

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 015**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 19155984 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022 EP 3508503**

54 Título: **Anticuerpo contra CD269 (BCMA)**

30 Prioridad:

01.11.2012 EP 12190970

21.02.2013 EP 13156091

15.08.2013 EP 13180548

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2023

73 Titular/es:

**MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT
(100.0%)**

**Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**LIPP, MARTIN;
ODEN, FELIX;
HÖPKEN, UTA;
MÜLLER, GERD;
DAUMKE, OLIVER;
MARINO, STEPHEN y
OLAL, DANIEL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ POVEDA, Sara

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 937 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra CD269 (BCMA)

- 5 La invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a CD269 (BCMA), interrumpiendo de esta manera la interacción entre CD269 y sus ligandos nativos (BAFF y APRIL), y su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por células plasmáticas tales como mieloma múltiple y enfermedades autoinmunitarias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El antígeno de maduración de células B (BCMA) es el miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF). Sus ligandos nativos son el factor activador de células B (BAFF; también llamado BLyS o TALL-1, TNFSF13B) y un ligando inductor de proliferación (APRIL, TNFSF13, CD256) (Mackay et al. (2003) Annu Rev Immunol 21:231-264) que finalmente están involucrados (a través de la interacción con ligandos adicionales) en la regulación de varios aspectos de la inmunidad humoral, el desarrollo de células B y la homeostasis. La afinidad por BAFF se encuentra en el rango micromolar bajo, mientras que APRIL se une casi 100 veces más fuerte a BCMA (Bossen et al. (2006) Semin Immunol 18:263-275). La expresión de BCMA está restringida al linaje de células B donde se expresa predominantemente sobre blastos plasmáticos y células plasmáticas, pero está ausente en células B nultitradas, células B del centro germinal y células B de memoria (Darce et al. (2007) J Immunol 179:7276-7286; Benson et al. (2008) J Immunol 180:3655-3659; Good et al. (2009) J Immunol 182:890-901).

- 25 La expresión de BCMA es importante para la supervivencia de células plasmáticas sésiles de larga vida en la médula ósea (O'Connor et al. (2004) J Exp Med 199:91-98). En consecuencia, los ratones con deficiencia de BCMA muestran un número reducido de células plasmáticas en la médula ósea mientras que el nivel de células plasmáticas en el bazo no se ve afectado (Peperzak et al. (2013) Nat Immunol [Epub 2013 Feb 03, 10.1038/ni.2527]). La diferenciación de células B maduras en células plasmáticas es normal en ratones transgénicos para BCMA (Schiemann et al. (2001) Science 293:2111-2114; Xu et al. (2001) Mol Cell Biol 21:4067-4074). La unión de BAFF o APRIL a BCMA desencadena la activación de NF-κB (Hatzoglou et al. (2000) J Immunol 165:1322-1330), que induce la regulación al alza de miembros de Bcl-2 antiapoptóticos tales como Bcl-xL o Bcl-2 y Mcl-1 (Peperzak et al. (2013) Nat Immunol [Epub 2013 Feb 03, 10.1038/ni.2527]).

- 35 BCMA también se expresa altamente en células plasmáticas malignas, por ejemplo, en mieloma múltiple (MM), que es un linfoma no Hodgkin de células B de la médula ósea, y leucemia de células plasmáticas (PCL), que es más agresiva que el MM y constituye alrededor del 4 % de todos los casos de trastornos de células plasmáticas. Además de MM y PCL, también se ha detectado BCMA sobre células de Hodgkin y Reed-Sternberg en pacientes que padecen linfoma de Hodgkin (Chiu et al. (2007) Blood 109:729-739). De manera similar a su función en las células plasmáticas, se ha mostrado que la unión del ligando a BCMA modula el crecimiento y la supervivencia de las células de mieloma múltiple que expresan BCMA (Novak et al. (2004) Blood 103:689-694). La señalización de BAFF y APRIL a través de BCMA se considera un factor favorable a la supervivencia de las células plasmáticas malignas; por lo tanto, el agotamiento de las células tumorales positivas a BCMA y/o la interrupción de la interacción ligando-receptor deberían mejorar el resultado terapéutico para el mieloma múltiple y las enfermedades autoinmunitarias dependientes de autoanticuerpos.

- 45 Actualmente existen varios enfoques disponibles para el tratamiento del mieloma múltiple (Raab et al. (2009) Lancet 374:324-339). La quimioterapia conduce en la mayoría de los sujetos sólo al control parcial del mieloma múltiple; rara vez la quimioterapia conduce a una remisión completa. Por lo tanto, a menudo se aplican enfoques de combinación, que comúnmente implican una administración adicional de corticosteroides, tales como dexametasona o prednisona. Sin embargo, los corticosteroides están plagados de efectos secundarios, tales como la reducción de la densidad ósea. También se ha propuesto el trasplante de células madre, utilizando células madre propias (autólogas) o utilizando células de un pariente cercano o donante no emparentado compatible (allogénico). En el mieloma múltiple, la mayoría de los trasplantes que se realizan son de tipo autólogo. Se ha demostrado que dichos trasplantes, aunque no son curativos, prolongan la vida en pacientes seleccionados (Suzuki (2013) Jpn J Clin Oncol 43:116-124). Alternativamente, la talidomida y derivados de la misma se han aplicado recientemente en el tratamiento, pero también se asocian con tasas de éxito subóptimas y altos costes. Más recientemente, se ha aprobado el inhibidor del proteasoma bortezomib (PS-341) para el tratamiento del MM recidivante y resistente y se utilizó en numerosos ensayos clínicos solo o en combinación con fármacos establecidos, lo que resultó en un resultado clínico alentador (Richardson et al. (2003) New Engl J Med 348:2609-2617; Kapoor et al. (2012) Semin Hematol 49:228-242). Los enfoques terapéuticos a menudo se combinan. Los costes de dichos tratamientos combinados son correspondientemente altos y las tasas de éxito aún dejan un margen significativo de mejora. La combinación de opciones de tratamiento tampoco es ideal debido a la acumulación de efectos secundarios si se utilizan múltiples medicamentos simultáneamente. Se requieren enfoques novedosos para el tratamiento de enfermedades de células plasmáticas, en particular el mieloma múltiple.

- 65 La capacidad de dirigirse específicamente a las células plasmáticas también es de gran beneficio para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La terapia convencional para enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la artritis reumática (RA), en las que los anticuerpos autorreactivos son cruciales para la patología de la enfermedad, depende de la gravedad de los síntomas y las circunstancias del paciente (Scott et al. (2010) Lancet 376:1094-1108, D'Cruz et al. (2007) Lancet 369, 587-596). En general, las formas leves de la

enfermedad se tratan primero con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD). Las formas más graves de SLE, que involucran disfunción orgánica debido a la enfermedad activa, usualmente se tratan con esteroides junto con agentes inmunosupresores fuertes tales como la ciclofosfamida, un agente citotóxico que se dirige a las células en reproducción. Recientemente, Belimumab, un anticuerpo dirigido a la citocina BAFF, que se encuentra en niveles elevados en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunitarias, recibió la aprobación de la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) para su uso en el SLE. Sin embargo, solo las células B recién formadas dependen de BAFF para sobrevivir en humanos, mientras que las células B de memoria y las células plasmáticas son menos susceptibles a la inhibición selectiva de BAFF (Jacobi et al. (2010) *Arthritis Rheum* 62:201-210). Para la artritis reumatoide, los inhibidores de TNF fueron los primeros agentes biológicos autorizados, seguidos por abatacept, rituximab y tocilizumab y otros: suprimen las rutas inflamatorias clave involucradas en la inflamación y destrucción de las articulaciones, lo que, sin embargo, tiene el precio de un riesgo elevado de infección debido a la inmunosupresión relativa (Chan et al. (2010) *Nat Rev Immunol* 10:301-316, Keyser (2011) *Curr Rheumatol Rev* 7:77-87). A pesar de la aprobación de estos productos biológicos, los pacientes que padecen RA y SLE a menudo muestran una persistencia de marcadores autoinmunitarios, lo que probablemente esté relacionado con la presencia de células plasmáticas sésiles de larga duración en la médula ósea que resisten, por ejemplo, ablación mediada por CD20 mediante rituximab y terapia con ciclofosfamida y glucocorticoides en dosificaciones altas. Las estrategias actuales en SLE incluyen un "reinicio" del sistema inmunitario mediante inmunoblación y trasplante de células madre autólogo, aunque el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante sigue siendo una preocupación grave (Farge et al. (2010) *Haematologica* 95:284-292). El uso de inhibidores del proteasoma tales como Bortezomib podría ser una estrategia alternativa para el agotamiento de las células plasmáticas: debido a la alta tasa de síntesis de proteínas y la limitada capacidad proteolítica, las células plasmáticas son hipersensibles a los inhibidores del proteasoma. Se ha aprobado recientemente el bortezomib para el tratamiento del mieloma múltiple recidivante y un estudio reciente en ratones con enfermedad similar al lupus mostró que bortezomib agota las células plasmáticas y protege a los ratones con enfermedad similar al lupus de la nefritis (Neubert et al. (2008) *Nat Med* 14:748-755). Sin embargo, los inhibidores del proteasoma no actúan específicamente sobre las células plasmáticas y la incidencia de efectos adversos como la neuropatía periférica es alta (Arastu-Kapur et al. (2011) *Clin Cancer Res* 17:2734-2743).

Los anticuerpos terapéuticos pueden actuar a través de varios mecanismos al unirse a su diana. La unión en sí puede desencadenar la transducción de señales, lo que puede conducir a la muerte celular programada (Chavez-Galan et al. (2009) *Cell Mol Immunol* 6:15-25). También puede bloquear la interacción de un receptor con su ligando al unirse al receptor o al ligando. Esta interrupción puede causar apoptosis si se ven afectadas las señales importantes para la supervivencia (Chiu et al. (2007) *Blood* 109:729-739). Con respecto al agotamiento de células, se conocen dos mecanismos efectores principales. El primero es la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) hacia la célula diana. Hay tres rutas diferentes conocidas. Sin embargo, en el caso de los anticuerpos, la ruta importante para CDC es la ruta clásica que se inicia a través de la unión de C1q a la región constante de IgG o IgM (Wang and Weiner (2008) *Expert Opin Biol Ther* 8: 759-768).

El segundo mecanismo se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Esta función efectora se caracteriza por el reclutamiento de células inmunitarias que expresan receptores Fc para el isotipo respectivo del anticuerpo. La ADCC está mediada en gran medida por la activación de los receptores Fc-gamma (FcγR) que se pueden unir a las moléculas de IgG ya sea solas o como complejos inmunitarios. Los ratones exhiben tres (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV) y los humanos cinco (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB) que activan los receptores Fcγ. Estos receptores se expresan sobre células inmunitarias innatas como granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales y, por lo tanto, ligan el sistema inmunitario innato con el adaptativo. Dependiendo del tipo de célula, existen varios modos de acción de las células portadoras de FcγR tras el reconocimiento de una célula diana marcada con anticuerpos. Los granulocitos generalmente liberan sustancias vasoactivas y citotóxicas o quimioatrayentes, pero también son capaces de fagocitosis. Los monocitos y macrófagos responden con fagocitosis, explosión oxidativa, citotoxicidad o liberación de citocinas proinflamatorias, mientras que las células destructoras naturales liberan granzimas y perforina y también pueden desencadenar la muerte celular a través de la interacción con FAS sobre la célula diana y su ligando Fas (Nimmerjahn and Ravetch (2008) *Nat Rev Immunol* 8:34-47; Wang and Weiner (2008) *Expert Opin Biol Ther* 8:759-768; Chavez-Galan et al. (2009) *Cell Mol Immunol* 6:15-25). Los anticuerpos que se unen a CD269 (BCMA) y su uso en el tratamiento de diversos trastornos médicos relacionados con las células B se describen en la técnica. Ryan et al (Molecular Cancer Therapeutics, 2007 6(11), 3009) describen un anticuerpo anti-BCMA obtenido mediante vacunación en ratas utilizando un péptido de los aminoácidos 5 a 54 de la proteína BCMA. El anticuerpo descrito allí se une a BCMA, bloquea la activación de NF-KB dependiente de APRIL e induce ADCC. No se proporcionan detalles sobre el epítipo específico del anticuerpo.

El documento WO 2012/163805 describe proteínas de unión a BCMA, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados, su uso para bloquear la interacción de BAFF y/o APRIL con BCMA y su uso potencial en el tratamiento de neoplasias malignas de células plasmáticas tales como el mieloma múltiple. El anticuerpo divulgado allí se obtuvo mediante vacunación en ratón utilizando un péptido recombinante de los aminoácidos 4 a 53 de la proteína BCMA. El documento WO 2010/104949 también divulga varios anticuerpos que se unen preferiblemente al dominio extracelular de BCMA y su uso en el tratamiento de afecciones y trastornos médicos mediados por células B. No se proporcionan detalles sobre el epítipo específico de los anticuerpos. El documento WO 2002/066516 divulga anticuerpos bivalentes que se unen tanto a BCMA como a TACI y su uso potencial en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y cánceres de

células B. Se utiliza un dominio extracelular indefinido de BCMA para generar la porción anti-BCMA de los anticuerpos descritos allí. El documento WO 2012/066058 divulga anticuerpos bivalentes que se unen tanto a BCMA como a CD3 y su uso potencial en el tratamiento de trastornos médicos relacionados con las células B. En ninguna de las divulgaciones se proporcionan detalles sobre las propiedades de unión y los epítomos específicos de los anticuerpos.

El documento WO 2012/143498 divulga métodos para la estratificación de pacientes con mieloma múltiple que implican el uso de anticuerpos anti-BCMA. Los anticuerpos preferidos son aquellos conocidos como "Vicky-1" (subtipo IgG1 de GeneTex) y "Mab 193" (subtipo IgG2a de R&D Systems). No se proporcionan detalles sobre las propiedades de unión y los epítomos específicos de los anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico subyacente a la invención era proporcionar un agente adecuado para tratar enfermedades asociadas con células plasmáticas patógenas, tales como mieloma múltiple y enfermedades autoinmunitarias.

Este problema se resuelve mediante las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la presente invención se proporcionan en las reivindicaciones dependientes. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo que se una a CD269 (BCMA), en particular un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA).

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas a continuación.

La invención se refiere a un anticuerpo aislado o La invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a CD269 (BCMA) e interrumpe una interacción BAFF-CD269, que comprende un dominio VH y un dominio VL,

en el que dicho dominio VH comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 7, y en el que dicho dominio VH comprende regiones CDR de CDR H1 de acuerdo con la SEQ ID No. 1 (RYWMS), CDR H2 de acuerdo con la SEQ ID No. 2 (EINPDSSTINYAPSLKD) y CDR H3 de acuerdo con la SEQ ID No. 3 (SLYYDYGDAMDYW), y

dicho dominio VL comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 8, y en el que dicho dominio VL comprende regiones CDR de CDR L1 de acuerdo con la SEQ ID No. 4 (KASQSVDSNVA), CDR L2 de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (SASLRFS) y CDR L3 de acuerdo con la SEQ ID No. 6 (QQYNNYPLTFG), y

en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene afinidad a CD269 con un Kd de 54 pM cuando se mide con resonancia de plasmón de superficie (SPR).

La invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a CD269 (BCMA), que comprende un dominio VH de acuerdo con la SEQ ID No. 7 y un dominio VL de acuerdo con la SEQ ID No. 8.

Realizaciones preferidas con respecto al epítipo del anticuerpo

En una realización, por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a CD269 (BCMA), en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende uno o más aminoácidos de los residuos 13 a 32 (los aminoácidos 13 a 32 se muestran en la SEQ ID No. 14) de CD269 (BCMA).

La secuencia de aminoácidos de los residuos 13 a 32 se muestra en la SEQ ID No. 14. La secuencia de terminal N de CD269 se proporciona en la SEQ ID No. 13. El dominio extracelular de CD269 se proporciona como la SEQ ID No. 12.

Se utilizó un antígeno que comprende el dominio extracelular de CD269 de acuerdo con la SEQ ID No. 12 en la vacunación para generar la especificidad de unión del anticuerpo de la presente invención. El uso de la proteína CD269 completa, o fragmentos de la misma que comprenden un dominio unido a la membrana o intracelular, como un antígeno durante la generación de anticuerpos podría producir anticuerpos que se unen a dominios ocultos o intracelulares de CD269, lo que hace que dichos agentes sean inadecuados o desventajosos para la aplicación terapéutica. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención se definen por su unión a la porción extracelular de CD269. El epítipo específico dentro del dominio extracelular también representa un rasgo característico nuevo e inesperado preferido de la invención.

Los fragmentos Fab preparados a partir de una realización de la invención se cristalizaron en complejo con el dominio extracelular BCMA purificado y se resolvió la estructura compleja. El análisis estructural ha revelado información detallada del epítipo del anticuerpo de la presente invención y su relevancia biológica. La unión de un epítipo que comprende uno o más aminoácidos de los residuos 13 a 32 de CD269 (BCMA) del dominio extracelular por el anticuerpo de la presente invención es una propiedad ventajosa, ya que esta región muestra una superposición significativa con los sitios de unión de BAFF y APRIL, los dos ligandos naturales de CD269. Ningún anticuerpo anti-CD269 descrito en la técnica hasta la fecha ha mostrado dicha superposición tan completa con los sitios de unión de BAFF y APRIL.

En una realización el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque el anticuerpo se une a un epítipo que comprende uno o más de los aminoácidos 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 o 32 de CD269 (BCMA). En otra realización el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque el anticuerpo se une a un epítipo que consiste en los aminoácidos 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 y 32 de CD269 (BCMA). Estos residuos representan los aminoácidos que interactúan directamente con el anticuerpo de la presente invención, como se identifica mediante los datos de la estructura cristalina proporcionados en el presente documento. La numeración de estos residuos se ha realizado con respecto a SEQ ID No. 13, que proporciona la secuencia de terminal N de CD269.

En una realización de la invención el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo se caracteriza porque el anticuerpo que se une a (BCMA) interrumpe la interacción de BAFF-CD269 y/o APRIL-CD269.

