye proteínas que comprenden mutaciones, p. ej., mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de corte y empalme de BCMA de origen natural de longitud completa.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo" o "proteína de unión a antígeno" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o reacciona inmunológicamente con, un antígeno o epítipo (p. ej., un antígeno o epítipo de BCMA), e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de anticuerpos funcionales de estos, que incluyen, sin carácter limitante, fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinantes (rIgG), fragmentos variables de cadena única (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (p. ej., sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término "anticuerpo" incluye formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente o modificadas de otra manera, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos con mediotopos habilitados, anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, di-scFv tándem, tri-scFv tándem) y similares. A menos que se indique lo contrario, se debe entender que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales de este. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo funcional" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de afinidad respecto al anticuerpo de interés del cual deriva el fragmento.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de un anticuerpo, que confieren especificidad por el antígeno y afinidad de unión. En general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). En la técnica se sabe que las "regiones marco" o "FR" se refieren a las porciones que no son CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. En general, hay cuatro FR en cada región variable de cadena pesada (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4), y cuatro FR en cada región variable de cadena ligera (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4).

Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR determinada se pueden determinar fácilmente utilizando cualquiera de una serie de esquemas muy conocidos, que incluyen los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5.^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273, 927-948 (esquema de numeración de "Chothia"), MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," *J. Mol. Biol.* 262, 732-745 (esquema de numeración de "Contact"), Lefranc M P *et al.*, "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", *Dev Comp Immunol*, enero de 2003; 27(1):55-77 (esquema de numeración de "IMGT"), y Honegger A y

Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", *J Mol Biol*, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, (esquema de numeración de AHo).

Los límites de una CDR o FR determinada pueden variar dependiendo del esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema de Kabat se basa en alineaciones estructurales, mientras que el esquema de Chothia se basa en información estructural. La numeración para los esquemas de Kabat y Chothia se basa en las longitudes de las secuencias de regiones de anticuerpo más comunes, con las inserciones incorporadas mediante letras de inserción, por ejemplo, "30a", y deleciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan ciertas inserciones y deleciones ("indeles") en diferentes posiciones, lo que da como resultado una numeración diferente. El esquema de Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia.

Debe entenderse que una "CDR" o "región determinante de complementariedad", o CDR especificadas individuales (p. ej., "CDR-H1", "CDR-H2", "CDR-H3"), de un anticuerpo determinado o región de este, tal como una región variable de este, abarcan una región determinante de complementariedad (o la región específica) tal como se define mediante cualquiera de los esquemas conocidos. Del mismo modo, debe entenderse que una "FR" o "región marco", o FR especificadas individuales (p. ej., "FR-H1", "FR-H2"), de un anticuerpo determinado o región de este, tal como una región variable de este, abarcan una región marco (o la región específica) tal como se define mediante cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos, se especifica el esquema para la identificación de una CDR o FR particular, tal como la CDR definida por el método de IMGT, Kabat, Chothia, AbM o Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR o FR. A menos que se especifique lo contrario, todas las secuencias de aminoácidos de CDR particulares mencionadas en la divulgación son CDR de IMGT. Sin embargo, la presente divulgación también abarca CDR alternativas definidas por otros esquemas, tales como las determinadas por abYsis Key Annotation (sitio web: abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi).

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. No obstante, los mAb de la divulgación pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular en la CDR3. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, incluya mAb en los cuales secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (p. ej., ratón) se hayan injertado en secuencias FR humanas. La expresión incluye anticuerpos producidos recombinantemente en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. No se pretende que la expresión incluya anticuerpos aislados a partir de un sujeto humano o generados en un sujeto humano.

La expresión "moléculas de unión a antígeno multiespecíficas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de unión a antígeno biespecíficas, triespecíficas o multiespecíficas, y

fragmentos de unión a antígeno de estas. Las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas pueden ser específicas para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para epítomos de más de un polipéptido diana. Una molécula de unión a antígeno multiespecífica puede ser un solo polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están asociados covalente o no covalentemente entre sí. La expresión "moléculas de unión a antígeno multiespecíficas" incluye anticuerpos de la presente divulgación que pueden estar unidos o coexpresarse con otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este puede estar unido funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares distintas, tales como una proteína o fragmento de esta para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica o multiespecífica con una segunda especificidad de unión. De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "moléculas de unión a antígeno multiespecíficas" también incluye anticuerpos biespecíficos, trisespecíficos o multiespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos. En determinadas realizaciones ilustrativas, un anticuerpo de la presente divulgación está unido funcionalmente a otro anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para producir un anticuerpo biespecífico con una segunda especificidad de unión.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "se une específicamente", "uniéndose específicamente", "especificidad de unión" o "reconoce específicamente" se refiere a que una proteína de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de esta exhibe una afinidad apreciable por un antígeno (p. ej., un antígeno de BCMA) y no exhibe una reactividad cruzada significativa con una diana que no es una proteína BCMA. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de la interacción entre una proteína de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de esta y el epítipo al que se une. En determinadas realizaciones ilustrativas, la afinidad se mide mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), p. ej., en un instrumento Biacore. Como comprenden fácilmente los expertos en la técnica, la afinidad de una proteína de unión a antígeno se puede indicar como una constante de disociación (KD) en molaridad (M). La proteína de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de esta de la divulgación tiene valores de KD en el intervalo de aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M (es decir, en el intervalo de micromolar bajo a picomolar), de aproximadamente 10^{-7} M a 10^{-11} M, de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-10} M, de aproximadamente 10^{-9} M. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de esta tiene una afinidad de unión de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de esta tiene una afinidad de unión de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente 10^{-9} M (intervalo nanomolar).

La unión específica se puede determinar de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar tal unión. En algunas realizaciones, la unión específica se determina mediante ensayos de unión competitiva (p. ej., ELISA) o ensayos Biacore. En determinadas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo a aproximadamente 20 °C, 25 °C, 30 °C o 37 °C.