La unión de los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, J22.9-xi, al dominio extracelular de CD269 interrumpe la interacción BAFF-CD269. Debido al hecho de que los sitios de unión de APRIL y BAFF están ubicados en sitios similares al epítipo del anticuerpo, la unión de J22.9-xi a CD269 también bloqueará la interacción APRIL-CD269. Se considera que las interacciones BAFF/APRIL-CD269 desencadenan señales antiapoptóticas y de crecimiento en la célula, respectivamente (Mackay, Schneider et al. (2003) Annu Rev Immunol 21:231-264; Bossen and Schneider (2006) Semin Immunol 18: 263-275).

La comparación del epítipo específico del anticuerpo de la presente invención con los sitios de unión de APRIL y BAFF, para los cuales se han resuelto las estructuras cristalinas y se han mapeado sus sitios de interacción, revela una superposición completa en los sitios de unión de los ligandos naturales y el anticuerpo como se describió en el presente documento. Esto representa un aspecto beneficioso e inesperado de la invención y permite una interrupción fiable y eficaz de las interacciones BAFF-CD269 y/o APRIL-CD269.

Por lo tanto la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento, en el que el anticuerpo interrumpe la interacción APRIL-CD269 al unir un epítipo que comprende uno o más aminoácidos de los residuos 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 de CD269 (BCMA), en particular, los aminoácidos 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32. Estos aminoácidos corresponden a los sitios de unión de APRIL sobre CD269, y los residuos de superposición de CD269 que se unen tanto al anticuerpo como se describe en el presente documento y APRIL, respectivamente.

Por lo tanto la invención se refiere a en otra realización a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento, en el que el anticuerpo interrumpe interacción BAFF-CD269 al unir un epítipo que comprende uno o más aminoácidos de los residuos 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35 de CD269 (BCMA), en particular, los aminoácidos 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32. Estos aminoácidos corresponden a los sitios de unión de BAFF sobre CD269, y los residuos de superposición de CD269 que se unen tanto al anticuerpo como se describe en el presente documento y BAFF, respectivamente.

Aunque se han descrito en la técnica anticuerpos que se unen a CD269 que también interrumpen potencialmente las interacciones de APRIL o BAFF con CD269, no se proporciona ninguna divulgación relevante en relación con el epítipo específico de dichos anticuerpos. No se puede suponer que los anticuerpos descritos anteriormente también se unan a un epítipo con una superposición tan completa como los anticuerpos de la presente invención. Incluso si se ha mostrado que se interrumpen las interacciones de APRIL o BAFF con CD269 están interrumpidas, esto podría ocurrir potencialmente debido a la unión de un epítipo considerablemente diferente y el posterior impedimento estérico del acoplamiento de APRIL o BAFF. El grado de interrupción de las interacciones de APRIL o BAFF con CD269 causada por los anticuerpos del anterior no se ha documentado previamente.

Los anticuerpos de la presente invención permiten una interrupción eficaz y fiable, lo que potencialmente representa un efecto técnico mejorado en comparación con aquellos anticuerpos descritos en la técnica. Se puede realizar un ensayo de bloqueo in vitro para la determinación y comparación de la interrupción de BAFF y/o APRIL, por ejemplo, con el dominio extracelular de BCMA humano y BAFF o APRIL recombinante.

En una realización preferida, la especificidad del epítipo, en combinación con la alta afinidad mostrada por los anticuerpos descritos en el presente documento, representa un efecto técnico novedoso e inesperado. En esencia, la afinidad excepcionalmente alta de J22.9 en combinación con la superposición de los sitios de unión de BAFF y APRIL, proporciona no solo "interrupción" o "bloqueo" de la unión de los ligandos naturales; sino que la afinidad ultraalta del

anticuerpo de la invención asegura que los ligandos nativos se excluyen esencialmente por completo o casi por completo de unirse a su diana BCMA cuando el anticuerpo está presente.

Como se divulga en los ejemplos a continuación, la afinidad del anticuerpo como se describe en el presente documento es sorprendentemente alta y comparativamente mejor que enfoques similares intentados en la técnica anterior. Un K_d en el rango de pM (como se muestra a continuación) se acepta comúnmente como una afinidad sobresaliente que no se espera en la práctica común.

Realizaciones preferidas con respecto a la secuencia y estructura del anticuerpo.

En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado se caracteriza porque es un anticuerpo quimérico, humanizado, parcialmente humanizado, biespecífico o de cadena sencilla, o una combinación de los mismos.

Los anticuerpos divulgados en los ejemplos de la presente invención se refieren principalmente a un anticuerpo quimérico o parcialmente humanizado, que comprende dominios constantes humanos y dominios VH y VL con especificidad CD269 derivados de ratón. Sin embargo, la invención se refiere a secuencias humanizadas adicionales, especialmente de las regiones de unión VL y VH preferidas, que mantienen las afinidades de ligando apropiadas como se describe en el presente documento.

En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo se caracteriza porque el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende dominios VL y VH obtenidos de un anticuerpo de ratón, en el que dichos dominios VL y VH comprenden secuencias capaces de unirse a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento, y los dominios VL y VH se fusionan con los dominios CL y CH humanos, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo se caracteriza porque los dominios VL y VH están fusionados con los dominios constantes de Ig kappa e IgG1 humana, respectivamente.

Fue completamente sorprendente que las secuencias particulares proporcionadas en el presente documento, preferiblemente las regiones CDR de las regiones VL y VH involucradas en la unión, exhibieran la unión específica y fuerte como se demuestra en los ejemplos experimentales. La mayoría de los anticuerpos con propiedades de unión a CD269 conocidos en la técnica exhiben características de unión inferiores; que son menos específicas y/o que muestran interacciones más débiles con el epítipo del antígeno.

Realizaciones preferidas con respecto al dominio VH

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende al menos una región CDR con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con CDR xH1 (SEQ ID No. 57; X₈YWMS), CDR xH2 (SEQ ID No. 58; EINPDSSTINYAPSLKX₁₁) y/o CDR H3 (SEQ ID No. 3; SLYYDYGDAMDYW), en la que X₈ es R o D y X₁₁ es D o G, y en la que dicho el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento. Las fórmulas generales de secuencia proporcionadas en el presente documento, y en particular las variantes de secuencia determinadas por los residuos variables X₈ y X₁₁, se relacionan con una representación unitaria de secuencias quiméricas, de ratón y/o humanizadas de la invención, en particular del anticuerpo quimérico de ratón descrito en el presente documento.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende al menos una región CDR con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con CDR H1 (SEQ ID No. 1; RYWMS), CDR H2 (SEQ ID No. 2; EINPDSSTINYAPSLKD) y/o CDR H3 (SEQ ID No. 3; SLYYDYGDAMDYW), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos los residuos W33 y S5 de una CDR H1, el residuo E1 de una CDR H2 y los residuos L1, Y2 e Y3 de una CDR H3 no se modifican. Estos residuos corresponden a los residuos W33, S35, E50, L99, Y100 e Y101 de las secuencias VH de J22.9-xi. Estos residuos de las regiones CDR de la cadena pesada están directamente involucrados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias específicas enumeradas, preferiblemente no exhiben modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende regiones CDR de CDR H1 (SEQ ID No. 1; RYWMS), CDR H2 (SEQ ID No. 2; EINPDSSTINYAPSLKD) y CDR H3 (SEQ ID No. 3; SLYYDYGDAMDYW).

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 60 (X₁VQLX₂X₃SGGGLVQPGGSLX₄LSCAASGX₅X₆FX₇X₈YWMSWVRX₉APGKGLEWX₁₀GEINPDSSTINYAPSLKX₁₁X₁₂FX₁₃ISRDNANTLYLQMX₁₄X₁₅X₁₆RX₁₇EDTAX₁₈YYCASLYDYGDAMDYWGQGTGX₁₉VTVSS), en la que X₁: Q, E; X₂: Q, V; X₃: Q, E; X₄: K, R; X₅: I, F; X₆: D, T; X₇: S, D; X₈: R, D; X₉: R, Q; X₁₀: I, V; X₁₁: D, G; X₁₂: K, R; X₁₃: I, T; X₁₄: S, N; X₁₅: K, S; X₁₆: V, L; X₁₇: S, A; X₁₈: L, V; X₁₉: S, L, y en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento. La fórmula de secuencia general proporcionada, y en particular las variantes de secuencia determinadas por los residuos variables X₁ a X₁₉ de la secuencia VH de la SEQ ID No. 60, se refiere a una representación unitaria de secuencias quiméricas, de ratón y/o humanizadas de la invención, en particular del anticuerpo quimérico de ratón descrito en el presente documento.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 7 (QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGIEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYDYGDAMDYWGQGTSTVTVSS), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

En una realización preferida el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se caracteriza porque al menos los residuos W33, S35, W47, E50, L99, Y100, Y101 y A106 de la secuencia VH de la SEQ ID No. 7 no están modificados. Estos residuos de la cadena pesada están directamente implicados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia específica enumerada, preferiblemente no muestran modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado comprende un dominio VH de acuerdo con la SEQ ID No. 7.

Realizaciones preferidas con respecto al dominio VL

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende al menos una región CDR con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con CDR L1 (SEQ ID No. 4; KASQSVDSNVA), CDR xL2 (SEQ ID No. 59; SX₁₄X₁₅LRFS) y/o CDR L3 (SEQ ID No. 6; QQYNNYPLTFG), en la que X₁₄ es A o D y X₁₅ es S o D, y en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento. La fórmula de secuencia general proporcionada, y en particular las variantes de secuencia determinadas por los residuos variables X₁₄ y X₁₅, se refieren a una representación unitaria de secuencias quiméricas, de ratón y/o humanizadas de la invención, en particular del anticuerpo quimérico de ratón descrito en el presente documento.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende al menos una región CDR con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con CDR L1 (SEQ ID No. 4; KASQSVDSNVA), CDR L2 (SEQ ID No. 5; SASLRFS) y/o CDR L3 (SEQ ID No. 6; QQYNNYPLTFG), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos S8, N9, A11 de una CDR L1, los residuos S1, S3, L4, F6 de una CDR L2 y los residuos Q1, Y3, Y6, L8 de una CDR L3. Estos residuos corresponden a los residuos S31, N32, A34, S50, S52, L53, F55, Q89, Y91, Y94 y L96 de las secuencias VL de J22.9-xi. Estos residuos de las regiones CDR de la cadena ligera están directamente involucrados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias específicas enumeradas, preferiblemente no muestran modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende regiones CDR de CDR L1 (SEQ ID No. 4; KASQSVDSNVA), CDR L2 (SEQ ID No. 5; SASLRFS) y CDR L3 (SEQ ID No. 6; QQYNNYPLTFG).

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, identidad de secuencia con la SEQ ID No. 61 (DIVMTQSSX₁X₂X₃X₄X₅X₆SVGDX₇VX₈X₉TCKASQSVDSNVAWYQQKXPX₁₀QX₁₁PKX₁₂LIX₁₃SX₁₄X₁₅LRFGSGVPRFX₁₆GSGSGTDFTLTISX₁₇LQSEDX₁₈AX₁₉YX₂₀CQQYNNYPLTFGAGTKLELK R), en la que X1: Q, P; X2: R, A; X3: F, T; X4: M, L; X5: T, S; X6: T, V; X7: R, E; X8: S, T; X9: V, L; X10: R, G; X11: S, A; X12: A, L; X13: F, Y; X14: A, D; X15: S, D; X16: T, S; X17: N, S; X18: L, F; X19: E, V; X20: F, Y, y en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento. La fórmula de secuencia general proporcionada, y en particular las variantes de secuencia determinadas por los residuos variables X1 a X20 de la secuencia VL de la SEQ ID No. 61, se refieren a una representación unitaria de secuencias quiméricas, de ratón y/o humanizadas de la invención, en particular del anticuerpo quimérico de ratón descrito en el presente documento.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 8 (DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFSASLRFGSGVPRFTGSGSGTDFTLTISNQLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos S31, N32, A34, Y36, F49, S50, S52, L53, F55, G66, S67, Q89, Y91, Y94 y L96 de la SEQ ID No. 8. Estos residuos de la cadena ligera están directamente implicados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia específica enumerada, preferiblemente no exhibe modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VL de acuerdo con la SEQ ID No. 8.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende un dominio VH de acuerdo con la SEQ ID No. 7 y un dominio VL de acuerdo con la SEQ ID No. 8.

Realizaciones preferidas con respecto a variantes de anticuerpos humanizados

Los anticuerpos divulgados en los ejemplos de la presente invención se refieren a un anticuerpo quimérico o parcialmente humanizado, que comprende dominios constantes humanos y dominios VH y VL con especificidad CD269 derivados de ratón. Sin embargo, la invención se refiere a secuencias humanizadas adicionales, especialmente de las regiones de unión VL y VH preferidas, que mantienen las afinidades de ligando apropiadas como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento que es un anticuerpo quimérico, humanizado, parcialmente humanizado, biespecífico o de cadena sencilla, o una combinación de los mismos.

Como se divulga en detalle en el presente documento, la secuencia de las realizaciones preferidas de la invención de acuerdo con J22.9-xi se humanizó para proporcionar un reactivo más compatible para la administración en sujetos humanos. Se han generado y probado varias variantes de secuencia humanizadas de J22.9-xi para determinar su afinidad y especificidad de unión a CD269 (BCMA). Los resultados iniciales de los ensayos de unión demuestran que las secuencias humanizadas mantienen las propiedades de unión deseadas del reactivo quimérico J22.9-xi.

Realizaciones preferidas con respecto al dominio hVH humanizado

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VH comprende al menos una región CDR con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con CDR hH1 (SEQ ID No. 15; DYWMS), CDR hH2 (SEQ ID No. 16; EINPDSSTINYAPSLKG) y/o CDR hH3 (SEQ ID No. 3; SLYYDYGDAMDYW), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos W3 y S5 de CDR hH1, el residuo E1 de CDR hH2 y los residuos S1, L2 e Y3 de CDR hH3. Estos residuos corresponden a los residuos W33, S35, E50, L99, Y100 e Y101 de la secuencia VH de una forma humanizada de J22.9-xi. Estos residuos de las regiones CDR de la cadena pesada están directamente involucrados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de

identidad de secuencia con las secuencias específicas enumeradas, preferiblemente no muestran modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

5 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VH comprende regiones CDR de CDR hH1 (SEQ ID No. 15; DYWMS), CDR hH2 (SEQ ID No. 16; EINPDSSTINYAPSLKG) y CDR hH3 (SEQ ID No. 3; SLYYDYGDAMDYW).

10 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VH comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 18 a 25, en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

15 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos W33, S35, W47, E50, L99, Y100 e Y101 de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID No. 18 a 25. Estos residuos de la cadena pesada están directamente implicados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia específica enumerada, preferiblemente no exhiben modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

25 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH humanizado o parcialmente humanizado de acuerdo con una secuencia de una de las SEQ ID No. 18 a 25.

Realizaciones preferidas con respecto al dominio hVL humanizado

30 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VL comprende al menos una región CDR (preferiblemente las 3) con al menos 80 %, preferiblemente 90 % de identidad de secuencia con CDR hL1 (SEQ ID No. 4; KASQSVDSNVA), CDR hL2 (SEQ ID No. 17; SDDLRFSS) y/o CDR hL3 (SEQ ID No. 6; QQYNNYPLTFG), en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

35 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos S8, N9, A11 de CDR hL1, los residuos S1, L4, F6 de CDR hL2 y los residuos Q1, Y3, Y6, L8 de CDR hL3. Estos residuos corresponden a los residuos S31, N32, A34, S50, L53, F55, Q89, Y91, Y94 y L96 de una forma humanizada de la secuencia VL de J22.9-xi. Estos residuos de las regiones CDR de la cadena ligera están directamente involucrados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias específicas enumeradas, preferiblemente no muestran modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

40 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VL comprende regiones CDR de CDR hL1 (SEQ ID No. 4; KASQSVDSNVA), CDR hL2 (SEQ ID No. 17; SDDLRFSS) y CDR hL3 (SEQ ID No. 6; QQYNNYPLTFG).

45 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL humanizado o parcialmente humanizado, en el que dicho dominio VL comprende una secuencia con al menos 80 %, preferiblemente 90 %, de identidad de secuencia con una secuencia de acuerdo con la SEQ ID No. 26 a 56, en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítipo del dominio extracelular de CD269 (BCMA) como se describe en el presente documento.

50 Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se caracteriza porque al menos no se modifican los residuos S31, N32, A34, Y36, F49, S50, L53, F55, G66, S67, Q89, Y91, Y94 y L96 de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID No. 26 a 56. Estos residuos de la cadena ligera están directamente implicados en las interacciones con el epítipo y, por lo tanto, se deben mantener en la secuencia del anticuerpo. La modificación de aminoácidos fuera de estos residuos particulares se puede llevar a cabo de acuerdo con medidas de rutina conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las variantes de secuencia, que muestran al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia específica enumerada, preferiblemente no exhiben modificación de secuencia en los sitios de interacción con el epítipo y mantienen la especificidad de unión deseada, por lo tanto, se abarcan en la presente invención.

Como parte de la presente divulgación, se divulga un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VL humanizado o parcialmente humanizado de acuerdo con una secuencia de una de las SEQ ID No. 26 a 56.

5 Realizaciones preferidas adicionales de la invención

En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento se caracteriza porque están presentes modificaciones en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 7 a 8, que son sustituciones conservadoras.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento se caracteriza porque están presentes modificaciones en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 7 a 8, que son sustituciones de alanina.

También se divulgan variantes de secuencia de las regiones CDR que se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, para CDR H1 (xxWxS), CDR H2 (Exxxxxxxxxxxxxxx), CDR H3 (LYYxxxxxxxxxx), CDR L1 (xxxxxxxSNxAx), CDR L2 (SxSLxFx) y/o CDR L3 (QxYxxYxLxxx), en la que X es cualquier aminoácido dado, preferiblemente una sustitución conservada o una sustitución de alanina.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos definida por uno o más de los aminoácidos que interactúan directamente con la diana de CD269 y/o uno o más aminoácidos que interactúan a través de interacciones con agua (véase Tablas 1 a 6). El gran número de interacciones de agua involucradas en la unión del anticuerpo al epítipo, como se describe en el presente documento, representa un aspecto inusual y sorprendente de la unión. En particular, la alta afinidad del anticuerpo dirigido al epítipo particular descrito en el presente documento, en combinación con el gran número de interacciones de agua involucradas en la superficie de unión entre el anticuerpo y el epítipo, representa un aspecto sorprendente e inesperado de la invención.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento, por ejemplo, secuencias de acuerdo con la SEQ ID No. 1 a 8, en la que la secuencia se caracteriza por la presencia de residuos de aminoácidos específicos que están implicados en la superficie de interacción con el epítipo diana a través de un puente de agua de acuerdo con la tabla 6, seleccionados del grupo que comprende Ser31, Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 y/o Tyr94 de la cadena ligera, y/o Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 y/o Tyr101 de la cadena pesada.

El anticuerpo de la invención se podría caracterizar adicionalmente por los residuos de aminoácidos del epítipo implicados en la interacción a través de puentes de agua con el anticuerpo como se describe en el presente documento. Las características relevantes se proporcionan en la Tabla 6. Por lo tanto, la invención se caracteriza, por ejemplo, en una realización, porque el residuo Ser31 de la cadena ligera interactúa con Thr32 de CD269 a través de una molécula de agua. Dicha descripción de las propiedades de unión del anticuerpo de la presente invención está prevista para cada interacción, tal como se proporciona en la Tabla 6.

Adicionalmente, las variantes de secuencia de los anticuerpos descritos en el presente documento se incluyen en la presente invención, en la que uno o más residuos implicados en una interacción de "puente de agua" se modifican para "sustituir" una interacción directa de cadena lateral en la secuencia en el gasto de un "puente" de agua. Por ejemplo, se podría realizar una mutación o cambio en la secuencia de aminoácidos desplazando el agua de la interfase de interacción, pero sin afectar sustancialmente la afinidad de la interacción.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento, por ejemplo secuencias de acuerdo con la SEQ ID No. 1 a 8, en las que la secuencia se caracteriza por la variación de secuencia de aquellos residuos de aminoácidos que están implicados en la superficie de interacción con el epítipo diana a través de un puente de agua de acuerdo con la tabla 6, seleccionados del grupo formado por Ser31, Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 y/o Tyr94 de la cadena ligera, y /o Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 y/o Tyr101 de la cadena pesada. La variación en estas posiciones podría relacionarse con cualquier sustitución de aminoácido dada, preferiblemente una sustitución de aminoácido que desplazaría efectivamente el agua de la interacción, pero mantendría propiedades de unión similares con respecto a la afinidad y especificidad del epítipo.

El mantenimiento de los aminoácidos responsables de la unión directa puede conducir a la especificidad de unión como se describe en el presente documento. Las variantes de anticuerpos, en las que se modifican los aminoácidos, que no interactúan directamente con el epítipo diana, también se incluyen en el alcance de la invención.

En el presente documento se divulgan secuencias modificadas de la SEQ ID No. 1 a 3, por lo que la secuencia respectiva no muestra cambio de secuencia en las posiciones Trp33, Glu50, Leu99, Tyr100, Tyr101 y/o Ala106.

En el presente documento se divulgan secuencias modificadas de la SEQ ID No. 4 a 6, por lo que la secuencia respectiva no muestra cambio de secuencia en las posiciones Ser31, Asn32, Ala34, Tyr36, Phe49, Ser50, Ser52, Leu53, Ser67, Phe55, Gln89, Tyr91, Tyr94 y/o Leu96.

- 5 En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado se caracteriza porque el anticuerpo está glicosilado, preferiblemente que comprende una cadena de oligosacárido ligada a N, preferiblemente en Asn297 de la cadena pesada.

10 La glicosilación del anticuerpo se refiere a la unión de carbohidratos o glicanos al anticuerpo. Los glicanos ligados a N se unen al nitrógeno de las cadenas laterales de asparagina o arginina. Las cadenas de carbohidratos unidas a las proteínas diana cumplen varias funciones. Por ejemplo, algunas proteínas no se pliegan correctamente a menos que sean glicosiladas primero. También, los polisacáridos unidos al nitrógeno amídico de la asparagina en la proteína pueden conferir estabilidad a algunas glicoproteínas secretadas. La glicosilación en este caso no es un requisito estricto para el plegamiento adecuado, pero la proteína no glicosilada se puede degradar más rápidamente.

15 Como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la desglicosilación del anticuerpo divulgado allí conduce a una reducción del efecto terapéutico en comparación con las formas glicosiladas del anticuerpo. Fue sorprendente que la glicosilación desempeñara una función importante en el mantenimiento de la actividad del anticuerpo. Por lo tanto, la glicosilación representa una realización preferida de la invención asociada a ventajas técnicas inesperadas.

20 Como se demuestra en los ejemplos del presente documento, aunque la carga tumoral general de los animales tratados con J22.9-xi-N-glicano (desglicosilado) no fue significativamente diferente de los animales que recibieron el anticuerpo de control de isotipo, la vida útil de estos ratones aumentó sustancialmente en comparación con al grupo tratado con isoAb. Dado que se demostró que J22.9-xi-N-glicano no podía inducir ADCC o CDC, este resultado indica que la unión de J22.9-xi a BCMA por sí sola dificulta el crecimiento tumoral. Se puede considerar razonablemente que esto se debe al bloqueo de la interacción entre el receptor y sus ligandos nativos (APRIL y BAFF). Este aspecto de la invención y los anticuerpos descritos en el presente documento representan un efecto técnico sorprendente, que no se podría haber derivado de los anticuerpos de la técnica anterior. El J22.9-xi-N-glicano (desglicosilado) se puede considerar una muestra de control en los experimentos descritos que permite la unión del anticuerpo a su epítipo diana, sin los efectos posteriores de ADCC o CDC, para evaluar los efectos terapéuticos potenciales. Los anticuerpos de la invención, preferiblemente con glicosilación, por lo tanto, demuestran una unión epítipo tan eficaz que permite la prevención (o interrupción significativa) de la unión por los ligandos naturales para conducir a la toxicidad celular. Esta característica de los anticuerpos descritos en el presente documento no se ha descrito para anticuerpos similares descritos en la técnica.

35 Uso y aspectos funcionales de la invención

Se ha demostrado que los anticuerpos de la presente invención se unen a los epítopos descritos en el presente documento, bloquean la interacción de los ligandos naturales de este epítipo, además de inducir CDC y ADCC.

40 La Citotoxicidad Mediada por Células Dependiente de Anticuerpos (ADCC) es un factor inducido por el anticuerpo de la presente invención que genera el efecto terapéutico deseado. La ADCC es un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por células, mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario lisa activamente una célula diana, cuyos antígenos de la superficie de la membrana se han unido a anticuerpos específicos. Después de la unión de células que expresan CD269 por los anticuerpos de la presente invención, puede inducirse ADCC. La ADCC clásica está mediada por células destructoras naturales (NK); los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos también pueden mediar en la ADCC. La ADCC es parte de la respuesta inmunitaria adaptativa debido a su dependencia de una respuesta de anticuerpos previa. Los experimentos en ratones pueden indicar que la ADCC es un importante mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos como se describe en el presente documento.

50 Una realización preferida de la invención se refiere al anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado como se describe en el presente documento para uso como medicamento en el tratamiento de un trastorno médico asociado con la presencia de células B patógenas.

55 En una realización de la invención, el trastorno médico es un trastorno asociado a CD269, preferiblemente asociado a células B patógenas, que es preferiblemente una enfermedad de células plasmáticas y/o células B de memoria.

Una enfermedad de las células plasmáticas puede ser un cáncer de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple, plasmacitoma, macroglobulinemia de Waldenström o leucemia de células plasmáticas. Una enfermedad de las células plasmáticas puede ser un cáncer de los linfocitos B, tal como la enfermedad de Hodgkin.

60 En una realización de la invención, el trastorno médico es una enfermedad autoinmunitaria asociada con células plasmáticas autorreactivas y/o células B de memoria autorreactivas, como una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico o artritis reumática.

Por lo tanto, la invención también abarca un método de tratamiento para los trastornos médicos como se divulga en el presente documento, que comprende preferiblemente la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Los Conjugados de Anticuerpo anti-CD269-Fármaco "ADC anti-CD269" se pueden describir como un anticuerpo anti-CD269 o un fragmento del mismo conjugado con un agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo anti-CD269 (por ejemplo, J22.9-xi o un derivado o fragmento del mismo, que incluye, por ejemplo, una forma quimérica o humanizada del mismo).

Los ADC o derivados de ADC como se describen en el presente documento producen efectos clínicamente beneficiosos en las células que expresan CD269 cuando se administran a un sujeto con una afección médica que expresa CD269, tal como cáncer o trastorno autoinmunitario. En una realización, el anticuerpo anti-CD269 o derivado del mismo se conjuga con un agente citotóxico, de tal manera que el ADC o derivado de ADC resultante ejerza un efecto citotóxico sobre una célula cancerosa que expresa CD269, preferiblemente cuando la célula lo capta o internaliza.

El ADC o derivado de ADC anti-CD269 se internaliza preferiblemente y se acumula dentro de una célula que expresa CD269, donde el ADC o derivado de ADC ejerce un efecto terapéutico (por ejemplo, un efecto citotóxico). Las fracciones particularmente adecuadas para la conjugación con anticuerpos o derivados de anticuerpos son agentes quimioterapéuticos, enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos, o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD269 o derivado del mismo se puede conjugar con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida).

Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico preferiblemente aislada seleccionada del grupo que consiste en:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos

- que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones,

- que comprende una secuencia o fragmento de secuencia de VH2 (SEQ ID No. 9),

- que comprende una secuencia o fragmento de secuencia de VL2 (SEQ ID No. 10); o

b) una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a).

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula huésped, tal como una célula bacteriana o una célula de mamífero, preferiblemente una célula de hibridoma o estirpe celular, capaz de producir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y/o que comprende un ácido nucleico molécula de ácido como se describe en el presente documento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención, una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento o una célula huésped como se describe en el presente documento, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional y sorprendente de la invención es una estabilidad mejorada del anticuerpo como se divulga en el presente documento. El anticuerpo se puede almacenar fácilmente durante períodos prolongados bajo condiciones apropiadas sin pérdida de afinidad de unión. Se han llevado a cabo pruebas apropiadas con respecto al mantenimiento de la actividad después del almacenamiento a -80 o 4 °C, que demuestran una estabilidad inesperadamente buena del anticuerpo y el mantenimiento de la actividad después del almacenamiento en ambas temperaturas mencionadas anteriormente (Fig. 3c).

La producción del anticuerpo de la invención era intrínsecamente difícil y no se podía conseguir mediante métodos de rutina sencillos. Como se muestra en la Figura 7, el hibridoma J22.9 perdió la capacidad de producir/secretar el anticuerpo anti-BCMA con el tiempo (Fig. 7). Debido a esto, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se amplificaron utilizando PCR y posteriormente se clonaron en el extremo 5' de los genes de la cadena ligera IgG1 y K constante humana, respectivamente. A través de la cotransfección de células 293-6E con estos dos plásmidos, finalmente se produjo el anticuerpo J22.9-xi quimérico. Por lo tanto, los métodos de rutina no se pudieron aplicar sin modificaciones. Por lo tanto, la producción del anticuerpo como se describe en el presente documento representa una hazaña técnica de esfuerzo y dificultad significativos, que en sí misma muestra un esfuerzo inventivo.

Una ventaja adicional de los anticuerpos como se describe en el presente documento es el agotamiento sistémico eficaz de las células de mieloma como se demuestra en los ejemplos. No se ha demostrado que los anticuerpos previamente divulgados en la técnica anterior exhiban el efecto anticélulas plasmáticas deseado de manera sistémica. Los estudios realizados sobre los anticuerpos de la técnica anterior divulgan solo la inyección subcutánea de células de mieloma y el tratamiento posterior de la masa celular aislada. La presente invención proporciona un anticuerpo capaz de agotamiento sistémico de células cancerosas de mieloma múltiple después de su inyección i.v., como se demuestra en los ejemplos. El agotamiento efectivo de las células diana representa un efecto técnico que no se ha demostrado previamente en la técnica anterior además de una propiedad beneficiosa de los anticuerpos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" generalmente se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Cuando se utiliza el término "anticuerpo", también se puede considerar que hace referencia al término "fragmento de anticuerpo". Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Se sabe que la unidad estructural básica de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero o dímero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (L) (aproximadamente de 25 kD) y una cadena "pesada" (H) (aproximadamente de 50-70 kD). El terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Los términos "cadena ligera variable" y "cadena pesada variable" se refieren a estas regiones variables de las cadenas ligera y pesada respectivamente. Opcionalmente, el anticuerpo o la porción inmunológica del anticuerpo se pueden conjugar químicamente o expresar como una proteína de fusión con otras proteínas.

Los anticuerpos de la invención están destinados a unirse contra dianas proteicas de mamíferos, en particular humanas. El uso de nombres de proteínas puede corresponder a versiones de ratón o humanas de una proteína.

"Unión específica" se debe entender como a través de un experto en la técnica, por lo que el experto en la técnica es claramente consciente de varios procedimientos experimentales que se pueden utilizar para probar la unión y la especificidad de la unión. Cierta reacción cruzada o unión de fondo puede ser inevitable en muchas interacciones proteína-proteína; esto no es para restar valor a la "especificidad" de la unión entre el anticuerpo y el epítipo. El término "dirigido contra" también es aplicable cuando se considera el término "especificidad" para comprender la interacción entre el anticuerpo y el epítipo.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, fragmentos variables únicos (ssFv), anticuerpos de dominio único (tales como fragmentos VHH de nanocuerpos), fragmentos de cadena única (scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotípicos y fragmentos de unión a epítopos o combinaciones de los mismos de cualquiera de los anteriores, siempre que conserven las propiedades de unión originales. También se pueden utilizar mini-anticuerpos y anticuerpos multivalentes tales como diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos tetravalentes y peptacuerpos en un método de la invención. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (es decir, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se utiliza en el presente documento, también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante.

El anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR de anticuerpos de la invención o una o más CDR derivadas de dichos anticuerpos se pueden elaborar utilizando cualesquier métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo inicial (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural del anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización (3) la humanización real metodologías/técnicas y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 6,180,370; 5,225,539; 6,548,640.

El término anticuerpo humanizado significa que al menos una porción de las regiones marco de una inmunoglobulina deriva o se ajusta a secuencias de inmunoglobulina humana. Las versiones humanizadas, quiméricas o parcialmente humanizadas de los anticuerpos monoclonales de ratón pueden, por ejemplo, elaborarse por medio de tecnología de ADN recombinante, partiendo de secuencias de ADN genómico humano y/o de ratón que codifican cadenas H y L o de clones de ADNc que codifican para cadenas H y L. Se pueden generar formas humanizadas de anticuerpos de ratón al ligar las regiones CDR de anticuerpos no humanos a regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante (Queen et al., 1989; WO 90/07861). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales utilizados en

el método de la invención pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Los anticuerpos humanos se pueden obtener, por ejemplo, utilizando métodos de presentación en fagos (documentos WO 91/17271; WO 92/01047).

Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos humanizados se refieren también a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos, camellos, llamas, tiburones) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a anticuerpos de antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Como se utiliza en el presente documento, anticuerpo humano o humanizado significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos conocidas en el arte o divulgadas en el presente documento. Los anticuerpos humanos se pueden seleccionar mediante experimentos de unión competitiva, o de otro modo, para que tengan la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Es probable que dichos anticuerpos particularmente compartan las útiles propiedades funcionales de los anticuerpos de ratón. Los anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en forma de suero de humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales se pueden concentrar mediante purificación por afinidad utilizando polipéptidos amiloides fibrilares y/o no fibrilares o fragmentos de los mismos como reactivo de afinidad. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de suero de acuerdo con la técnica descrita en el documento WO 99/60846.

El reactivo de afinidad, anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención puede estar PEGilado, en el que la PEGilación se refiere a la unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol (PEG) al anticuerpo inventivo. La PEGilación se puede lograr de forma rutinaria mediante la incubación de un derivado reactivo de PEG con la molécula diana. La PEGilación al anticuerpo puede enmascarar potencialmente al agente del sistema inmunitario del huésped, lo que reduce la inmunogenicidad y la antigenicidad o aumenta el tamaño hidrodinámico del agente, lo que puede prolongar su tiempo circulatorio al reducir la depuración renal.

Una región variable de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de cada cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al. (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Como se utiliza en el presente documento, una CDR se puede referir a las CDR definidas por cualquier enfoque o por una combinación de ambos enfoques.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una CDR, al menos dos, al menos tres o más CDR que son sustancialmente idénticas a al menos una CDR, al menos dos, al menos tres o más CDR del anticuerpo de la invención. Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que son sustancialmente idénticos a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de los anticuerpos de la invención o derivados de los anticuerpos de la invención. En algunas realizaciones, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR son al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a al menos una, dos o tres CDR del anticuerpo de la invención. Se entiende que, para los fines de esta invención, la especificidad de unión y/o la actividad global generalmente se mantienen, aunque el grado de actividad puede variar en comparación con dicho anticuerpo (puede ser mayor o menor).

La vida media y el potencial citotóxico de un anticuerpo dependen principalmente de la interacción del dominio Fc con diferentes receptores gamma Fc. En el caso de la vida media del anticuerpo, el receptor Fc neonatal (FcRn) desempeña una función importante. Este receptor se expresa en varios tipos de células y tejidos, como los monocitos y las células del endotelio vascular, que pueden absorber las proteínas séricas en sus endosomas de reciclaje. En los endosomas, el pH se reduce a aproximadamente 6 y, bajo estas condiciones, los anticuerpos se pueden unir a FcRn. Esta interacción protege a los anticuerpos de la degradación hasta que se liberan nuevamente en la sangre donde el pH fisiológico interrumpe la unión al receptor (Roopenian and Akilesh (2007) *Nat Rev Immunol* 7:715-725). Cuanto mayor sea la afinidad del anticuerpo por el FcRn a pH 6, mayor será la vida media de ese anticuerpo. Las mutaciones del fragmento Fc que se sabe que estabilizan esta interacción se resumen en Presta (2008, *Curr Opin Immunol* 20:460-470).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) también se puede mejorar al fortalecer la unión del dominio Fc a los receptores Fc-gamma activadores (FcγR). Esto también se puede lograr mediante mutaciones en el dominio Fc-gamma como se resume en Presta (2008, *Curr Opin Immunol* 20:460-470).