Tal como se utiliza en el presente documento, "administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o suministrar físicamente de otro modo una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (p. ej., un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento) a un paciente, tal como, pero sin carácter limitante, mediante un suministro pulmonar (p. ej., inhalación), mucoso (p. ej., intranasal), intradérmico, intravenoso, intramuscular y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando una enfermedad, o un síntoma de esta, se está tratando o gestionando, la administración de la sustancia normalmente se realiza después del inicio de la enfermedad o de los síntomas de esta. Cuando se está previniendo una enfermedad, o un síntoma de la esta, la administración de la sustancia normalmente se realiza antes del inicio de la enfermedad o de los síntomas de esta y puede continuarse de forma crónica para aplazar o reducir la aparición o magnitud de los síntomas asociados a la enfermedad.

Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término "composición" abarque un producto que contiene los ingredientes especificados (p. ej., un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en, opcionalmente, las cantidades especificadas.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo (p. ej., un polipéptido de unión aislado de la presente divulgación) suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesite el agente. La cantidad eficaz puede variar entre individuos dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la afección médica del individuo y otros factores relevantes.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de forma indistinta. Tal como se utiliza en el presente documento, un sujeto puede ser un mamífero, tal como uno que no sea un primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (p. ej., mono y ser humano). En determinadas realizaciones, el término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un vertebrado, tal como un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin carácter limitante, seres humanos, primates no humanos, animales salvajes, animales asilvestrados, animales de granja, animales que participan en competiciones deportivas y mascotas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede utilizar en la prevención, la gestión, el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad o un síntoma relacionado con ella. En algunas realizaciones, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede utilizar en la modulación de una respuesta inmunitaria frente a una infección en un sujeto o un síntoma relacionado con ella. En algunas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la prevención, la gestión, el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad o un síntoma relacionado con ella, conocidas por un experto en la técnica, tal como el personal médico. En otras realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la

modulación de una respuesta inmunitaria frente a una infección en un sujeto o un síntoma relacionado con ella, conocidas por un experto en la técnica, tal como el personal médico.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad o un síntoma relacionado con ella, resultante de la administración de una o más terapias (que incluyen, pero sin carácter limitante, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento). El término "tratando", tal como se utiliza en el presente documento, también puede referirse a alterar el curso de la enfermedad del sujeto que se está tratando. Los efectos terapéuticos del tratamiento incluyen, sin carácter limitante, la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, el alivio del (de los) síntoma(s), la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión o mejora del pronóstico.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un 20 %, tal como dentro de aproximadamente un 10 %, dentro de aproximadamente un 5 % o dentro de aproximadamente un 1 % o menos de un valor o intervalo determinado.

Anticuerpos anti-BCMA

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos con especificidad de unión para BCMA.

En la Tabla 1 a continuación se presentan las CDR de anticuerpos anti-BCMA o fragmentos de unión a antígeno de estos a modo de ejemplo. En la Tabla 2 a continuación se presentan los dominios variables de cadena ligera (VL) y los dominios variables de cadena pesada (VH) de anticuerpos anti-BCMA o fragmentos de unión a antígeno de estos a modo de ejemplo.

Tabla 1. Regiones CDR de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos

Cadena pesada			
ID de cadena VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
VH anti-BCMA	GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1)	VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2)	DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3)

Cadena ligera			
ID de cadena VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
VL_original anti-BCMA	CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5)	DNNSRPP (SEQ ID NO: 9)	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13)
VL_v1 anti-BCMA	CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5)	DNNSRPP (SEQ ID NO: 9)	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13)
VL_v2 anti-BCMA	CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4)	DNNSRPP (SEQ ID NO: 9)	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13)

5	VL_v3 anti-BCMA	CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 6)	DNNIKPP (SEQ ID NO: 10)	ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 14)
	VL_v4 anti-BCMA	CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 7)	DNNKPP (SEQ ID NO: 11)	ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15)
	VL_v5 anti-BCMA	CASSTGAVTSGYYAN (SEQ ID NO: 8)	DNNIKPS (SEQ ID NO: 12)	ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15)
	VL_v6 anti-BCMA	CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4)	DNNSRPP (SEQ ID NO: 9)	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13)
	VL_v7 anti-BCMA	CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4)	DNNSRPP (SEQ ID NO: 9)	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13)

Tabla 2. Secuencias VH y VL de los anticuerpos

15	ID del anticuerpo	Secuencia
	VH anti-BCMA	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGRGLEWVA</u> <u>VIWS</u> <u>DETNRYYADSVKGRFTVSRDNVKSTVYLQMNSLISED</u> <u>TA</u> <u>VYYCARDQQYC</u> <u>SSDSC</u> <u>FTWFD</u> <u>PWGQGT</u> <u>LVTVSS</u> (SEQ ID NO: 16)
20	VL original anti-BCMA	<u>QVVVTQESALT</u> <u>TSPGETVTLT</u> <u>CRSSTGTVTPSNYAN</u> <u>WVQKPDHFFTGLIGD</u> <u>NNSR</u> <u>PPGV</u> <u>PARFSAS</u> <u>LIGDKAAL</u> <u>TITGAQTEDEAMYFC</u> <u>ALWFGNQWV</u> <u>FGGGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 17)
	VL_v1 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CRSSTGTVTPSNYAN</u> <u>WVQKPDHFFTGLIGD</u> <u>NNS</u> <u>RPPGV</u> <u>PARFSAS</u> <u>LIGDKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALWFGNQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 18)
25	VL_v2 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CASSTGTVTPSNYAN</u> <u>WVQKPGQAPRGLIGD</u> <u>NNS</u> <u>RPPGT</u> <u>PARFSAS</u> <u>LLGGKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALWFGNQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 19)
	VL_v3 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CASSTGAVTPSNYAN</u> <u>WVQKPGQAPRGLIGD</u> <u>NNI</u> <u>KPPWT</u> <u>PARFSGS</u> <u>LLGGKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALWYGGQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 20)
30	VL_v4 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CASSTGAVTPGYAN</u> <u>WVQKPGQAPRGLIGD</u> <u>NNN</u> <u>KPPWT</u> <u>PARFSGS</u> <u>LLGGKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALYYGGQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 21)
	VL_v5 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CASSTGAVTSGYYAN</u> <u>WVQKPGQAPRALIGD</u> <u>NNI</u> <u>KPSWT</u> <u>PARFSGS</u> <u>LLGGKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALYYGGQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 22)
35	VL_v6 anti-BCMA	<u>QTVVTQE</u> <u>PSLTVSPGGTVTLT</u> <u>CASSTGTVTPSNYAN</u> <u>WVQKPGQFPRGLIGD</u> <u>NNS</u> <u>RPPGT</u> <u>PARFSAS</u> <u>LLGGKAAL</u> <u>TL</u> <u>SGVQPEDEAEYYC</u> <u>ALWFGNQWV</u> <u>FGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 23)