Otra forma de cambiar la ADCC es la manipulación de la fracción de azúcar presente en cada IgG en Asn297. Se sabe que la defucilación y la eliminación del ácido siálico del extremo de las moléculas de azúcar aumentan el potencial citotóxico de un anticuerpo (Anthony and Ravetch (2010) J Clin Immunol 30 Suppl 1:S9-14).

Las variantes de secuencia de los ácidos nucleicos, proteínas y anticuerpos reivindicados, por ejemplo, definidos por el % de identidad de secuencia reivindicada, que mantienen dichas propiedades de la invención también están incluidas en el alcance de la invención. Dichas variantes, que muestran secuencias alternativas, pero mantienen esencialmente las mismas propiedades de unión, tales como la especificidad de la diana, que las secuencias específicas proporcionadas, se conocen como análogos funcionales o funcionalmente análogos. La identidad de secuencia se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos cuando se lleva a cabo una alineación de secuencia.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima o identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. Las supresiones, sustituciones y otros cambios en la secuencia que caen bajo la identidad de secuencia descrita también se abarcan en la invención.

Las modificaciones de proteínas, que pueden ocurrir a través de sustituciones, también están incluidas dentro del alcance de la invención. Las sustituciones, como se definen en el presente documento, son modificaciones elaboradas en la secuencia de aminoácidos de la proteína, en las que uno o más aminoácidos se reemplazan con el mismo número de (diferentes) aminoácidos, produciendo una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos diferente a la de la proteína primaria, preferiblemente sin alterar significativamente la función de la proteína. Al igual que las adiciones, las sustituciones pueden ser naturales o artificiales. Es bien sabido en la técnica que se pueden realizar sustituciones de aminoácidos sin alterar significativamente la función de la proteína. Esto es particularmente cierto cuando la modificación se refiere a una sustitución de aminoácido "conservadora", que es la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades similares. Dichos aminoácidos "conservados" pueden ser aminoácidos naturales o sintéticos que, debido al tamaño, la carga, la polaridad y la conformación, se pueden sustituir sin afectar significativamente a la estructura y función de la proteína. Con frecuencia, muchos aminoácidos se pueden sustituir por aminoácidos conservadores sin afectar negativamente la función de la proteína.

En general, los aminoácidos no polares Gly, Ala, Val, Ile y Leu; los aminoácidos aromáticos no polares Phe, Trp y Tyr; los aminoácidos polares neutros Ser, Thr, Cys, Gln, Asn y Met; los aminoácidos cargados positivamente Lys, Arg e His; los aminoácidos cargados negativamente, Asp y Glu, representan grupos de aminoácidos conservadores. Esta lista no es exhaustiva. Por ejemplo, es bien sabido que Ala, Gly, Ser y, a veces, Cys se pueden sustituir entre sí aunque pertenezcan a grupos diferentes.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos cribados.

Posibles sustituciones de aminoácidos:

Residuo original	Sustituciones conservadoras preferidas	Ejemplos de sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Asg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn, Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina

Residuo original	Sustituciones conservadoras preferidas	Ejemplos de sustituciones de ejemplo
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran al seleccionar sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal de polipéptidos en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos no se limitan a los aminoácidos de origen natural, sino que también incluyen aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos sintéticos comúnmente utilizados son los aminoácidos omega de diversas longitudes de cadena y la ciclohexilalanina, que son análogos no polares neutros; citrulina y sulfóxido de metionina que son análogos no polares neutros, fenilglicina que es un análogo neutro aromático; ácido cisteico que es un análogo con carga negativa y ornitina que es un análogo de aminoácido con carga positiva. Al igual que los aminoácidos de origen natural, esta lista no es exhaustiva, sino simplemente un ejemplo de las sustituciones que son bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir por transfección de una célula huésped con un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación del anticuerpo de la invención. Se produce un vector de expresión o plásmido recombinante al colocar estas secuencias de codificación para el anticuerpo en asociación operativa con secuencias de control reguladoras convencionales capaces de controlar la replicación y la expresión y/o la secreción de una célula huésped. Las secuencias reguladoras incluyen secuencias promotoras, por ejemplo, promotor CMV y secuencias señal que se pueden derivar de otros anticuerpos conocidos. De manera similar, se puede producir un segundo vector de expresión que tenga una secuencia de ADN que codifique una cadena ligera o pesada de un anticuerpo complementario. En ciertas realizaciones, este segundo vector de expresión es idéntico al primero, excepto en lo que respecta a las secuencias de codificación y los marcadores seleccionables, para garantizar en la medida de lo posible que cada cadena de polipéptidos se exprese funcionalmente. Alternativamente, las secuencias de codificación de cadena ligera y pesada para el anticuerpo pueden residir en un solo vector.

Una célula huésped seleccionada se cotransfecta mediante técnicas convencionales tanto con el primer como con el segundo vector (o simplemente se transfecta con un solo vector) para crear la célula huésped transfectada de la invención que comprende las cadenas ligera y pesada recombinantes o sintéticas. A continuación, la célula transfectada se cultiva mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo diseñado por ingeniería de la invención. El anticuerpo que incluye la asociación tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera recombinantes se criba a partir del cultivo mediante un ensayo apropiado, tal como ELISA o RIA. Se pueden emplear técnicas convencionales similares para construir otros anticuerpos.

Los vectores adecuados para las etapas de clonación y subclonación empleadas en los métodos y la construcción de las composiciones de esta invención se pueden seleccionar por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la serie pUC convencional de vectores de clonación. Un vector, pUC19, está disponible comercialmente. Los componentes de dichos vectores, por ejemplo, los replicones, genes de selección, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares se pueden obtener de fuentes comerciales o naturales o sintetizarse mediante procedimientos conocidos para utilizar en la dirección de la expresión y/o secreción del producto del ADN recombinante en un huésped seleccionado. También se pueden seleccionar para este fin otros vectores de expresión apropiados de los que se conocen numerosos tipos en la técnica para la expresión en mamíferos, bacterias, insectos, levaduras y hongos.

La presente invención también abarca una estirpe celular transfectada con un plásmido recombinante que contiene las secuencias de codificación de los anticuerpos de la presente invención. Las células huésped útiles para la clonación y otras manipulaciones de estos vectores de clonación también son convencionales.

Las células huésped o estirpes celulares adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención incluyen células de mamífero tales como NS0, Sp2/0, CHO (por ejemplo, DG44), COS, HEK, una célula de fibroblastos (por ejemplo, 3T3) y células de mieloma, por ejemplo, se puede expresar en una CHO o una célula de mieloma. Se pueden utilizar células humanas, lo que permite modificar la molécula con patrones de glicosilación humanos. Alternativamente, se pueden emplear otras estirpes celulares procarióticas o eucarióticas. La selección de células huésped adecuadas de mamíferos y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, cribado y producción y purificación de productos son conocidos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-CD269 de la presente invención que se une y neutraliza la actividad del CD269 humano, cuyo método comprende las etapas de; proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo; proporcionar un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo; transformar una célula huésped de mamífero (por ejemplo, CHO) con dichos primer y segundo vectores; cultivar la célula huésped de la etapa (c) bajo condiciones conducentes a la secreción del anticuerpo de dicha célula huésped en dicho medio de cultivo; recuperar el anticuerpo secretado de la etapa (d). Una vez expresado, el anticuerpo se puede analizar en cuanto a las propiedades de unión deseadas utilizando métodos como se describe en el presente documento.

La invención abarca inmunoconjugados (denominados indistintamente como "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas y, en particular, con anticuerpos, tales como los Conjugados de Fármaco-Anticuerpo Anti-CD269 de la presente invención, son bien conocidas. (Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1995); and Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase también, por ejemplo, publicación PCT WO 89/12624).

Normalmente, el ADC o derivado de ADC comprende una región ligadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-CD269 o derivado del mismo. Como se indicó anteriormente, en realizaciones típicas, el ligador se puede escindir bajo condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del ligador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligador se puede escindir mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveolas). El ligador puede ser, por ejemplo, un ligador de peptidilo que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. En otras realizaciones, el ligador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Normalmente, el ligador sensible al pH es hidrolizable bajo condiciones ácidas. En aún otras realizaciones, el ligador se puede escindir en condiciones reductoras (por ejemplo, un ligador disulfuro). Se conocen en la técnica una variedad de ligadores disulfuro (véase, por ejemplo, Wawrzynczak et al., In *Inmunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también Patente de EE. UU. No. 4,880,935.)

Normalmente, el ligador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. En otras realizaciones que no se excluyen mutuamente, el ligador promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio de la fracción de ligador-agente terapéutico del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento). En aún otras realizaciones, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-CD269 o derivado del mismo (es decir, en el medio del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento). Una variedad de ligadores que se pueden utilizar con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004010957 titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" presentado el 31 de julio de 2003 y la Solicitud Provisional de EE. UU. 60/400,403, titulada "Drug Conjugates and their use for treating cancer, an autoimmune disease or an infectious disease", presentada el 31 de julio de 2002 (cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia).

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina de difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la

cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, la alfa-sarcina, las proteínas Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se dispone de una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención también se pueden conjugar con una o más toxinas, que incluyen, pero no se limitan a, una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, una auristatina que incluye dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (MMAF) y monometil auristatina E (MMAE), así como formas de éster de MMAE, un agente de unión al surco menor de ADN, un agente alquilante del surco menor de ADN, una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, que incluye paclitaxel y docetaxel, una puomicina, una dolastatina, un maitansinoide y un alcaloide de la vinca. Los agentes citotóxicos específicos incluyen topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolinodoxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, DM-4, netropsina. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen agentes antitubulina, tales como una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de la bacatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina o una dolastatina. Los agentes antitubulina incluyen dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina (AFP), MMAF, MMAE, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colchimid, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, DM-1, DM-4 o eleuterobina.

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (Patentes de EE.UU. Nos. 5,635,483; 5,780,588). Se ha mostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (Patente de EE.UU. No. 5,663,149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). La fracción del fármaco dolastatina o auristatina (que son derivados pentapeptídicos de dolastatinas) se puede unir al anticuerpo a través del terminal N (amino) o el terminal C (carboxilo) de la fracción de fármaco peptídico (documento WO 02/088172). Las realizaciones de auristatina de ejemplo incluyen las fracciones de fármaco de monometilauristatina ligadas al terminal N DE y DF, divulgadas en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Patente de EE. UU. No. 7,498,298. Como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E. Como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina.

Normalmente, las fracciones de fármacos basados en péptidos se pueden preparar al formar un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

Los maitansinoides se pueden utilizar como un agente activo acoplado al anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención. Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan al inhibir la polimerización de la tubulina. La maytansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental Maytenus serrata (Patente de EE.UU. No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de EE.UU. No. 4,151,042). Los fármacos maitansinoides altamente citotóxicos se pueden preparar a partir de precursores de ansamitocina producidos por fermentación de microorganismos tales como Actinosynnema. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan al ligar químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5,208,020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia para mejorar la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales.

Los ejemplos seleccionados de la familia de antibióticos de caliqueamicina se pueden utilizar como un agente activo acoplado al anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención. La familia de antibióticos caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena en concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véase las Patentes de EE.UU. Nos. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296. Otro fármaco antitumoral al que se puede conjugar el anticuerpo es el QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como el complejo LL-E33288 descrito en la Patente de EE.UU. No. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (Patente de EE. UU. No. 5,877,296). La presente

invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa). Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo.

Un portador farmacéuticamente aceptable en el sentido de la presente invención puede ser cualquier material no tóxico que no interfiera significativamente en un sentido perjudicial con la eficacia de la actividad biológica de los anticuerpos de la presente invención. Evidentemente, las características del portador dependerán de la ruta de administración. Dicha composición puede contener, además de la sustancia activa y el portador, diluyentes, agentes de carga, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por aquellos expertos en la técnica, al igual que el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

El medicamento, también conocido como composición farmacéutica, que contiene el ingrediente activo (anticuerpo o fragmento de anticuerpo) puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los comprimidos contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregación, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas para retardar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para aplicación tópica, ingestión oral, inhalación o inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. Un experto en la materia conoce los portadores y aditivos necesarios para formas de aplicación particulares.

Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la sustancia activa (anticuerpo o fragmento de anticuerpo) de la invención mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la sustancia activa puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos.

La invención también se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente relevante de anticuerpo como se describe en el presente documento en el tratamiento de un sujeto que tiene los trastornos médicos como se divulga en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente. La cantidad de sustancia activa en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando, y de la naturaleza de los tratamientos previos a los que se haya sometido el paciente. Se pueden administrar dosis mayores hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese momento la dosificación no se incrementa adicionalmente.

La preparación de dichas soluciones aceptables por vía parenteral, que tenía debidamente en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro de los conocimientos de la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además del principio activo, un vehículo isotónico tal como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer lactato u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizadores, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Evidentemente, la dosis del anticuerpo administrado depende de numerosos factores bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la naturaleza química y formulación farmacéutica del anticuerpo, y peso corporal, superficie corporal, edad y sexo del paciente, así como el tiempo y ruta de administración. Para un adulto, la dosis puede estar, a modo de ejemplo, entre 0,001 µg y 1 g por día, preferiblemente entre 0,1 µg y 100 mg por día, more preferiblemente entre 1 µg y 100 mg por día, incluso más preferiblemente entre 5 µg y 10 mg por día. En una infusión continua, la dosis puede estar, por ejemplo, entre 0,01 µg y 100 mg, preferiblemente entre 1 µg y 10 mg por kilogramo de masa corporal por minuto.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por células B o células plasmáticas o una enfermedad o trastorno mediado por anticuerpos seleccionado de Mieloma Múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple no secretor, mieloma múltiple latente, gammapatía monoclonal de significado incierto

(MGUS), plasmacitoma solitario (óseo, extramedular), linfoma linfoplasmocitario (LPL), macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia de células plasmáticas, Amiloidosis primaria (AL), enfermedad de cadenas pesadas, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome POEMS/mieloma osteosclerótico, crioglobulinemia tipo I y II, enfermedad por depósito de cadenas ligeras, síndrome de Goodpasture, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), glomerulonefritis aguda, trastornos de pénfigo y penfigoide, y Epidermólisis ampollosa adquirida; o cualquier linfoma no Hodgkin, leucemia de células B o linfoma de Hodgkin (HL) con expresión de BCMA o cualquier enfermedad en la que los pacientes desarrollen anticuerpos neutralizantes para la terapia de reemplazo de proteínas recombinantes, en el que dicho método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo como se describe en el presente documento.

Los trastornos de células B se pueden dividir en defectos del desarrollo de células B/producción de inmunoglobulina (inmunodeficiencias) y proliferación excesiva/incontrolada (linfomas, leucemias). Como se utiliza en el presente documento, trastorno de células B se refiere a ambos tipos de enfermedades, y se proporcionan métodos para tratar trastornos de células B con un anticuerpo.

En un aspecto de la presente invención, la enfermedad es mieloma múltiple.

También se proporciona el uso del anticuerpo como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, en un aspecto de la invención, se proporciona el uso del anticuerpo como se describe en el presente documento para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades y trastornos sensibles a la modulación (tal como inhibición o bloqueo) de la interacción entre BCMA y los ligandos BAFF y APRIL.

En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado está destinado para uso en el tratamiento de cánceres de linfocitos B, tal como el linfoma de Hodgkin.

En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado está destinado para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, tal como un trastorno médico asociado con inflamación, preferiblemente una enfermedad autoinmunitaria con un componente inflamatorio, por lo que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de Takayasu Arteritis, arteritis de células gigantes, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, poliarteritis nodosa cutánea, arteritis asociada a hepatitis, síndrome de Behcet, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, poliangitis microscópica, vasculitis de enfermedades del tejido conjuntivo, púrpura de Hennoch-Schönlein, vasculitis crioglobulinémica, angitis leucocitoclástica, aortitis tropical, Sarcoidosis, Síndrome de Cogan, Síndrome de Wiskott-Aldrich, arteritis lepromatosa, angitis primaria del SNC, Tromboangitis obliterante, Ateritis paraneoplásica, Urticaria, enfermedad de Deigo, síndrome mielodisplásico, Erythema elevatum diutinum, Hiperinmunoglobulina D, Rinitis alérgica, Asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, periodontitis, artritis reumatoide, aterosclerosis, amiloidosis, Morbus Chron, colitis ulcerosa, miositis autoinmunitaria, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, histiocitosis, osteoartritis, dermatitis atópica, periodontitis, rinosinusitis crónica, psoriasis, artritis psoriásica, colitis microscópica, fibrosis pulmonar, glomerulonefritis, enfermedad de Whipple, enfermedad de Still, eritema nodoso, otitis, crioglobulinemia, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso, anemia aplásica, osteomielofibrosis, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad de Kimura, esclerosis sistémica, periaortitis crónica, prostatitis crónica, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad granulomatosa crónica, acalasia idiopática, inflamación pulmonar inducida por bleomicina, inflamación pulmonar inducida por citarabina, autoinmuntrombocitopenia, autoinmunoneutropenia, anemia autoinmunhemolítica, autoinmuninfocitopenia, enfermedad de Chagas, tiroiditis autoinmunitaria crónica, hepatitis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis atrópica, enfermedad de Graves, síndrome poliglandular autoinmunitario, síndrome de Addison autoinmunitario, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitíligo, síndrome de antifosfolípido, miastenia grave, síndrome del hombre rígido, síndrome de Goodpasture, oftalmía simpática, foliculitis, síndrome de Sharp y/o síndrome de Evans, en particular fiebre del heno, periodontitis, aterosclerosis, artritis reumatoide, preferiblemente artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

Secuencias de la invención que pertenecen a la secuencia del anticuerpo quimérico:

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 1	RYWMS	CDR H1
SEQ ID No. 2	EINPDSSTINYAPSLKD	CDR H2
SEQ ID No. 3	SLYYDYGDAMDYW	CDR H3
SEQ ID No. 4	KASQSVDSNVA	CDR L1
SEQ ID No. 5	SASLRFS	CDR L2
SEQ ID No. 6	QQYNNYPLTFG	CDR L3
SEQ ID No. 7	QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTSVTVSS	Ratón con VH

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 8	DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAVYQQKP RQSPKALIFASLRFSGVPARFTGSGSGDTFTLTISNLQS EDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	Ratón con VL
SEQ ID No. 9	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGC CTGGAGGATCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGAAT CGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTTCCGCGGGCT CCAGGGAAAGGACTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAG ATAGCAGTACAATAAACTATGCACCATCTCTAAAGGATAA ATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGTTGTAC CTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTT ATTACTGTGCAAGTCTCTACTATGATTACGGGGATGCTAT GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	Nucleótido de VH
SEQ ID No. 10	GACATTGTGATGACTCAGTCTCAAAGATTCATGACCACAT CAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCA GAGTGTGGATAGTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCT CGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTTCTCGGCATCCCTCC GGTTCAGTGGAGTCCCTGCTCGCTTCACAGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAGTCT GAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAACAATATAACAAC ATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA ACGT	Nucleótido de VL2

Secuencias que pertenecen a CD269 (BCMA):

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 11	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDK WRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMALIRYIADKHN MLGGCPKERAELSMLEGAVLDIRYGVSRAYSDFETLKV DFLSKLPKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDMFLYDALD VVLYMDPMCLDAFFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSMAGQCSQNEYFDSL LHACIPQQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALEH HHHHH	GST-BCMA-His
SEQ ID No. 12	MAGQCSQNEYFDSLHACIPQQLRCSSNTPPLTCQRYCNA SVTNSVKGTNALE	Dominio extracelular de BCMA
SEQ ID No. 13	MLQ MAGQCSQNEYFDSLHACIPQQLRCSSNTPPLTCQRY CNASVTNSVKGTNALE	Secuencia de terminal N de BCMA
SEQ ID No. 14	YFDSLHACIPQQLRCSSNT	Epítipo de anticuerpo de BCMA - aminoácidos 13 a 32 de BCMA

Secuencias que pertenecen a la secuencia del anticuerpo humanizado:

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 15	DYWMS	CDR hH1
SEQ ID No. 16	EINPDSSTINYAPSLKG	CDR hH2
SEQ ID No. 3	LYYDYGDMADYWG	CDR (h)H3
SEQ ID No. 4	KASQSVDSNVA	CDR (h)L1
SEQ ID No. 17	SDDLRFSS	CDR hL2
SEQ ID No. 6	QQYNNYPLTFG	CDR (h)L3

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 18	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-0
SEQ ID No. 19	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-1
SEQ ID No. 20	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-2
SEQ ID No. 21	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRRA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-3
SEQ ID No. 22	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-4
SEQ ID No. 23	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRRA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-5
SEQ ID No. 24	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRRA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-6
SEQ ID No. 25	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRRA PGKGLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSS	hVH-7
SEQ ID No. 26	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-0
SEQ ID No. 27	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-1
SEQ ID No. 28	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-2
SEQ ID No. 29	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIYSASLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-3
SEQ ID No. 30	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-4
SEQ ID No. 31	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-5
SEQ ID No. 32	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIYSASLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-6
SEQ ID No. 33	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-7
SEQ ID No. 34	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIYSASLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-8

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 35	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-9
SEQ ID No. 36	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIYSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-10
SEQ ID No. 37	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIYSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-11
SEQ ID No. 38	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIYSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-12
SEQ ID No. 39	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIYSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-13
SEQ ID No. 40	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIYSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-14
SEQ ID No. 41	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIYSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-15
SEQ ID No. 42	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-16
SEQ ID No. 43	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-17
SEQ ID No. 44	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-18
SEQ ID No. 45	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-19
SEQ ID No. 46	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-20
SEQ ID No. 47	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-21
SEQ ID No. 48	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIFSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-22
SEQ ID No. 49	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-23
SEQ ID No. 50	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIFSASLRFGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-24
SEQ ID No. 51	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIFSDDLRFSGVPPARFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-25

SEQ ID No.	Secuencia	Descripción
SEQ ID No. 52	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKLLIFASLRFGVGPARGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-26
SEQ ID No. 53	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFASLRFGVGPARGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-27
SEQ ID No. 54	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKALIFSDDLRFSGVGPARGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-28
SEQ ID No. 55	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQSPKLLIFASLRFGVGPARGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-29
SEQ ID No. 56	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKP GQAPKALIFASLRFGVGPARGSGSGTDFTLTISLQS EDFAEYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hVL-30

Secuencias que pertenecen a las fórmulas generales unitarias para las secuencias quiméricas, de ratón y/o humanizadas:

SEQ ID No. 57	XYWMS	CDR xH1
SEQ ID No. 58	EINPDSSTINYAPSLKX	CDR xH2
SEQ ID No. 59	SXXLRFS	CDR xL2
SEQ ID No. 60	XVQLXXSGGGLVQPGGSLXLSCAASGX ₅ FX ₇ X ₈ YV PGKGLEWXGEINPDSSTINYAPSLKXXFXISRDNAKNT LQMX ₁₃ XXRXEDTAXYYCASLYDYGDAMDYWGQGTXTVTV X ₁ VQLX ₂ X ₃ SGGGLVQPGGSLX ₄ LSCAASGX ₅ FX ₇ X ₈ YV SWVRX ₉ APGKGLEWX ₁₀ GEINPDSSTINYAPSLKX ₁₁ X ₁₂ 13ISRDNAKNTLYLQMX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ RX ₁₇ EDTAX ₁₈ YYCASL DYGDAMDYWGQGTXT ₁₉ VTVSS	xVH - Fórmula de secuencia general para las secuencias de VH de ratón y humanizadas xVH con residuos X enumerados
SEQ ID No. 61	DIVMTQSPXXXXXSVGDVXXXTCKASQSVDSNVAWYQQ XQXPX ₁ LIXSXXLRFGVGPARGSGSGTDFTLTISX EDXAXYXCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	xVL - Fórmula de secuencia general para las secuencias de VL de ratón y humanizadas
	DIVMTQSPX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ SVGDV ₇ VX ₈ X ₉ TCKASQSVDSN WYQQKPx ₁₀ QX ₁₁ PKX ₁₂ LIX ₁₃ SX ₁₄ X ₁₅ LRFGVGPARGX ₁₆ GSGTDFTLTISX ₁₇ LQSEDX ₁₈ AX ₁₉ YX ₂₀ CQQYNNYPLTF AGTKLELKR	xVL con residuos X enumerados

Secuencias que pertenecen a dominios constantes humanos:

SEQ ID No. 62	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Ig Kappa humana: Utilizada en J22.9-xi (http://www.uniprot.org/uniprot/P01834)
---------------	--	--

SEQ ID No. 63	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYT QKSLSLSPGK	Ig Gamma-1 humana: (http://www.uniprot.org/uniprot/P01857)
SEQ ID No. 64	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYT QKSLSLSPGK	Ig Gamma-1 humana: Utilizada en J22.9-xi

FIGURAS

La invención se demuestra a modo de ejemplo mediante los ejemplos y figuras divulgados en el presente documento. Las figuras proporcionadas en el presente documento representan realizaciones particulares de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se debe considerar que las figuras proporcionan una descripción adicional de realizaciones posibles y potencialmente preferidas que mejoran el soporte técnico de una o más realizaciones no limitantes.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Caracterización in vitro de J22.9-xi.

Figura 2: La estructura de CD269 (BCMA) y el complejo J22.9-xi Fab:CD269

Figura 3: Citotoxicidad in vitro de J22.9-xi.

Figura 4: Eficacia de J22.9-xi en ratones NSG xenoinjertados.

Figura 5: Tratamiento de tumores establecidos.

Figura 6: Tratamiento del tumor en la fase temprana de la enfermedad.

Figura 7: Inestabilidad del hibridoma J22.9.

Figura 8: Resumen de las secuencias del anticuerpo quimérico de acuerdo con J22.9-xi.

Figura 9: Resumen de las secuencias de las secuencias humanizadas de J22.9-xi.

Descripción detallada de las figuras:

Figura 1: Caracterización in vitro de J22.9-xi. Unión dependiente de la concentración de J22.9-xi a BCMA en (a) ELISA y (b) mediante citometría de flujo utilizando células MM.1S positivas a CD269. (c) La afinidad de unión de J22.9-xi a BCMA se determinó a partir de mediciones de resonancia de plasmones de superficie con las concentraciones indicadas de BCMA. (d) J22.9-xi bloquea la interacción entre BAFF y BCMA adsorbidos en placas de microtitulación.

Figura 2: (a) Superficie de reconocimiento de CD269 (BCMA). Tres vistas del dominio extracelular de CD269 (BCMA) que muestran los residuos del epítipo de unión para BAFF/APRIL y J22.9-xi. En la parte superior, una vista directamente en la cara de unión de CD269 (BCMA): el sombreado gris claro indica todos los residuos que comprenden el epítipo de unión de BAFF y APRIL identificados a partir de sus estructuras cristalinas, los residuos negros (que se muestran como esferas) no entran en contacto con BAFF, APRIL o J22.9-xi; el subconjunto de residuos de epítipos implicados en la unión de J22.9-xi se muestra en representación superficial; los residuos de color gris claro restantes mostrados como esferas son parte de los epítipos BAFF y APRIL pero no hacen contacto directo con J22.9-xi. Los

paneles central e inferior muestran la misma representación que en el panel superior, pero girados 90° hacia y desde el espectador, respectivamente. (b) Dos vistas del complejo J22.9-xi Fab:CD269. J22.9-xi se muestra en representación superficial con la cadena pesada en color gris claro y la cadena ligera en gris oscuro. CD269 (BCMA) se muestra en representación de cinta unida al bolsillo del antígeno J22.9-xi. A la izquierda, vista completa del complejo Fab:CD269; a la derecha, el complejo se inclinó hacia el espectador para mostrar el bolsillo de encuadernación.

Figura 3: Citotoxicidad in vitro de J22.9-xi. (a) Se incubaron células MM.1S-Luc positivas a CD269 mezcladas con PBMC humanas en una relación de efector a diana de 20:1 con las concentraciones indicadas de J22.9-xi durante 4 horas. Los símbolos abiertos indican la actividad citotóxica de J22.9-xi sin N-glicanos cuando se incubaba con PBMC de los donantes 1 y 2. Las barras de error indican EEM. (b) La desglicosilación no afecta la unión de J22.9-xi a las células MM.1S. (c) El almacenamiento de J22.9-xi durante 3 semanas a 4 °C o -80 °C no afecta la citotoxicidad.

Figura 4: Eficacia de J22.9-xi en ratones NSG xenoinjertados. (a) Desarrollo tumoral a lo largo del tiempo con la administración de 200 µg de J22.9-xi o el anticuerpo de control dos veces por semana y ratones de control sin tratar. (b) Carga tumoral total entre los días 6 y 41 (Área bajo la curva (AUC) de (a)). Se grafican los valores medios con EEM (**P < 0,01, ***P < 0,001, prueba t). (c) Supervivencia general de J22.9-xi y ratones de control de isotipo. El valor de P se calculó utilizando la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). (d-1) Detección de células MM.1S-Luc en los grupos indicados sin administración de anticuerpo terapéutico. Debajo de la imagen más a la derecha, los números (41, 41, 44, 40) indican los días posteriores a la inyección de células tumorales en los que murió el ratón específico. (d-2) Detección de células MM.1S-Luc en los grupos indicados en el día 21 y 28. Vista dorsal. (e) Relación entre la concentración de J22.9-xi y el desarrollo tumoral. (f) Carga tumoral total entre los días 6 y 42 (AUC de (e)). Valores medios con EEM (**P < 0,01, ***P < 0,001, prueba t). (g) Descripción general de la línea de tiempo experimental.

Figura 5: Tratamiento de tumores establecidos. (a) Desarrollo tumoral a lo largo del tiempo con la administración de 200 µg de J22.9-xi o anticuerpo de control dos veces por semana y ratones de control sin tratar. (b) Carga tumoral total entre los días 8 y 48 (AUC de (a)). Se grafican los valores medios con EEM (*P < 0,05, **P < 0,01, prueba t). (c) Supervivencia general de J22.9-xi y ratones de control de isotipo. El valor de P se calculó utilizando la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). En la Fig. 5d se proporciona una descripción general de la línea de tiempo experimental.

Figura 6: Tratamiento del tumor en la fase temprana de la enfermedad. (a) Curso de crecimiento tumoral cuando se trata con 2 µg, 20 µg o 200 µg de J22.9-xi o 200 µg del anticuerpo de control de isotipo o J22.9-xi sin N-glicanos y sin tumor. (b) Carga tumoral total entre los días 9 y 44 (AUC de (a)). Se muestran los valores medios con EEM (*P < 0,05, **P < 0,01, prueba t). (c) Supervivencia de ratones SCID-Beige con xenoinjerto de control y tratados con anticuerpos. Los valores de P se calcularon utilizando la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). En la Fig. 6d se proporciona una descripción general de la línea de tiempo experimental.

Figura 7: Inestabilidad del hibridoma J22.9. El sobrenadante del hibridoma J22.9 dio positivo en la unión a BCMA en ELISA en placas de microtitulación recubiertas con BCMA en el día 1. El análisis posterior en los puntos de tiempo indicados reveló una reducción de la capacidad de unión del sobrenadante. El medio se intercambiaba los días 7, 14 y 21.

Figura 8: Resumen de las secuencias del anticuerpo quimérico de acuerdo con J22.9-xi

Figura 9: Resumen de las secuencias de las secuencias humanizadas de J22.9-xi (Negro: Aminoácidos cambiados por secuencia humana, subrayado: regiones CDR).

EJEMPLOS

La invención se demuestra por medio de los ejemplos divulgados en el presente documento. Los ejemplos proporcionados en el presente documento representan solo realizaciones particulares de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se debe considerar que los ejemplos proporcionan una descripción adicional de realizaciones posibles y potencialmente preferidas que mejoran el soporte técnico de una o más realizaciones no limitativas.

Características de unión y bloqueo de la interacción J22.9-xi y BCMA

El nuevo anticuerpo quimérico (J22.9-xi) se une al dominio extracelular de CD269 humano (BCMA, TNFRSF17). Esto se comprobó inicialmente mediante ELISA y citometría de flujo en la estirpe celular de mieloma múltiple humano MM.1S (Fig. 1a,b). La afinidad de J22.9-xi por BCMA se determinó mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR). El Kd medio es 54 pM como se muestra en la Figura 1c.

Se sabe que BCMA desencadena señales importantes para la supervivencia de mieloma múltiple y células plasmáticas *in vivo* a través de la interacción con sus ligandos BAFF y/o APRIL (Mackay F et al. (2003) Annu Rev Immunol 21:231-264). Por lo tanto, se realizó un ensayo de bloqueo in vitro con el dominio extracelular de BCMA humana y BAFF recombinante. La unión de J22.9-xi a BCMA bloquea claramente la interacción entre el receptor y su ligando BAFF. Utilizando el anticuerpo de control de isotipo en lugar de J22.9-xi, la unión de BAFF recombinante a BCMA no se ve afectada (Fig. 1d).

La estructura cristalina del complejo J22.9-xi-Fab-BCMA revela una amplia interfaz de unión con BCMA

Los fragmentos Fab preparados a partir de J22.9-xi se cristalizaron en complejo con el dominio extracelular BCMA de 46 residuos de aminoácidos purificado y la estructura compleja se resolvió a una resolución de 1,9 ángstroms. La densidad electrónica de alta calidad es observable para los residuos 6 a 41 de BCMA y muestra una amplia interacción con J22.9-xi, principalmente con la cadena ligera del anticuerpo (Fig. 2B). Esta interfaz, que entierra 74,4 ángstroms cuadrados e involucra un tercio de los residuos de BCMA, cubre 12 de los 16 residuos del epítipo idéntico observado en las estructuras cristalinas de los complejos de BMCA con APRIL y sTALL1 (también conocido como BAFF), que incluye el motivo DxL conservado (Gordon N C, et al. (2003), BAF/BlysS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 42(20): 5977-83, y Patel D R, et al. (2004), Engineering an APRIL-specific B Cell Maturation Antigen. *JBC* 279(16): 16727-35), que proporciona una clara racionalización del efecto de bloqueo observado en los ensayos *in vitro* con BAFF (Fig. 2A). La interacción con J22.9-xi comprende adicionalmente un contacto directo de cadena lateral con Ala20 y Pro23 en BCMA, residuos que no forman parte del epítipo de unión cubierto por BAFF y APRIL, y varios enlaces de hidrógeno mediados por agua. La conformación general de BCMA en las tres estructuras es muy similar, con un C-alfa rmsd de 1,4 ángstroms entre los complejos J22.9-xi y APRIL y 1,5 ángstroms entre los complejos J22.9-xi y sTALL1; las respectivas C-alfa rmsds para el epítipo de unión J22.9-xi BCMA (residuos 13 - 30) son 0,98 y 0,88 ángstroms. Aunque reconoce el mismo epítipo BCMA que tiene el motivo DxL en su núcleo, el sitio de unión de J22.9-xi es muy diferente de los de sTALL1 y APRIL, al igual que la colección de interacciones que comprende la interfaz.

Como se puede ver en la Fig. 2B y la Tabla 1 y 2, 19 aminoácidos de J22.9-xi (6 de la cadena pesada (Tabla 1), 13 de la cadena ligera (Tabla 2)) forman ligamientos directos a 12 residuos del dominio extracelular de CD269.

Tabla 1: Lista de interacciones de aminoácidos entre la cadena pesada de J22.9-xi y BCMA. Estas listas de interacción se generaron utilizando el software PDBsum (Laskowski R A (2009)).

Cadena pesada		CD269
Trp33	>	His19
Glu50	>	His19
Leu99	>	Leu17
	>	Leu18
Tyr100		Leu18
Tyr101	>	Ala20
	>	Ile22
	>	Pro23
Ala106	>	Leu18

Tabla 2: Lista de interacciones de aminoácidos entre la cadena ligera de J22.9-xi y BCMA. Estas listas de interacción se generaron utilizando el software PDBsum (Laskowski R A (2009)).

Cadena ligera		CD269
Ser31	>	Arg27
		Thr32
Ala34	>	Leu17
Tyr36	>	Leu17
Phe49	>	Leu18
		Asp15
Ser50	>	Tyr13
		Asp15
		Arg27
Ser52	>	Arg27
Ser67	>	Thr32
Leu53	>	Tyr13
		Leu26
		Arg27
Phe55	>	Leu18
Gln89	>	Leu17
Tyr91	>	Asp15
		Ser16
		Leu17
Tyr94	>	His19
Leu96	>	Leu17

Tabla 3: Lista de interacciones de los residuos involucrados en la unión de CD269:APRIL y CD269:BAFF (los residuos NO contactados directamente por J22.9 están subrayados). Estas listas de interacción se generaron utilizando el software PDBsum (Laskowski R A (2009)).