VL_v7 anti-BCMA	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT <u>CASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQAFRGLIGDNNS</u> <u>RPPGTPARFSASLLGGKAALTL</u> SGVQPEDEAEYYCALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 24)
------------------------	--

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX¹SSTGX²VTPX³X⁴YAN (SEQ ID NO: 25), en donde X¹ es R o A, X² es T o A, X³ es S o G, y X⁴ es N o Y, una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX⁵X⁶PP (SEQ ID NO: 26), en donde X⁵ es S, I o N y X⁶ es R o K, y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 27), en donde X⁷ es W o Y, X⁸ es F o Y, y X⁹ es N o G.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5), CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 6) o CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), DNNIKPP (SEQ ID NO: 10) o DNNNKPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13), ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 14) o ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3), y un dominio VL que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 9), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al

menos un 99 % idéntico o más respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y un dominio VL que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % idéntico o más respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % idéntico o más respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y un dominio VL que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % idéntico o más respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, y SEQ ID NO: 24.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de unión a antígeno de este. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de este.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un conjugado de anticuerpo anti-BCMA-fármaco.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo monoespecífico.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo biespecífico.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo trispecífico.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo multiespecífico.

5 **Captadores de células inmunitarias**

Las proteínas de unión a antígeno anti-BCMA de la divulgación pueden estar presentes en un formato de captación de células inmunitarias. Un captador de células inmunitarias es una proteína de unión a antígeno que comprende al menos un dominio de unión capaz de unirse a una proteína de superficie celular de una célula inmunitaria y al menos un dominio de unión para una proteína de superficie celular diferente (p. ej., una proteína de superficie en una célula tumoral, tal como BCMA). El dominio de unión específico para la proteína de superficie celular de una célula inmunitaria es capaz de captar células inmunitarias específicamente para las células tumorales diana que se han de eliminar. Los ejemplos de células inmunitarias que pueden captarse incluyen, pero sin carácter limitante, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), células de neutrófilos, monocitos y macrófagos. Los ejemplos de proteínas de superficie que pueden utilizarse para captar células inmunitarias incluyen, pero sin carácter limitante, CD3, TCRa, TCRp, CD16, NKG2D, CD89, CD64 y CD32a.

Expresión de proteínas de unión a antígeno

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan polinucleótidos que codifican las proteínas de unión divulgadas (p. ej., proteínas de unión a antígeno y fragmentos de unión a antígeno de estas). También se proporcionan métodos para preparar proteínas de unión que comprenden expresar estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos que codifican las proteínas de unión divulgadas en el presente documento se insertan normalmente en un vector de expresión para su introducción en células hospedadoras que pueden utilizarse para producir la cantidad deseada de las proteínas de unión. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la divulgación proporciona vectores de expresión que comprenden polinucleótidos divulgados en el presente documento y células hospedadoras que comprenden estos vectores y polinucleótidos.

El término "vector" o "vector de expresión" se utiliza en el presente documento para referirse a vectores utilizados de acuerdo con la presente divulgación como vehículo para introducirse y expresar un gen deseado en una célula. Como saben los expertos en la técnica, tales vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la divulgación comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado, y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Pueden emplearse numerosos sistemas de vectores de expresión para los propósitos de esta divulgación. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que proceden de virus animales, tales como el virus del papiloma bovino, virus del polio, adenovirus, virus de la variolovacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas

policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse mediante la introducción de uno o más marcadores que permitan la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como el cobre. El gen del marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula mediante transformación conjunta. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima del ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En algunas realizaciones, los genes de región variable clonada se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (p. ej., genes de región constante humana) sintetizados como se ha expuesto anteriormente.

En otras realizaciones, las proteínas de unión se pueden expresar utilizando constructos policistrónicos. En tales sistemas de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de un solo constructo policistrónico. Estos sistemas utilizan de manera ventajosa un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente elevados de polipéptidos en células hospedadoras eucariotas. En la patente de EE. UU. Nº 6 193 980, que se incorpora por referencia al presente documento en su totalidad a todos los efectos, se divulgan secuencias de IRES compatibles. Los expertos en la técnica apreciarán que tales sistemas de expresión pueden ser utilizados para producir de forma eficaz toda la gama de polipéptidos divulgados en la presente solicitud.

De manera más general, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica una proteína de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de este, el vector de expresión puede introducirse en una célula hospedadora adecuada. Es decir, las células hospedadoras pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula hospedadora se puede lograr mediante diversas técnicas muy conocidas por los expertos en la materia. Estas incluyen, pero sin carácter limitante, transfección (que incluye electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato cálcico, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus inalterados. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" capítulo 24.2, págs. 470-472 *Vectors*, Rodriguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). La introducción del plásmido en el hospedador puede ser por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se analizan para determinar la síntesis de proteínas de las cadenas pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ilustrativas incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" se utilizará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula hospedadora receptora que cambia el genotipo.