APRIL	CD269
Asp121	<u>Leu35</u>
Asp123	<u>Pro33</u>
	<u>Pro34</u>
	<u>Leu35</u>
Asp164	<u>Asn31</u>
Thr166	<u>Arg27</u>
	<u>Ser30</u>
Phe167	<u>Tyr13</u>
	<u>Leu18</u>
	<u>Ile22</u>
	<u>Leu26</u>
	<u>Arg27</u>
	<u>Asn31</u>
Thr168	<u>Leu18</u>
	<u>Leu26</u>
Met169	<u>Leu17</u>
Gly170	<u>Leu17</u>
	<u>His19</u>
Gln171	<u>Leu17</u>
Arg 186	<u>Leu17</u>
	<u>Leu18</u>
	<u>His19</u>
Cys187	<u>Leu17</u>
Ile188	<u>Asp15</u>
	<u>Leu17</u>
	<u>Leu18</u>
Asp196	<u>Leu26</u>
Arg197	<u>Leu26</u>
Tyr199	<u>Leu18</u>
Pro221	<u>Leu17</u>
	<u>His19</u>
Arg222	<u>Asp15</u>
	<u>Leu17</u>
	<u>Arg27</u>
Asn224	<u>Thr32</u>
Lys226	<u>Asn31</u>
APRIL	<u>CD269</u>
His232	<u>His19</u>
BAFF	CD269
Tyr22	<u>Ser16</u>
Asp62	<u>Asn31</u>
Lys63	<u>Ser30</u>
	<u>Asn31</u>
Thr64	<u>Arg27</u>
	<u>Ser30</u>
	<u>Asn31</u>
Tyr65	<u>Tyr13</u>
	<u>Asp15</u>
	<u>Leu18</u>
	<u>Ile22</u>
Ala66	<u>Leu17</u>
Met67	<u>Leu17</u>
Gly68	<u>Leu17</u>
Arg90	<u>Leu17</u>
	<u>His19</u>
Cys91	<u>Leu17</u>

Ile92	Leu17
	Leu18
Glu97	Ser29
	Ser30
	Asn31
Leu99	Ile22
	Leu26
Asn101	Leu18
Pro123	Ser16
	Leu17
Arg124	Tyr13
	Asp15
	Leu17
	Arg27
Glu125	Arg27
	Thr25
	Pro34
	Leu35
BAFF	CD269
Asn126	Thr32
Asp132	His19

Tabla 4: Los residuos del objetivo CD269 directamente contactados solo por J22.9 y/o BAFF. Se subrayan los residuos de la diana CD269 contactados directamente solo por J22.9 (20, 23). Los residuos de la diana CD269 NO directamente contactados por J22.9 están en negrita (30, 31, 33, 34, 35 para APRIL; 25, 29, 30, 31, 34, 35 para BAFF).

J22.9: 13, 15, 16, 17, 18, 19, <u>20</u> , 22, <u>23</u> , 26, 27, 32
APRIL: 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35
BAFF: 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25 , 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35

Tabla 5: Recolección de datos y estadísticas de refinamiento (reemplazo molecular) para los datos de la estructura cristalina:

J22.9-xi:BCMA		
Recopilación de datos		
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensiones de celda	a, b, c (Å)	72,801, 110,139, 137,279
	α , β , γ (°)	90, 90, 90
Resolución (Å)		1,78 (2,09)*
R _{sym}		16,2 (69,9)
I/ σ I		12,8 (3,04)
Compleitud (%)		99,9 (99,4)
Redundancia		6,7 (6,7)
Refinamiento		
Resolución (Å)		1,89
No. de reflexiones		87918
R _{trabajo} /R _{libre}		0,182/0,216
Moléculas por unidad asimétrica		2 cadenas pesadas (H, A), 2 cadenas ligeras (L, B), 2 BCMA (F, K)
No.		

Factores B	Proteína	7160
	Ligando/ion	2 Bis Tris/3 Cu ²⁺
	Agua	726
Desviaciones R.m.s.	Proteína	22,14
	Ligando/ión	37,1/35,9
	Agua	27,2
	Longitudes de enlace (Å)	0,013
	Ángulos de enlace (°)	1,16

* Los valores entre paréntesis son para la capa de mayor resolución.

Tabla 6: Interacciones del agua J22.9 (J22.9-xi:H2O:CD269). Los datos de la tabla 6 se generaron utilizando el software LigPlot (Wallace and Laskowski, Instituto Europeo de Bioinformática). (sc = enlace H de cadena lateral; mc = enlace H de cadena principal)

Cadena ligera	H ₂ O#	CD269
Ser31 (sc)	285	Thr32 (sc, mc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Ser31 (mc)	283,284	Arg27 (sc)
Asn32 (sc)	105	Asp15 (sc)
	105, 284	Arg27 (sc)
	56	Ser16 (sc)
Tyr36	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Ser50 (sc)	105	Asp15 (sc)
Ser52 (sc)	286	Ser30 (sc)
	286	Arg27 (sc)
	286, 285	Thr32 (sc, mc)
Gly66 (mc)	287	Thr32 (sc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Gln89 (sc)	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Tyr91 (mc)	282	Ser16 (sc)
	282, 281	Ser16 (mc)
Tyr94 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281, 282	Ser16 (sc)
Cadena pesada	H ₂ O#	CD269
Trp33 (mc)	42, 280	Leu17 (mc)
	183,279,26	Leu18 (mc)
Ser35 (sc)	42, 66, 93, 280, 450	Leu17 (mc)
Trp47 (sc)	93, 450	Leu17 (mc)
Glu50 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281,282	Ser16 (sc)
	450	Leu 17 (mc)
	450, 280	Leu 17 (mc)
Leu99 (mc)	280	Leu17 (mc)
Tyr101 (mc)	26	Leu18 (mc)

La fuerte eficacia citotóxica de J22.9-xi disminuye considerablemente después de la desglicosilación

Se estableció un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa utilizando la estirpe celular MM.1S-Luc transducida con luciferasa. En este ensayo, la bioluminiscencia solo se detecta en las células vivas, ya que la luciferasa liberada por las células muertas no puede funcionar debido a la falta de ATP en el medio. Se aislaron PBMC de donantes sanos y se mezclaron con células MM.1S-Luc en una relación de 20 a 1. Después de 4 horas se midió la bioluminiscencia.

Con una selección de 4 preparaciones de PBMC de donantes no estimuladas, se determinó la citotoxicidad in vitro de J22.9-xi. El potencial citotóxico varía ligeramente entre las PBMC de diferentes donantes. Dentro de las 4 horas de incubación, la lisis celular alcanzó del 18 al 35 % a una concentración de 125 ng/ml de J22.9-xi. El aumento de la concentración de J22.9-xi a 1 µg/ml aumentó la lisis celular hasta en un 56 % (Fig. 3a).

Después de la desglicosilación de J22.9-xi (J22.9-xi-N-glicano) con PNGasa F, la actividad citotóxica cayó por debajo del 8 %, mientras que la unión de J22.9-xi-N-glicano a células MM.1S positivas a BCMA permanecieron inalteradas (Fig. 3a, b).

J22.9-xi reduce la carga tumoral en ratones xenoinjertados y prolonga la supervivencia

Utilizamos ratones transgénicos con cadena gamma común NOD scid (NSG) que carecían de poblaciones funcionales de células B, T y NK. Estos ratones, inyectados con 1×10^7 células MM.1S-Luc por vía intravenosa, desarrollaron parálisis de las patas traseras en 6 semanas (Fig. 4d-1). El día en que aparece el primer síntoma, define el día de la destrucción.

Después de la inyección de 1×10^7 MM.1S-Luc en la vena de la cola, los ratones se dividieron al azar en 3 grupos. El primer grupo (n=2) no recibió tratamiento hasta el final del experimento, mientras que el segundo grupo (n=5) y el tercer grupo (n=6) recibieron inyecciones dos veces por semana de 200 µg de un control de isotipo o el anticuerpo J22.9-xi, respectivamente. Los anticuerpos se administraron durante un período de 6 semanas por vía intraperitoneal (i.p.) a partir del día de la inyección de células tumorales. El crecimiento tumoral se monitorizó una vez por semana utilizando el IVIS Spectrum. La bioluminiscencia se midió 3 minutos después de inyección i.p. de luciferina.

Se observó un curso similar de desarrollo tumoral tanto en el grupo no tratado como en el grupo que recibió el anticuerpo de control, mientras que el grupo tratado con J22.9-xi mostró una carga tumoral significativamente menor, ya comenzando en el primer punto de medición en el día seis. (Fig. 4a). Además, este grupo mostró una menor carga tumoral global durante todo el período de seguimiento (Fig. 4b). Los animales tratados con el control de isotipo tuvieron una mediana de supervivencia de 46 días después de la inyección de células. Los ratones que recibieron J22.9-xi vivieron un promedio de 26 días más. Esto corresponde a una supervivencia prolongada del 55 % en comparación con los ratones que recibieron el anticuerpo de control (Fig. 4c). Se observaron infiltraciones masivas de células tumorales en la columna vertebral y los ganglios linfáticos inguinales en ratones no tratados y en ratones que recibieron el anticuerpo de control de isotipo el día 28 después de la inyección de células (Fig. 4d-2).

La administración de 200 µg de un anticuerpo a un ratón corresponde a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Para probar la eficacia de J22.9-xi a dosis más bajas, dividimos los ratones xenoinjertados con MM.1S-Luc en cuatro grupos. El primer grupo (n=7) recibió 200 µg del anticuerpo de control dos veces por semana, y los grupos 2, 3 (cada n=3) y 4 (n=9) se inyectaron con 2 µg, 20 µg o 200 µg dos veces por semana, respectivamente. La inyección y la monitorización se realizaron como se describió anteriormente.

Aunque los tumores se desarrollaron como se esperaba en los ratones del grupo de control, se observó un crecimiento tumoral drásticamente restringido en los grupos que recibieron 20 µg o 200 µg de J22.9-xi (Fig. 4e,f). En la Fig. 4g se proporciona una descripción general de la línea de tiempo experimental.

El crecimiento de tumores establecidos se detiene durante 5 semanas para el tratamiento con J22.9-xi

Se simuló la administración terapéutica al retardar el comienzo del tratamiento con anticuerpos hasta 5 días después de la inyección de células tumorales. Los ratones xenoinjertados se dividieron en 2 grupos (n=6). Los animales recibieron 200 µg por inyección del control de isotipo o del anticuerpo J22.9-xi dos veces por semana. La primera medición se realizó el día 8 después de la inyección de células. Si bien no hay bioluminiscencia derivada del tumor medible hasta el día 35 en el grupo que recibió J22.9-xi (n=5), se observó un aumento constante en la carga tumoral en los animales que recibieron el anticuerpo de control de isotipo (n=6) (Fig. 5a, b). Los ratones del grupo de control de isotipo sobrevivieron un promedio de 56 días después de la inyección de células, mientras que todos los ratones que recibieron J22.9-xi todavía están vivos el día 77 (Fig. 5c). En la Fig. 5d se proporciona una descripción general de la línea de tiempo experimental.

El tratamiento intensivo de fase temprana con J22.9-xi previene el crecimiento tumoral durante 7 semanas

Con el fin de evaluar adicionalmente el efecto del momento del tratamiento sobre el crecimiento tumoral, se administraron diferentes anticuerpos durante cinco días consecutivos a partir del día de la inyección de células

tumorales. Posterior a la inyección i.v. de células, los animales se dividieron al azar en 5 grupos. El grupo 1 (n=5) se trató con 200 µg del anticuerpo de control de isotipo por inyección (i.p.), mientras que el grupo 2 (n=6) recibió 200 µg/inyección del anticuerpo J22.9-xi-N-glicano. Los ratones de los grupos 3 (n=4), grupo 4 (n=5) y grupo 5 (n=5) obtuvieron 200 µg, 20 µg y 2 µg por inyección del anticuerpo J22.9-xi, respectivamente. Las mediciones de bioluminiscencia comenzaron el día 9 después de la inyección de células. Hasta el día 44, no se observó bioluminiscencia derivada del tumor en ninguno de los grupos que recibieron el anticuerpo J22.9-xi intacto. Aunque se desaceleró el crecimiento del tumor en los animales tratados con J22.9-xi-N-glicano, la carga tumoral general no es significativamente diferente de la de los animales que recibieron el anticuerpo de control de isotipo (Fig. 6a,b). Aunque la carga tumoral general de los animales tratados con J22.9-xi-N-glicano (desglicosilado) no fue significativamente diferente (Fig. 6b), la vida útil de estos ratones aumentó sustancialmente en comparación con el grupo tratado con isoAb (Fig. 6c). Dado que se demostró que J22.9-xi-N-glicano no podía inducir ADCC o CDC, este resultado indica que la unión de J22.9-xi a BCMA por sí sola dificulta el crecimiento tumoral. Se puede considerar razonablemente que esto se debe al bloqueo de la interacción entre el receptor y sus ligandos nativos (APRIL y BAFF). En la Fig. 6d se proporciona una descripción general de la línea de tiempo experimental.

Humanización de J22.9-xi

Se humanizó el anticuerpo J22.9-xi en base al alineamiento de secuencias y los datos obtenidos de la estructura cristalina. Las secuencias de las regiones variables se alinearon con sus respectivos homólogos humanos utilizando IgBLAST (NCBI). Cada mutación propuesta se evaluó mediante inspección visual de la estructura antes de la alteración. La unión de los mutantes a BCMA se puede probar utilizando citometría de flujo. La afinidad se mide utilizando resonancia de plasmón de superficie (ProteOn™ XPR36; Bio-Rad). La evaluación preliminar de las propiedades de unión de las secuencias humanizadas muestra resultados prometedores con respecto a su especificidad y afinidad por el mismo epítipo como se describe para la unión de J22.9-xi.

MÉTODOS

Estirpes celulares y cultivo

La estirpe celular de mieloma múltiple humano MM.1S (Greenstein et al. (2003) Exp Hematol 31:271-282) se obtuvo del Prof. B. Dörken (MDC, Berlín, Alemania). Para la monitorización *in vivo* del crecimiento de células tumorales, se clonaron luciferasa y GFP en el vector pFU del sistema de vector lentiviral ViraPower (Invitrogen). A través de la expresión de GFP de células transducidas, se aislaron estirpes celulares monoclonales utilizando clasificación de células individuales activadas por fluorescencia. Las estirpes celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 sin rojo fenol, que contenía suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (todas de PAA).

Las células HEK293-6E, adquiridas del National Research Council de Canadá, se mantuvieron en medio Freestyle F17 (Invitrogen) suplementado con L-Glutamina (PAA) 7,5 mM, Pluronic F-68 al 0,1 % (Invitrogen) y 25 µg/ml G418 (Invitrogen). Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer (Corning) a 110 rpm y 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

Producción y purificación de anticuerpos.

Para obtener un anticuerpo de unión a BCMA, se utilizó la técnica de hibridoma estándar. Se inmunizaron 4 ratones BL/6 de tipo silvestre 6 veces con adyuvante incompleto de Freund y 30 µg del dominio extracelular de BCMA humano fusionado de terminal C con glutatión S-transferasa (GST). Después de la fusión celular seguida de un período de cribado, se mostró que el hibridoma J22.9 secretaba un anticuerpo anti-BCMA.

Debido a la inestabilidad de los hibridomas, las regiones variables de la cadena ligera y pesada del hibridoma J22.9 se amplificaron y clonaron en dirección ascendente de los genes de dominio constante kappa o IgG1 humanos, respectivamente. El anticuerpo quimérico J22.9-xi se produjo mediante cotransfección transitoria de células 293-6E con una mezcla de plásmidos de ADN 1:2 que codifica las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En resumen: las células 293-6E se resuspendieron a $1,7 \times 10^6$ células/ml en medio Freestyle F17 sin suero y se transfectaron utilizando polietilenimina a una concentración final de cultivo de 1 µg/ml. Dos días después de la transfección, las células se alimentaron con el 100 % del volumen de transfección de medio Freestyle F17 que contenía 1 % de triptona N1 (Organo Technie). En el día 7, las células se recogieron por centrifugación y el medio de cultivo filtrado (0,45 µm) se pasó por una columna de Proteína A Sepharsa de 3,5 ml (Bio-Rad). La columna se lavó con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el anticuerpo se eluyó mediante la adición de acetato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 3,5. Se recogieron fracciones de 2 ml directamente en tubos que contenían 100 µl de HEPES 1 M, pH 7,5 para neutralización. El rendimiento final de IgG de longitud completa fue de aproximadamente 40 mg/l de cultivo.

Dado que el hibridoma J22.9 perdió la capacidad de producir/secretar el anticuerpo anti-BCMA (Fig. 8), las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se amplificaron utilizando PCR y posteriormente se clonaron en el extremo 5' de los genes de cadena ligera IgG1 y K constantes humanos, respectivamente. A través de la transfección conjunta de células 293-6E con estos dos plásmidos, se produjo el anticuerpo quimérico J22.9-xi. Por lo tanto, la producción del anticuerpo de la invención era inherentemente difícil y no se podía lograr mediante métodos de rutina sencillos.

El anticuerpo de control de isotipo compuesto por la cadena pesada J22.9-xi y una cadena ligera kappa quimérica aleatoria se produjo en paralelo con el anticuerpo J22.9-xi. Se demostró mediante ELISA y citometría de flujo que este anticuerpo no se podía unir a BCMA.

Las cadenas de oligosacáridos ligadas a N en Asn297 de la cadena pesada de J22.9-xi se eliminaron enzimáticamente utilizando N-glucosidasa F (PNGasa F) (NEB). Se incubaron 10 mg de J22.9-xi con 15.000 unidades de PNGasa F en 500 µl de PBS (pH 7,4) durante 36 horas a 37 °C, seguido de intercambio de tampón en PBS estéril.

Determinación de las capacidades de unión y bloqueo de J22.9-xi mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)

Se recubrieron placas de microtitulación con 10 µg/ml del dominio extracelular de BCMA humano. El BCMA recubierto se detectó con una dilución en serie de J22.9-xi y el control de isotipo que varía desde 1 hasta 1000 ng. La unión de J22.9-xi o del anticuerpo de control de isotipo al BCMA recubierto se detectó con anticuerpo secundario antihumano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, 109-035-098, dilución 1:5.000).