En las mismas líneas, "células hospedadoras" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de polipéptidos a partir de hospedadores recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente de otro modo. En otras palabras, la recuperación del polipéptido a partir de las "células" puede significar ya sea a partir de células enteras centrifugadas, a partir del sobrenadante del cultivo de células sometidas a lisis o a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, una línea de células hospedadoras utilizada para la expresión del anticuerpo es de origen mamífero. Los expertos en la técnica pueden determinar líneas de células hospedadoras particulares que sean las más adecuadas para que el producto génico deseado se exprese en ellas. Las líneas de células hospedadoras ilustrativas incluyen, pero sin carácter limitante, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CV-1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV-1 con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HEK (línea de riñón humano), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona una glicosilación alterada, p. ej., afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de ella (p. ej., PER.C6® (Crucell) o líneas celulares de CHO con inactivación de FUT8 (células POTELEGENT®) (Biowa, Princeton, N.J.)). En una realización, se pueden utilizar células NS0. Las células CHO son particularmente útiles. Las líneas de células hospedadoras suelen estar disponibles en servicios comerciales, p. ej., en la Colección Americana de Cultivos Tipo o a partir de autores de bibliografía publicada.

La producción *in vitro* permite ampliar la escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la materia e incluyen cultivo en suspensión homogénea, p. ej., en un reactor de aireación o en un reactor con agitación continua, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Los genes que codifican las proteínas de unión caracterizadas en la divulgación también se pueden expresar en células que no sean de mamífero, tales como células bacterianas, de levaduras o vegetales. A este respecto, se apreciará que también se pueden transformar diversos microorganismos unicelulares que no sean mamíferos, tales como bacterias; es decir, aquellos susceptibles de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, las proteínas de unión normalmente pasan a formar parte de cuerpos de inclusión.

En algunas realizaciones, a continuación las proteínas de unión se aíslan, se purifican y se ensamblan en moléculas funcionales. En algunas realizaciones, las proteínas de unión de la divulgación se expresan en una célula hospedadora bacteriana. En algunas realizaciones, la célula hospedadora bacteriana se transforma con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión de la divulgación.

Además de procariotas, también se pueden utilizar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la que se utiliza más habitualmente entre los microbios eucariotas, aunque normalmente se dispone de una serie de cepas diferentes. Para la expresión en *Saccharomyces*, se utiliza habitualmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutada de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, N.º de ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como característica del genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona a continuación un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

Métodos de administración de las proteínas de unión a antígeno

Los métodos de preparación y administración de proteínas de unión a antígeno (p. ej., el anticuerpo anti-BCMA o fragmento de unión a antígeno de este divulgado en el presente documento) a un sujeto son muy conocidos o son fácilmente determinados por los expertos en la técnica. La vía de administración de las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, tal como se utiliza en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Si bien se contempla claramente que todas estas formas de administración están dentro del alcance de la presente divulgación, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular, para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, los anticuerpos modificados pueden suministrarse directamente al sitio de la población celular adversa, con lo que se aumenta de este modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Los preparados para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen medios salinos y tamponados. En las composiciones y métodos de la presente divulgación, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin carácter limitante, tampón de fosfato 0.01-0.1 M o 0.05 M o solución salina al 0.8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución láctica de Ringer o aceites fijos. Los

vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Más en particular, las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida en la medida en que exista una fácil capacidad para introducirla en la jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y además debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de estos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. También pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (p. ej., un polipéptido de unión modificado solo o combinado con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen habitualmente secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de este. Los preparados para inyecciones se procesan, se introducen en recipientes, tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, los preparados se pueden envasar y vender en forma de un kit tal como los descritos en los documentos pendientes afines U.S.S.N. 09/259 337 y U.S.S.N. 09/259 338, cada uno de los cuales incorpora al presente documento por referencia. Tales artículos de fabricación pueden incluir etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a padecer trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen los

medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento se pueden valorar utilizando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

Para la inmunización pasiva con proteínas de unión a antígeno, la dosis puede estar comprendida en el intervalo, p. ej., de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0.01 a 5 mg/kg (p. ej., 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.). 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o pueden estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, p. ej., pueden ser de al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la presente divulgación. A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo implica la administración en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Pautas de tratamiento ilustrativas adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada de 3 a 6 meses. Algunas pautas posológicas ilustrativas incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más proteínas de unión a antígeno con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada proteína de unión a antígeno administrada se encuentra dentro de los intervalos indicados.

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser de semanas, meses o años. Los intervalos también pueden ser irregulares, lo que se indica midiendo los niveles sanguíneos del antígeno o polipéptido de unión modificado en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de proteína de unión a antígeno modificada en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-300 µg/ml. Como alternativa, la proteína de unión a antígeno se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Para las proteínas de unión a antígeno, la dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida de la proteína de unión a antígeno en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados presentan la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos.

La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la presente proteína de unión a antígeno o un cóctel de esta se administran a un paciente que aún no se encuentra en estado patológico, para aumentar la resistencia del paciente. Tal cantidad se define como una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades exactas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y de la inmunidad general, pero generalmente están comprendidas en el intervalo de 0.1 y 25 mg por dosis, especialmente de 0.5 a 2.5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo

tratamiento por el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta (p. ej., de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, siendo unas dosis de 5 a 25 mg más comúnmente utilizadas para radioinmunoconjugados y dosis más altas para anticuerpos modificados con citotoxinas-fármacos) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o termine la progresión de la enfermedad, o hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar una pauta profiláctica.

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento se pueden administrar opcionalmente combinadas con otros agentes que sean eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico). Las dosis individuales eficaces del tratamiento (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos modificados marcados con ^{90}Y de la presente divulgación están comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis individuales eficaces del tratamiento que no son ablativas de la médula para los anticuerpos modificados con ^{131}I están comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis individuales eficaces del tratamiento que son ablativas (es decir, pueden requerir un trasplante autólogo de médula ósea) para los anticuerpos marcados con ^{131}I están comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, tal como entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. En combinación con un anticuerpo quimérico, debido a la semivida circulante más prolongada respecto a los anticuerpos murinos, una dosis individual eficaz del tratamiento que no sea ablativa de la médula para los anticuerpos quiméricos marcados con ^{131}I está comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, p. ej., menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de las imágenes para, p. ej., una marca de ^{111}In son habitualmente de menos de aproximadamente 5 mCi.

Aunque las proteínas de unión a antígeno se pueden administrar como se acaba de describir anteriormente, debe enfatizarse que en otras realizaciones las proteínas de unión a antígeno se pueden administrar a pacientes por lo demás sanos como primera línea de terapia. En tales realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se pueden administrar a pacientes que tienen reservas normales o promedio de médula roja y/o a pacientes que no han sido, ni están siendo, sometidos a una o más terapias diferentes. Tal como se utiliza en el presente documento, la administración de anticuerpos modificados o fragmentos de estos junto o en combinación con una terapia adjunta significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los anticuerpos divulgados. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes de la pauta terapéutica combinada se puede programar para mejorar la eficacia general del tratamiento. Un experto (p. ej., un oncólogo con experiencia) sería capaz de discernir fácilmente pautas terapéuticas combinadas eficaces sin demasiada experimentación basándose en la terapia adjunta seleccionada y las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

Tal como se ha analizado previamente, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación, fragmentos inmunorreactivos o recombinantes de estas, se pueden administrar en una

cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos en mamíferos. A este respecto, se apreciará que las proteínas de unión a antígeno divulgadas se formularán para facilitar la administración y fomentar la estabilidad del agente activo.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación incluyen habitualmente un portador estéril atóxico farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica, tampones atóxicos, conservantes y similares. A los efectos de la presente solicitud, se considerará que una cantidad farmacéuticamente eficaz de las proteínas de unión a antígeno modificadas, fragmento inmunorreactivo o recombinante de estas, conjugadas o no conjugadas con un agente terapéutico, significa una cantidad suficiente para lograr una unión eficaz a un antígeno y lograr un beneficio, p. ej., mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o detectar una sustancia o una célula. En el caso de las células tumorales, el polipéptido de unión modificado normalmente será capaz de interaccionar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de esas células. Obviamente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado.

15 De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, las proteínas de unión a antígeno de la divulgación se pueden administrar a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Las proteínas de unión a antígeno de la divulgación se pueden administrar a tal ser humano u otro animal en una forma farmacéutica convencional preparada combinando el anticuerpo de la divulgación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y naturaleza del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable vienen dictadas por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables muy conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que puede resultar particularmente eficaz un cóctel que comprenda una o más especies de polipéptidos de unión que se describen en la presente divulgación.

20 La actividad biológica de las composiciones farmacéuticas definidas en el presente documento se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad, tal como se describe en los siguientes ejemplos, en el documento WO 99/54440 o según describen Schlereth *et al.* (*Cancer Immunol. Immunother.* 20 (2005), 1-12). "Eficacia" o "eficacia *in vivo*", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la respuesta a la terapia con la composición farmacéutica de la invención, utilizando, p. ej., criterios de respuesta estandarizados del NCI. El éxito o la eficacia *in vivo* de la terapia utilizando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la eficacia de la composición para su propósito previsto, es decir, la capacidad de la composición para provocar su efecto deseado, es decir, la reducción de las células patológicas, p. ej., las células tumorales. La eficacia *in vivo* se puede monitorizar mediante métodos estándar establecidos para las entidades patológicas respectivas que incluyen, pero sin carácter limitante, recuentos de glóbulos blancos, fórmulas leucocitarias, clasificación de células activadas por fluorescencia y aspiración de médula ósea. Además, se pueden utilizar diversos parámetros químicos clínicos específicos

de la enfermedad y otros métodos estándar establecidos. Además, se puede utilizar tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear (p. ej., para la evaluación de la respuesta basada en los criterios del Instituto Nacional del Cáncer [Cheson B D, Horning S J, Coiffier B, Shipp M A, Fisher R I, Connors J M, Lister T A, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris N L, Armitage J O, Carter W, Hoppe R, Canellos G P. "Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas". Grupo de trabajo internacional financiado por el NCI. *J Clin Oncol.* abril de 1999; 17(4):1244]), escáner de tomografía por emisión de positrones, recuentos de glóbulos blancos, fórmulas leucocitarias, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos, y varios parámetros químicos clínicos específicos del linfoma (p. ej., lactato·deshidrogenasa) y otros métodos estándar establecidos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo realizar y utilizar los métodos y composiciones presentados en la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1. Anticuerpos anti-BCMA

Generación de anticuerpos anti-BCMA humano

A una cohorte de 15 ratones transgénicos Trianni hembra con Ig humana de ocho semanas de edad se les implantó un pellet de Estradiol por vía subcutánea y después de tres semanas se les inyectaron 100 µg de anticuerpo anti-CD25 de ratón. Una semana después, todos los ratones se sensibilizaron con una administración de aproximadamente 5×10^6 (5 millones) de células 300.19 que sobreexpresan BCMA humano en PBS sin adyuvante. A continuación, se realizaron tres inmunizaciones con dominio extracelular (ECD) de BCMA humano conjugado con la proteína de la toxina A de la difteria (DTA) y dos inmunizaciones con ECD de macacos cangrejeros conjugado con la proteína de la toxina A de la difteria (DTA) en adyuvante sigma. Se midió el título de IgG específica anti-BCMA mediante ELISA después de la última inmunización utilizando la proteína humana BCMA-ECD como antígeno para evaluar las respuestas inmunitarias. Los ratones que desarrollaron títulos elevados de anticuerpos anti-BCMA (1:100 000 o más) fueron seleccionados para la generación de hibridoma. Estos ratones recibieron un refuerzo de una combinación de dominios ECD de proteína humana y de macaco cangrejero BCMA-DTA sin adyuvante cuatro días antes de que los ratones fueran sacrificados para recolectar el bazo para la preparación de la fusión.