Para el experimento de bloqueo, se aplicó 1 mg/ml de BAFF humano recombinante fusionado con una etiqueta His (Biomol) después de los anticuerpos y se lavó y se detectó utilizando el anticuerpo de etiqueta anti-His de ratón (AbD Serotec, AD1.1.10, dilución 1:5.000, conjugado con HRP). Todos los ELISA se desarrollaron con los reactivos A y B de BD OptEIA (BD Bioscience) y se midieron con un espectrofotómetro de microplaca (BioTek) a 450 nm y 570 nm.

Análisis de citometría de flujo

Para los experimentos de detección de antígenos de la superficie celular, los anticuerpos de fabricación propia (J22.9-xi y el control de isotipo) y la etiqueta anti-His de ratón disponible comercialmente (AbD Serotec, AD1.1.10, dilución 1:100, Alexa Fluor 488- conjugado) y de IgG1 anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, 109-116-098, dilución 1:400, conjugado con PE) y BAFF recombinante humano fusionado con una etiqueta His (Biomol). Los experimentos se realizaron sobre un citómetro de flujo FACSCalibur o FACSCanto II (BD Bioscience). Los datos se analizaron con el software Flowjo versión 7.6 (TreeStar Inc.).

Generación de complejos Fab y Fab:BCMA

Se generaron fragmentos (Fab)₂ a partir de IgG J22.9-xi de longitud completa mediante incubación con pepsina. Se pasó J22.9-xi sobre una columna de intercambio de tampón PD-10 en acetato de sodio 50 mM, pH 3,5 y se agregó pepsina a 30 µg por miligramo de J22.9-xi. La incubación a 37 °C durante 2,5 horas fue suficiente para digerir completamente la región cristalizable (Fc) del fragmento y la pepsina se inactivó mediante intercambio sobre una columna PD-10 en PBS (pH 7,2). La reducción de los fragmentos (Fab)₂ a Fab individuales se logró en PBS mediante la adición de 2-mercaptoetilamina (50 mM) en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM. Después de la incubación durante 90 minutos a 37 °C, las cisteínas reducidas se bloquearon mediante alquilación con yodoacetamida 500 µM durante 30 minutos seguido de intercambio de tampón en PBS fresco. Los fragmentos Fab se combinaron con 1,5 equivalentes molares de BCMA purificado y los complejos se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna Superdex 75 16/60. Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida SDS al 4-12 % y las fracciones que contenían tanto Fab como BCMA se agruparon y concentraron para ensayos de cristalización.

Cristalización de complejos Fab:BCMA

Los complejos concentrados se complementaron con 0,5 equivalentes molares de BCMA puro para asegurar la saturación y se sometieron a cribado de cristalización. Las condiciones iniciales de cristalización de Fab:BCMA se identificaron a partir de cribados comerciales (Qiagen) en placas con formato de gota sostenida de 96 pocillos utilizando un robot de pipeteo Gryphon (200 nl de gotas) y se optimizaron en placas de 24 pocillos en gotas suspendidas (2-3 µl). El complejo se concentró a 8 mg/ml y se cristalizó en PEG 3350 al 21 %, BisTris 0,1 M pH 6,5 y CuCl₂ 5 mM a 20 °C. Los cristales aparecieron después de tres días como grupos de placas delgadas y alcanzaron su tamaño final (0,2 – 0,3 mm) en aproximadamente 7 días. Las agrupaciones se separaron y las placas individuales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido en licor madre con 20 % de glicerol como crioprotector. Los datos completos de difracción se recopilaron de un solo cristal en el sincrotrón BESSY del Helmholtz Zentrum Berlín. La estructura se resolvió a una resolución de 1,9 ángstroms por reemplazo molecular utilizando las fases experimentales de la estructura de Efalizumab (3EO9) como modelo de búsqueda. El procesamiento de datos se realizó con el conjunto de programas ccp4, el refinamiento de la estructura se realizó utilizando Phenix (Adams P D, et al. (2010), Acta Cryst. D66: 213-221) y la construcción y evaluación de modelos utilizando Coot. (Emsley et al, Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography, 2010, 66:486-501) Las imágenes se crearon utilizando PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, CLL).

Ensayo de citotoxicidad in vitro

En este ensayo, se determinó el efecto citotóxico de J22.9-xi al medir la luminiscencia de las células vivas restantes en un lector de bioluminiscencia. En resumen: las capas leucocitarias de filtro (FBC) humanas recién obtenidas se retrolavaron por gravedad con 160 ml de tampón de elución (PBS (pH 7,4) que contenía Na₂-EDTA 5 mM y sacarosa 2,5 [p/v]). Las células mononucleares se aislaron de las células eluidas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Se tomaron células mononucleares de las interfases y se lavaron dos veces en tampón de elución. Después de la lisis de los eritrocitos, las PBMC se lavaron de nuevo, se contaron y se ajustaron por dilución en RPMI/FCS al 10 % sin rojo fenol a 1×10^7 células/ml. Se sembraron 5×10^4 células MM.1S-Luc en 50 µl de RPMI en placas de microtitulación. Diez minutos antes de la adición de 100 µl de PBMC, las células MM.1S-Luc se incubaron con J22.9-xi o las diluciones en serie del anticuerpo de control de isotipo en un volumen de muestra de 200 µl. Después de la adición de células diana, anticuerpos y células efectoras, las placas de microtitulación se centrifugaron (300 x g) durante 2 minutos a temperatura ambiente (T.Amb.) y se almacenaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Los pocillos de control se trataron con Triton X al 1 % en lugar de anticuerpo para la lisis completa. Después de 4 horas de incubación, se aplicaron a cada pocillo 25 µl de PBS con luciferina (250 ng/ml) y se midió la bioluminiscencia de las células vivas en un lector de bioluminiscencia (Tecan). La citotoxicidad específica se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$100 - [\text{valor (J22.9-xi)} - \text{valor (lisis total)}] / [\text{valor (control de isotipo)} - \text{valor (lisis total)}] \times 100.$$

Estudios in vivo

Se utilizaron ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CSF2)2Ygy Tg(IL3)1Ygy Tg(KITLG)3YgyJGckRolyJ (NSG) de The Jackson Laboratory y se utilizaron ratones CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Crl de Charles River Deutschland (Sulzfeld, Alemania)). Los experimentos se realizaron con ratones de entre 8 y 14 semanas de edad. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las pautas institucionales y estatales, bajo condiciones específicas libres de patógenos. En los ejemplos experimentales relacionados con el tratamiento de tumores establecidos y el tratamiento de tumores en la fase temprana de la enfermedad, se utilizaron ratones CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Crl. El fenotipo de las dos cepas de ratones mencionadas en el presente documento es muy similar. Los animales no tienen células B, T ni NK funcionales. Se observó un crecimiento tumoral ligeramente más lento en los ratones CB17.Cg, lo que indica un efecto aún más prometedor del anticuerpo terapéutico de la presente invención.

El modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple se indujo mediante inyección intravenosa de 1×10^7 células MM.1S-Luc en la vena de la cola el día cero. En este modelo, los animales no tratados desarrollan parálisis de las patas traseras en 6 semanas. La aparición de este síntoma indica el punto final del experimento.

Para los estudios de eficacia, los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana o en 5 días consecutivos comenzando en el día cero. El anticuerpo J22.9-xi se administró en dosis de 2 µg, 20 µg o 200 µg por inyección; para el anticuerpo de control de isotipo, se utilizaron 200 µg/inyección. La bioluminiscencia de las células MM.1S-Luc se midió después de inyección i.p. de 150 µg de luciferina utilizando el IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Las mediciones se realizaron semanalmente. En cada punto de tiempo, también se administró luciferina a 3 ratones de control no tratados. Los valores de flujo total de estos animales se restan de cada medición o se muestran en los gráficos.

Para tratar tumores establecidos, la terapia con anticuerpos se inició 5 días después de la inyección de las células MM.1S-Luc. Se administraron 200 mg del anticuerpo de control de isotipo o J22.9-xi dos veces por semana durante un período de 6 semanas.

Además, la experimentación adicional muestra que las realizaciones preferidas de la invención proporcionan efectos sorprendentes e inesperados, resolviendo de esta manera el problema de la invención de una manera no obvia.

Referencias

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273, 927-948.
- Anthony, R.M., and Ravetch, J.V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the antiinflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1, S9-14.
- Arastu-Kapur, S., Anderl, J.L., Kraus, M., Parlati, F., Shenk, K.D., Lee, S.J., Muchamuel, T., Bennett, M.K., Driessen, C., Ball, A.J., et al. (2011). Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res* 17, 2734-2743.

- Benson, M.J., Dillon, S.R., Castigli, E., Geha, R.S., Xu, S., Lam, K.P., and Noelle, R.J. (2008). Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 180, 3655-3659.
- 5 Bossen, C., and Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18, 263-275.
- Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 301-316.
- 10 Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6, 15-25.
- Chiu, A., Xu, W., He, B., Dillon, S.R., Gross, J.A., Sievers, E., Qiao, X., Santini, P., Hyjek, E., Lee, J.W., et al. (2007). Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 109, 729-739.
- 15 D'Cruz, D.P., Khamashta, M.A., and Hughes, G.R. (2007). Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369, 587-596.
- Darce, J.R., Arendt, B.K., Wu, X., and Jelinek, D.F. (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179, 7276-7286.
- 20 Farge, D., Labopin, M., Tyndall, A., Fassas, A., Mancardi, G.L., Van Laar, J., Ouyang, J., Kozak, T., Moore, J., Kotter, I., et al. (2010). Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* 95, 284-292.
- 25 Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 182, 890-901.
- 30 Gordon, N.C., Pan, B., Hymowitz, S.G., Yin, J., Kelley, R.F., Cochran, A.G., Yan, M., Dixit, V.M., Fairbrother, W.J., and Starovasnik, M.A. (2003). BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 42, 5977-5983.
- 35 Greenstein, S., Krett, N.L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K.C., and Rosen, S.T. (2003). Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol* 31, 271-282.
- Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M.F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., Devergne, O., and Tsapis, A. (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 165, 1322-1330.
- 40 Jacobi, A.M., Huang, W., Wang, T., Freimuth, W., Sanz, I., Furie, R., Mackay, M., Aranow, C., Diamond, B., and Davidson, A. (2010). Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* 62, 201-210.
- 45 Kapoor, P., Ramakrishnan, V., and Rajkumar, S.V. (2012). Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin Hematol* 49, 228-242.
- 50 Keyser, F.D. (2011). Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr Rheumatol Rev* 7, 77-87.
- Laskowski, R.A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res* 37, D355-359.
- 55 Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-264.
- Neubert, K., Meister, S., Moser, K., Weisel, F., Maseda, D., Amann, K., Wiethe, C., Winkler, T.H., Kalden, J.R., Manz, R.A., et al. (2008). The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med* 14, 748-755.
- 60 Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.

- Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J.A., Greipp, P.R., and Jelinek, D.F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103, 689-694.
- 5 O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.
- Queen et al., 1989; WO 90/07861
- 10 Patel, D.R., Wallweber, H.J., Yin, J., Shriver, S.K., Marsters, S.A., Gordon, N.C., Starovasnik, M.A., and Kelley, R.F. (2004). Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *J Biol Chem* 279, 16727-16735.
- Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S.P., Lepage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., et al. (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol* doi:10.1038/ni.2527.
- 15 Presta, L.G. (2008). Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 20, 460-470.
- Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet* 374, 324-339.
- 20 Richardson, P.G., Hideshima, T., and Anderson, K.C. (2003). Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10, 361-369.
- 25 Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.
- 30 Scott, D.L., Wolfe, F., and Huizinga, T.W. (2010). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-1108.
- Suzuki, K. (2013). Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol* 43, 116-124.
- 35 Wang, S.Y., and Weiner, G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 8, 759-768.
- Xu, S., and Lam, K.P. (2001). B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol* 21, 4067-4074.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a CD269 (BCMA) e interrumpe una interacción BAFF-CD269, que comprende un dominio VH y un dominio VL,

en el que dicho dominio VH comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 7, y en el que dicho dominio VH comprende regiones CDR de CDR H1 de acuerdo con la SEQ ID No. 1 (RYWMS), CDR H2 de acuerdo con la SEQ ID No. 2 (EINPDSSTINYAPSLKD) y CDR H3 de acuerdo con la SEQ ID No. 3 (SLYYDYGDAMDYW), y

dicho dominio VL comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 8, y en el que dicho dominio VL comprende regiones CDR de CDR L1 de acuerdo con la SEQ ID No. 4 (KASQSVDSNVA), CDR L2 de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (SASLRFS) y CDR L3 de acuerdo con la SEQ ID No. 6 (QQYNNYPLTFG), y

en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene afinidad a CD269 con un Kd de 54 pM cuando se mide con resonancia de plasmón superficial (SPR).

2. Anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a CD269 (BCMA), que comprende un dominio VH de acuerdo con la SEQ ID No. 7 y un dominio VL de acuerdo con la SEQ ID No. 8.

3. Anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como un medicamento en el tratamiento de un trastorno médico asociado con la presencia de células B patógenas,

en el que el trastorno médico asociado con células B patógenas es un cáncer de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple, plasmacitoma, macroglobulinemia de Waldenström o leucemia de células plasmáticas, o un cáncer de linfocitos B, tal como enfermedad de Hodgkin,

o en el que el trastorno médico asociado con células B patógenas es una enfermedad autoinmunitaria asociada con células plasmáticas autorreactivas y/o células B de memoria autorreactivas, tales como una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE) o artritis reumática.

4. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 conjugado a un agente terapéutico.

5. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

6. Una célula huésped, tal como una célula bacteriana o célula de mamífero, preferiblemente una célula de hibridoma o estirpe celular, que produce un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y/o que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o un ADC de acuerdo con la reivindicación 4, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