El proceso de fusión y generación de hibridomas se realizó siguiendo protocolos establecidos (Yale *J Biol Med*, 1981, 54 (5) 387-402) y Geffer *et al.* (Somatic Cell Genet, 1977, 3 (2) 231-236). Se mezcló una suspensión unicelular de esplenocitos con células de mieloma F0 en una proporción de 5:1 en un tubo

Al día siguiente, las células en el frasco T-150 se centrifugaron y se retiraron los sobrenadantes. Las células se transfirieron cuidadosamente a medio de clonación y selección semisólido para hibridoma (Molecular Devices) que contenía anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Molecular Devices). Las células se mezclaron suavemente, y el medio semisólido se sembró en seis placas de pocillos a 2 ml/pocillo. Estas placas se incubaron a 37 °C, con un 7 % de CO₂ para el cultivo de los hibridomas. Después de aproximadamente 10 días de incubación, los hibridomas que secretan anticuerpos reaccionan con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC y crean un halo verde que rodea el hibridoma. Estos hibridomas se detectaron con Clonepix (Dispositivos Moleculares) y se seleccionaron colonias individuales en los pocillos de las placas de 96 pocillos. Las placas de 96 pocillos que contenían los hibridomas clonales se incubaron durante 10 días adicionales a 37 °C, con un 7 % de CO₂.

La región variable de cadena pesada se expone como:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGRGLEWVAVIWSDETNRYAD
SVKGRFTVSRDNVKSTVYLQMNSLISEDTAVYYCARDQQYCSSDSCFTWFDPWGQGTLTVTSS (SEQ ID
NO: 16). Las regiones de residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-H1 se expone como GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1). CDR-H2 se expone como VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2). CDR-H3 se expone como DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3).

La región variable de cadena ligera original se expone como:

QVVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGTVTPSNYANWVQEKPDHFFTGLIGDNNSRPPGVPARF
SASLIGDKAALTITGAQTEDEAMYFCALWFGNQWVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 17). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5). CDR-L2 se expone como DNNSRPP (SEQ ID NO: 9). CDR-L3 se expone como ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

La región variable de cadena ligera de la Variante 1 se expone como:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGTVTPSNYANWVQQKPDHFFTGLIGDNNSRPPGTPARF
SASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 18). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 5). CDR-L2 se expone como
5 DNNSRPP (SEQ ID NO: 9). CDR-L3 se expone como ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

La región variable de cadena ligera de la Variante 2 se expone como:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQAPRGLIGDNNSRPPGTPARF
SASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 19). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

10 CDR-L1 se expone como CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4). CDR-L2 se expone como
DNNSRPP (SEQ ID NO: 9). CDR-L3 se expone como ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

La región variable de cadena ligera de la Variante 3 se expone como:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTPSNYANWVQQKPGQAPRGLIGDDNNIKPPWTPARF
15 SGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYGGQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 20). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 6). CDR-L2 se expone como
DNNIKPP (SEQ ID NO: 10). CDR-L3 se expone como ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 14).

La región variable de cadena ligera de la Variante 4 se expone como:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTPGYANWVQQKPGQAPRGLIGDDNNNKPPWTPAR
20 FSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALYYGGQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 21). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 7). CDR-L2 se expone como
DNNNKPP (SEQ ID NO: 11). CDR-L3 se expone como ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15).

La región variable de cadena ligera de la Variante 5 se expone como:

25 QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYANWVQQKPGQAPRALIGDDNNIKPSWTPARF
SGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALYYGGQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 22). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CASSTGAVTSGYYAN (SEQ ID NO: 8). CDR-L2 se expone como
DNNIKPS (SEQ ID NO: 12). CDR-L3 se expone como ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 15).

30 La región variable de cadena ligera de la Variante 6 se expone como:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQFPRGLIGDNNSRPPGTPARF
SASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 23). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4). CDR-L2 se expone como
35 DNNSRPP (SEQ ID NO: 9). CDR-L3 se expone como ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

La región variable de cadena ligera de la Variante 7 se expone como:

QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQAFRGLIGDNNRPPGTPARF
SASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 24). Las secciones de
residuos subrayadas son las CDR 1, 2 y 3.

CDR-L1 se expone como CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 4). CDR-L2 se expone como
5 DNNSRPP (SEQ ID NO: 9). CDR-L3 se expone como ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 13).

Ejemplo 2. Expresión y purificación de los anticuerpos anti-BCMA

Se subcultivaron células Expi293F™ hasta que la densidad alcanzó aproximadamente $3-5 \times 10^6$
células viables/ml. Las células se sembraron con una densidad final de $2.5-3 \times 10^6$ células viables/ml y a
10 continuación se permitió que crecieran durante la noche. A continuación, las células se diluyeron hasta una
densidad final de 3×10^6 células viables/ml con medio de expresión Expi293™ nuevo precalentado, y las
células se mezclaron suavemente.

El ADN plasmídico se diluyó con tampón de complejación OPTI-PLEX™ (o medio OPTI-MEM™ I)
hasta una concentración total de ADN plasmídico de aproximadamente 1.0 µg/ml. El reactivo
15 EXPIFECTAMINE™ 293 se diluyó con tampón de complejación OPTI-PLEX™ (o medio OPTI-MEM™ I).
Ambas soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió el reactivo
EXPIFECTAMINE™ 293 diluido al ADN plasmídico diluido, y la solución se mezcló y la solución que
contenía los complejos de EXPIFECTAMINE™ 293/ADN plasmídico se incubó a temperatura ambiente
durante 10-20 minutos. Los complejos se transfirieron lentamente a las células Expi293F™ con una
20 agitación suave durante la adición, a continuación las células se incubaron en una incubadora a 37 °C con
una humedad relativa $\geq 80\%$ y con un 8 % de CO₂ en un agitador orbital.

Se añadió el potenciador de transfección 1 EXPIFECTAMINE™ 293 y el potenciador de
transfección 2 EXPIFECTAMINE™ 293 al frasco de transfección aproximadamente 18-22 horas después
de la transfección, el frasco se agitó suavemente durante la adición, a continuación el frasco se volvió a
25 introducir inmediatamente en la incubadora a 37 °C con una humedad relativa $\geq 80\%$ y con un 8 % de CO₂
en una plataforma de agitación orbital.

El sobrenadante del cultivo que contenía la proteína se recolectó entre aproximadamente 5 y 7 días
después de la transfección.

Purificación

30 Los anticuerpos se purificaron en una columna mAbSelect SuRe (GE n.º 11-0034-95, 16 mm x 25
mm). Antes de su introducción en la columna, las soluciones de anticuerpos se filtraron a través de una
unidad de filtro de PES de 0.2 µm para eliminar las partículas. Durante la purificación, se utilizaron los
siguientes tampones: Tampón A: NaOH 0.2 M; Tampón B: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM de pH
7.2 (o PBS 1X); Tampón C: citrato de sodio 50 mM (dihidratado), pH 3.5; Tampón D: ácido succínico 50
35 mM; y Tampón E: etanol al 20 %. Los anticuerpos se purificaron utilizando el siguiente protocolo: 1) la
columna mAbSelect SuRe se limpió con 6 volúmenes de columna (VC) de Tampón A durante 15 minutos
de tiempo de contacto (2 ml/min durante 15 minutos); 2) la columna se enjuagó con 5 VC de agua MilliQ;
3) la columna se equilibró con 15 VC de Tampón B. Antes de introducir el anticuerpo, se recolectaron 0.5

ml de medio acondicionado y se guardaron; 4) el anticuerpo se introdujo en la columna; 5) la columna se lavó con 6 VC de Tampón B; 6) el anticuerpo se eluyó utilizando 6 VC de Tampón C y la fracción eluida se neutralizó con 1/10 volumen de fosfato de sodio dibásico o Tris 600 mM de pH 10; 7) la columna se extrajo utilizando 6 VC de Tampón D, y se añadió 1/10 de volumen de fosfato de sodio dibásico o Tris 600 mM de pH 10 para neutralizar; 8) la columna se limpió utilizando 10 VC de Tampón A; 9) la columna se enjuagó con 5 VC de agua MilliQ; 10) la columna se equilibrio de nuevo con 10 VC de Tampón V; y 11) la columna se lavó con 10 VC de Tampón E y se guardó a 4 °C.

La fracción eluida se redujo hasta un volumen de aproximadamente 0.5 ml a 2 ml utilizando un concentrador MWCO Millipore: a) se añadieron aproximadamente 2 ml de DPBS al concentrador para humedecer la membrana, el concentrador se centrifugó durante aproximadamente 1 minuto y el líquido se desechó; b) se añadió la fracción eluida al concentrador y se centrifugó para que el líquido pasará a través de la membrana. Esto se repitió para reducir el volumen hasta aproximadamente de 0.5 ml a 2 ml.

Se realizó un intercambio de tampón a DPBS utilizando una columna GE PD-10 o una columna THERMO SCIENTIFIC™ ZEBA™: a) la columna se cortó en diagonal para hacer posible un mejor goteo y se retiró el tapón para drenar el líquido; b) se añadió DPBS (5 ml) a la columna y se hizo pasar a través de ella y esto se repitió durante un total de 4 veces; c) la muestra concentrada entera se introdujo mediante una esterilización en filtro en la columna y se hizo fluir a través de ella. El fondo del filtro MWCO se enjuagó para recolectar cualquier anticuerpo adicional; d) se añadió DPBS para llevar el volumen hasta 2 ml para cargar completamente la columna; e) se colocó un tubo cónico de 15 ml debajo de la columna y se añadieron 4 ml de DPBS a la columna para eluir. La fracción eluida se concentró utilizando el concentrador MWCO Millipore y la concentración del anticuerpo se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis NANODROP™.

Ejemplo 3. Reactividad cruzada de las variantes del clon CA10 respecto a las proteínas BCMA humanas y de macaco cangrejero

Se preparó una solución de antígeno BCMA (2 µg/ml o 1 mg/ml de antígeno BCMA biotinilado cuando se utiliza una placa recubierta con estreptavidina) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución de antígeno se añadió a placas de 96 pocillos (50 µl por pocillo) y se incubó a 4 °C durante la noche. Las placas se bloquearon con 250 µl por pocillo de PBSA (PBS que contenía un 1 % de BSA) durante 2 h a 37 °C, a continuación se lavaron con 200 µl por pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) tres veces. Se añadió sob. de hibridoma (50 µl) o 1 mg/ml de anticuerpo de prueba o control (positivo y negativo) purificado (50 µl) por pocillo en la placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con 200 µl por pocillo de PBS, tres veces, a continuación se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido con un factor de 1:5000 en PBSA (50 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron con 200 µl por pocillo de PBS, tres veces. Se preparó el sustrato diclorhidrato de tetrametilbencidina (TMB) mezclando la Solución A y la Solución B (1:1) en un tubo cónico de 15 ml, a continuación se añadieron 50 µl del sustrato a los pocillos. Se permitió que el color se

desarrollara durante 1-5 minutos, a continuación se añadieron 50 µl de la solución de parada a cada pocillo. La absorbancia se leyó utilizando un SpectraMax (Molecular Devices) a 450 nm.

Entre los clones de anticuerpos que exhibieron una unión específica a BCMA, el clon CA10_original (CA10_V2_original) mostró una fuerte unión (**FIG. 3**). Las Variantes 1-4, la Variante 6 y la Variante 7 presentaron todas ellas una unión similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, la Variante 5 (CA10_PE_V5) perdió unión en comparación con las otras variantes (**FIG. 3**).

Ejemplo 4. Unión entre los anticuerpos mAb anti-BCMA y las proteínas BCMA en las superficies de la membrana de células HEK o MM1R

Tinción celular para citometría de flujo

Se tomaron alícuotas de las células HEK 293 o MM1R (0.5×10^6) en tubos para FACS por separado y se etiquetaron como muestra de prueba no teñida o control positivo. Se añadió sob. de hibridoma (20 µl) o CA10 purificado o control positivo (1 µg/ml, 5 µl) a las células y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron añadiendo 3 ml de 1X PBX/5 % de FBS (tampón de FACS) y se centrifugaron durante 5-7 minutos a 1500 rpm (450 x g). El sobrenadante se separó por vertido y las células se agitaron suavemente en vórtex para mezclarlas. Se añadieron 50 µl de una dilución 1:500 de un anticuerpo secundario específico anti-H+L humano (o de ratón) producido en cabra conjugado con FITC a las células, y las células se incubaron en hielo o a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Se añadió tampón de FACS (3 ml) y las células se lavaron a 1500 rpm durante 5-7 minutos. El sobrenadante se descartó y las células se suspendieron de nuevo en 150-200 µl de tampón de FACS. Las células se adquirieron en un BD FACS Canto y los datos se analizaron utilizando el software Flojo V10.

Las Variantes 1-4, la Variante 6 y la Variante 7 presentaron todas ellas una unión similar a la proteína BCMA en comparación con el anticuerpo CA10_original (CA10_V2_original) tanto en células HEK293 como en células MM1R (**FIGs. 4 y 5A-5B**). La Variante 5 no mostró unión a la proteína BCMA en las células HEK293 ni MM1R.

Ejemplo 5. Interacciones de anticuerpos y proteínas antígenas y constantes de afinidad determinadas por mediciones de resonancia de plasmones superficiales

Se preparó 1X HBS-EP+ en agua MilliQ, se filtró y se desgasificó. Se purgó un instrumento BIACORE™ T100 con 1X HBS-EP+. Se utilizó el software de control CM% BIACORE™ para la proteína A inmovilizada en el chip.

Los anticuerpos se diluyeron hasta 20 µg/ml en HBS-EP+. Se prepararon siete diluciones en serie 1:1 de los antígenos (concentración final de 80 nM) y se utilizó 1X HBS-EP+ como control de 0 nm. Se utilizó 1X HBS-EP+ para las inyecciones de puesta en marcha y se utilizó HCl (12 mM) para la regeneración. Las muestras se sometieron al ensayo y los datos se analizaron utilizando el software BIACORE™ T100.

Tabla 3. Lista de reactivos e instrumentos

Artículo	Proveedor	n.º de catálogo/lote
10X HBS-EP+	GE Life sciences	BR-1006-69
HCl 1 M	Sigma Aldrich	H1758

Tubos de 7 mm	GE Life sciences	BR-1002-12
Tapones de goma de color naranja de tipo 3	GE Life sciences	BR-1005-02
Tubos de 15 mm	GE Life sciences	BR-1006-54
Tapones de goma de color naranja de tipo 5	GE Life sciences	BR-1006-55

Tabla 4. Lista de antígenos

	PPB	Conc. (mg/ml) Preparar patrón 1/10	PM (Da)	Dilución (80 nM final). Preparar 2 ml
DTA humano His	6031	2.15	28.097	20
DTA de macaco cangrejero His	17990	5.55	28.203	2
BCMA humano-Avi- His	5176	1.8	8.402	7.4
BCMA de macaco cangrejero-Avi-His	6391	1.0	8.508	6.8

Cálculos utilizados para preparar las diluciones de antígenos:

$$\frac{\text{Concentración } (\frac{mg}{ml})}{PM (kDa)} = \text{Molaridad } (M), \text{ multiplicar por } 1\,000\,000 \text{ para convertir en } nM$$
$$\frac{\text{concentración diana } (nM) \times (\text{volumen requerido en } \mu l)}{\text{molaridad } (nM)} = \mu l \text{ de antígeno a añadir}$$

Tabla 5. Lista de anticuerpos

	PPB	Conc. (mg/ml)	Dilución (5 ug/ml) 1000 ul (preparar 2x1ml)
aBCMA A1	Tara	3.45	1.4
aBCMA B12	Tara	1.14	4.4
aBCMA CA10 v1	21959	3.27	1.5
aBCMA CA10 v2	21960	3.32	1.5
aBCMA CA17	21955	3.37	1.5
J6M0 hIgG	1388	5.27	0.95
BB2121	13109	1.34	3.7
Control de isotipo: Pog IgG1	5359	1.95	2.6

Cálculos utilizados para preparar las diluciones de anticuerpos:

$$\frac{20 \mu g/ml}{\text{Concentración de anticuerpo } (\frac{mg}{ml})} = \mu l \text{ de anticuerpo (basados en un preparado de } 1 \text{ ml de volumen total)}$$

Las Variantes 1, 2, 6 y 7 mostraron una afinidad similar a la del anticuerpo CA10_original (CA10 WT) por las proteínas BCMA tanto humanas como de macaco cangrejero (**FIG. 6- FIG. 9**). La Variante 3 mostró una afinidad similar a la del anticuerpo original por la proteína BCMA humana, pero presentó una afinidad menor frente a BCMA de macaco cangrejero. Las Variantes 4 y 5 perdieron ambas afinidad por las proteínas BCMA humanas y de macaco cangrejero.

10

15

20

25

30

35