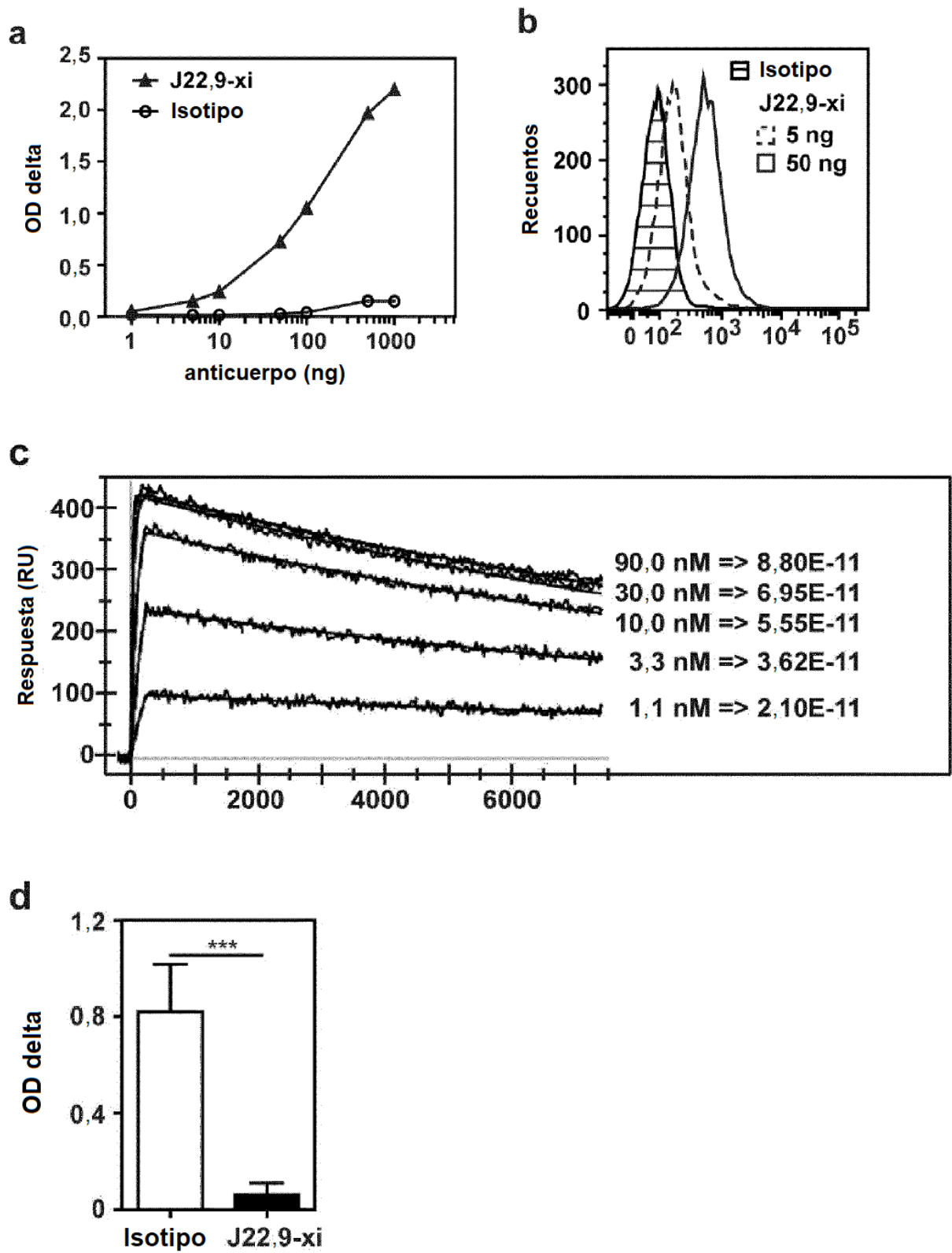


Fig. 2

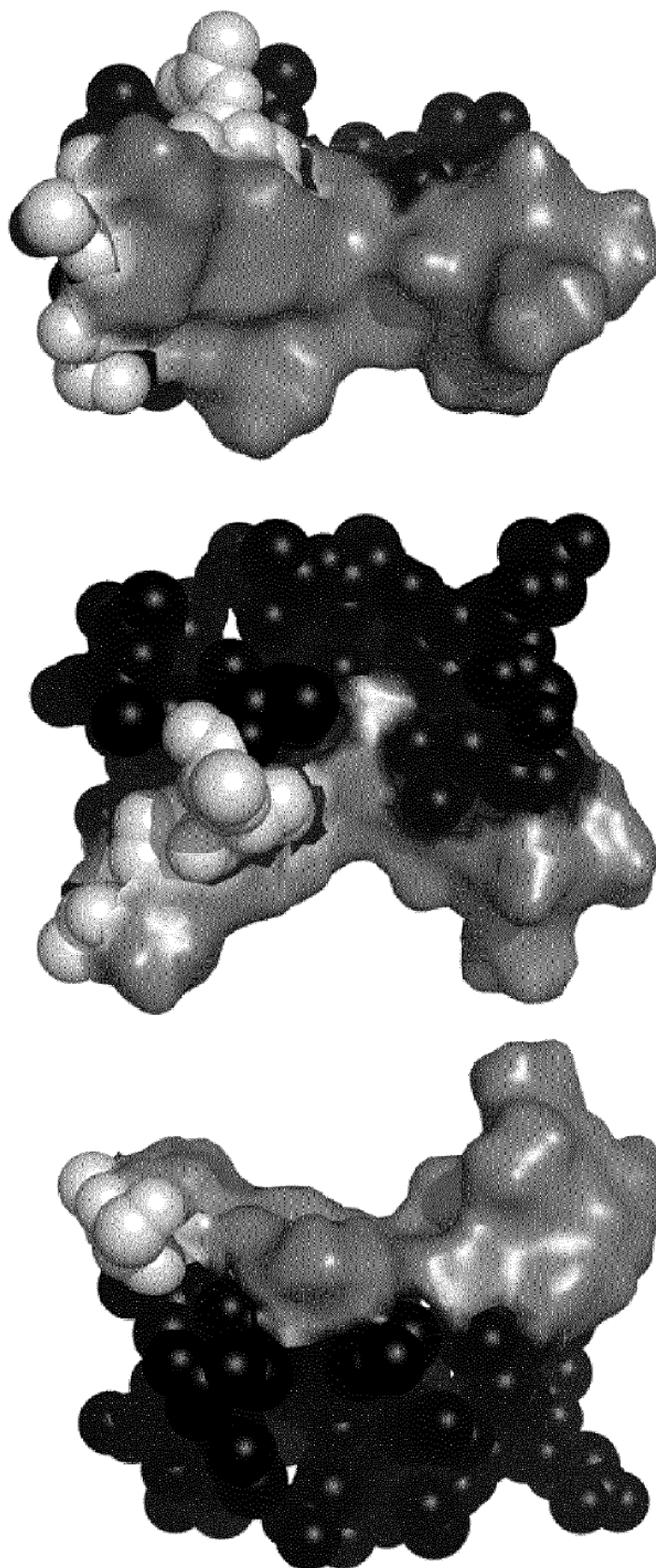


Fig. 2 B

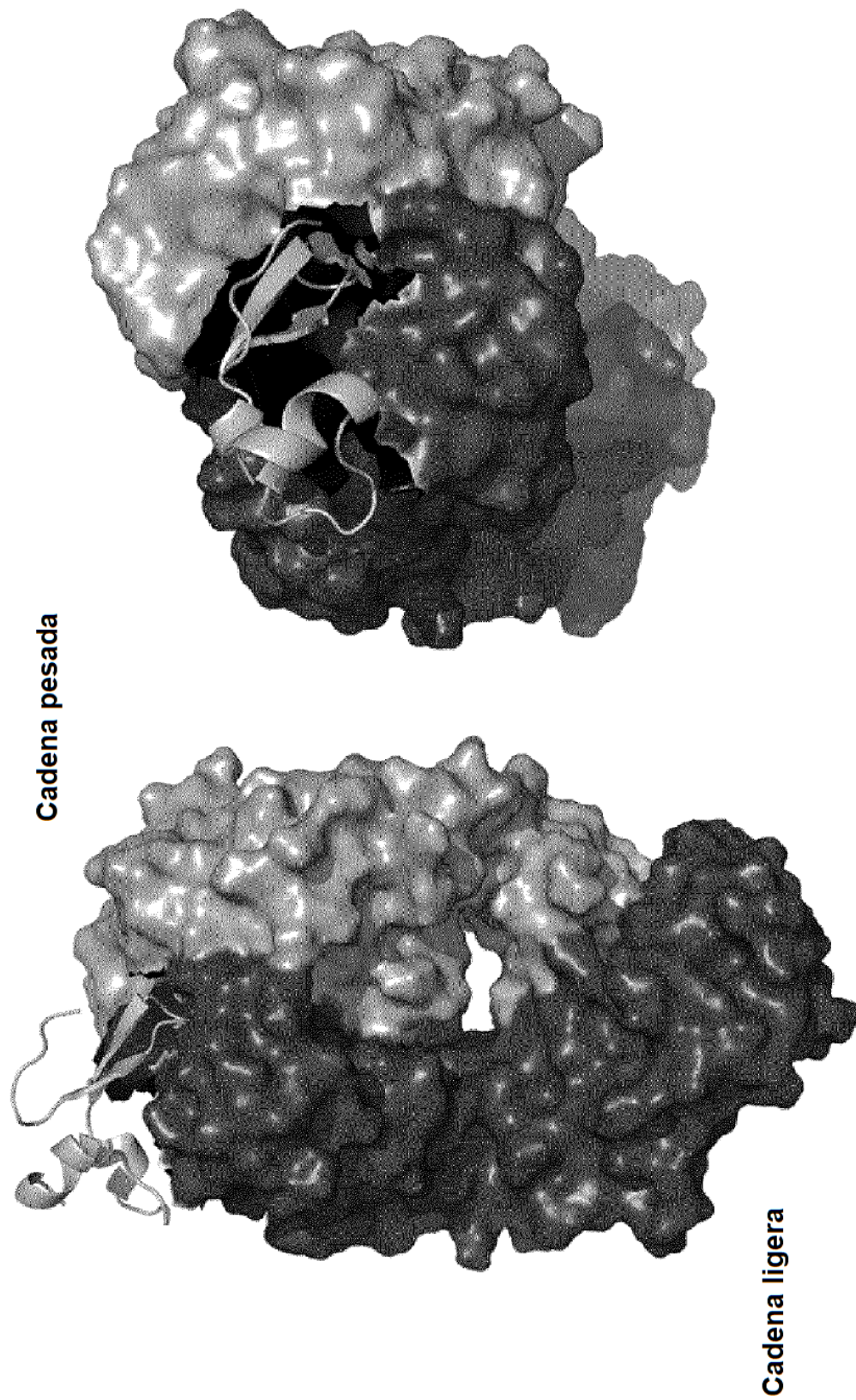


Fig. 3

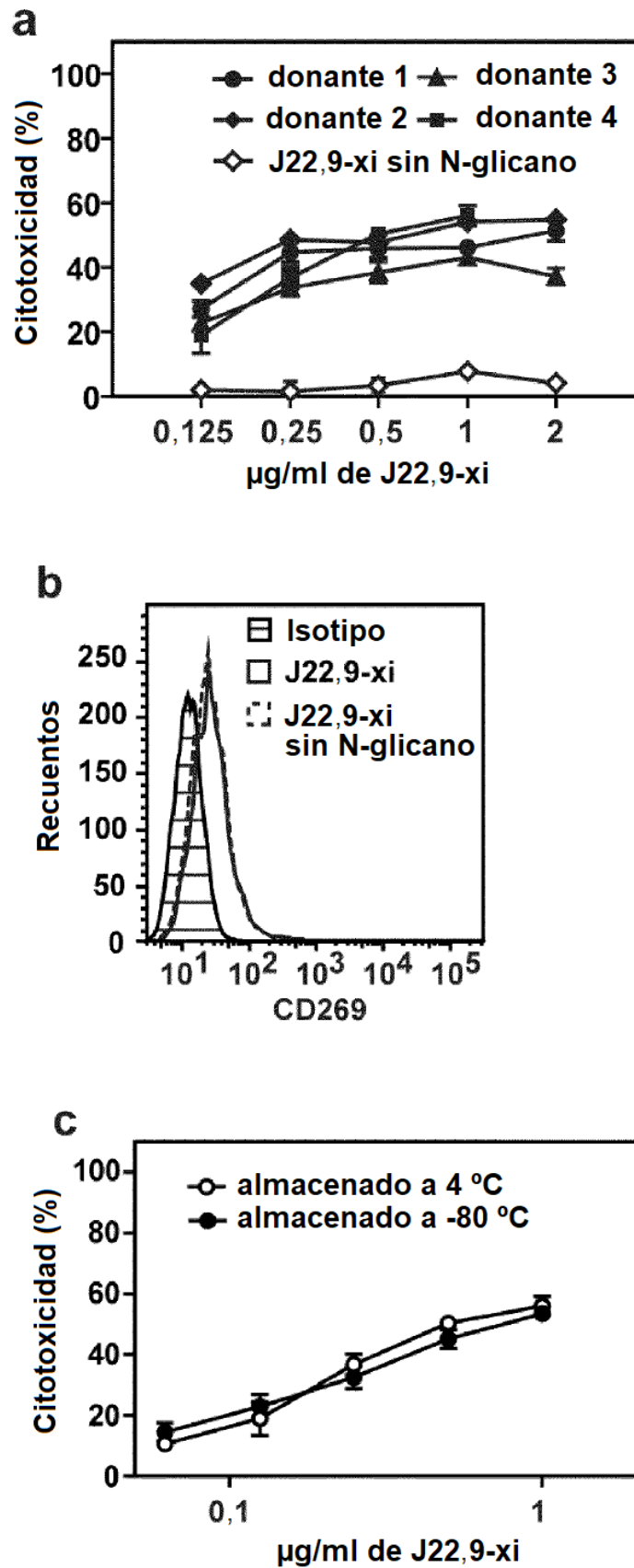


Fig. 4

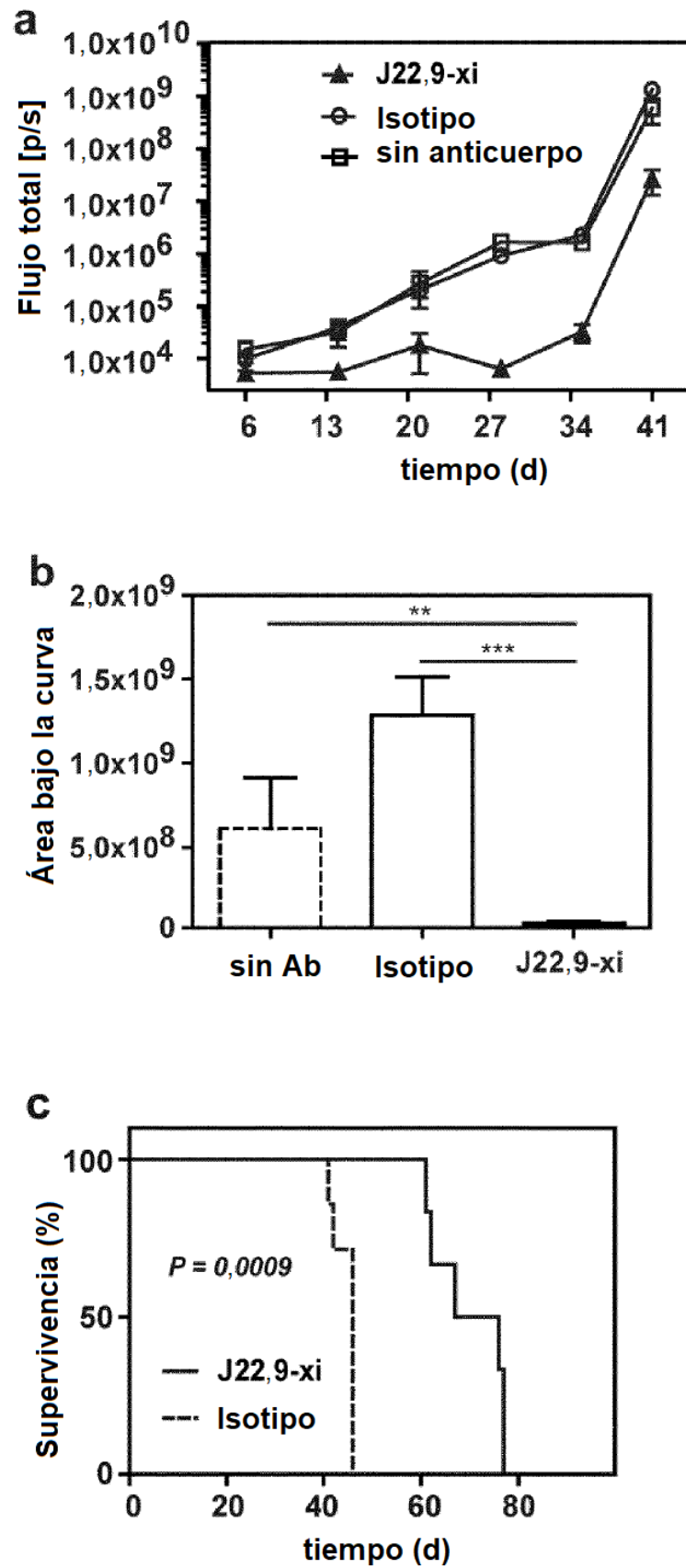


Fig. 4 (continuación)

d-1

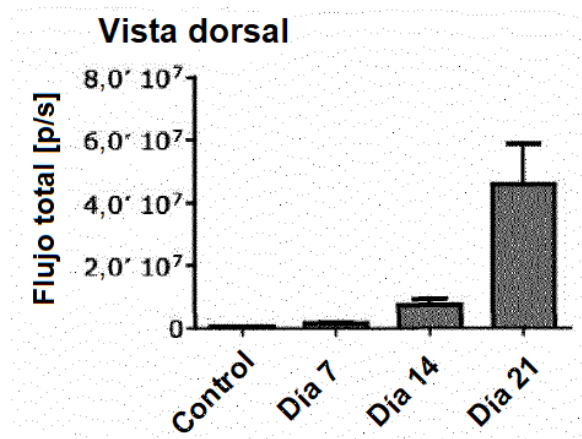
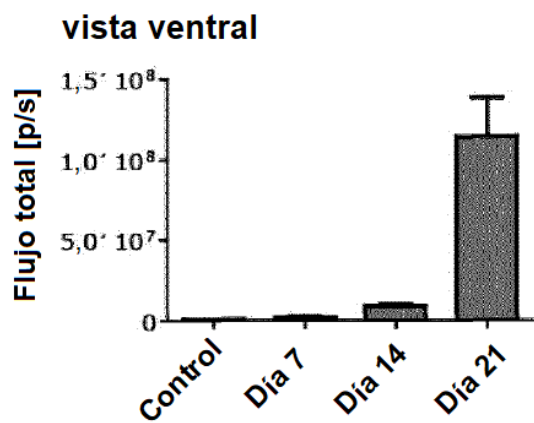
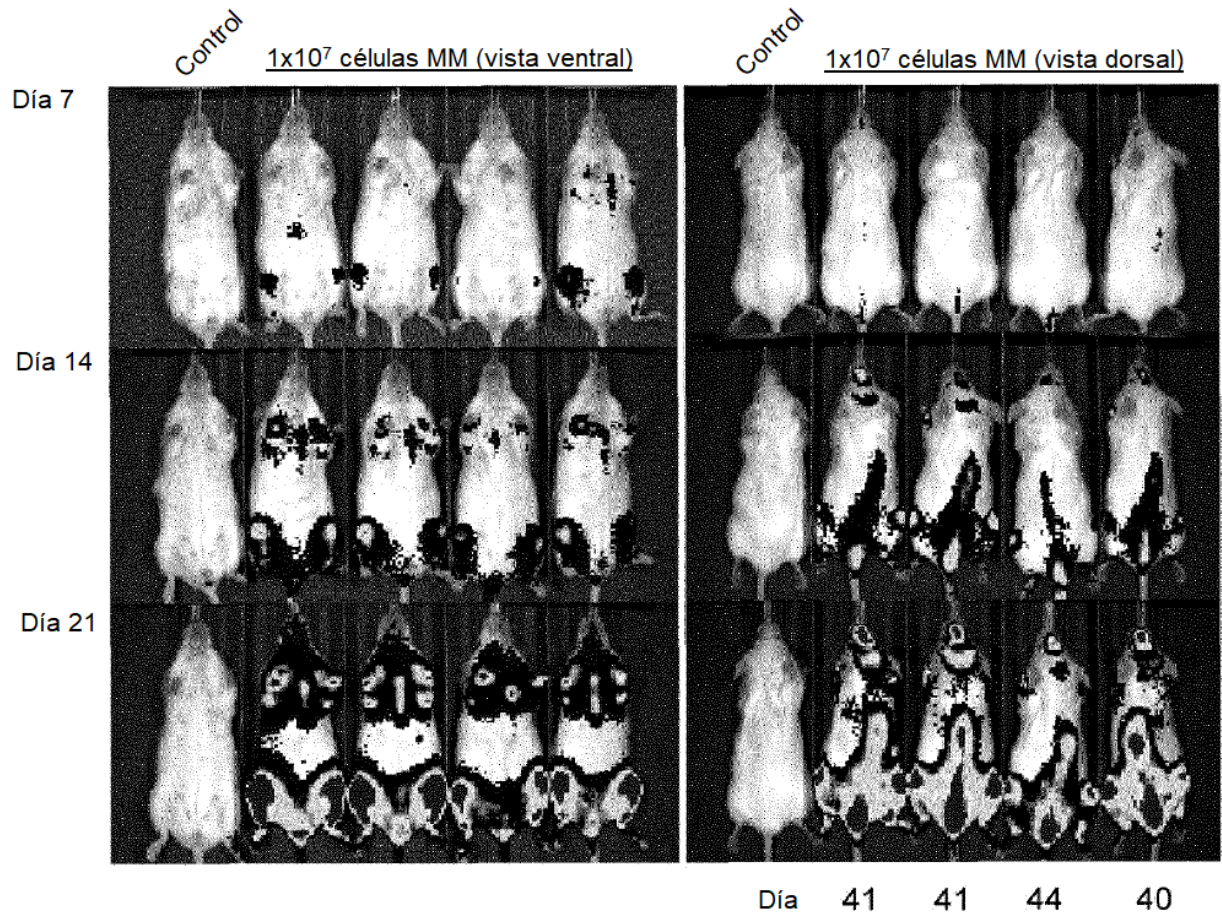


Fig. 4 (continuación)

d-2

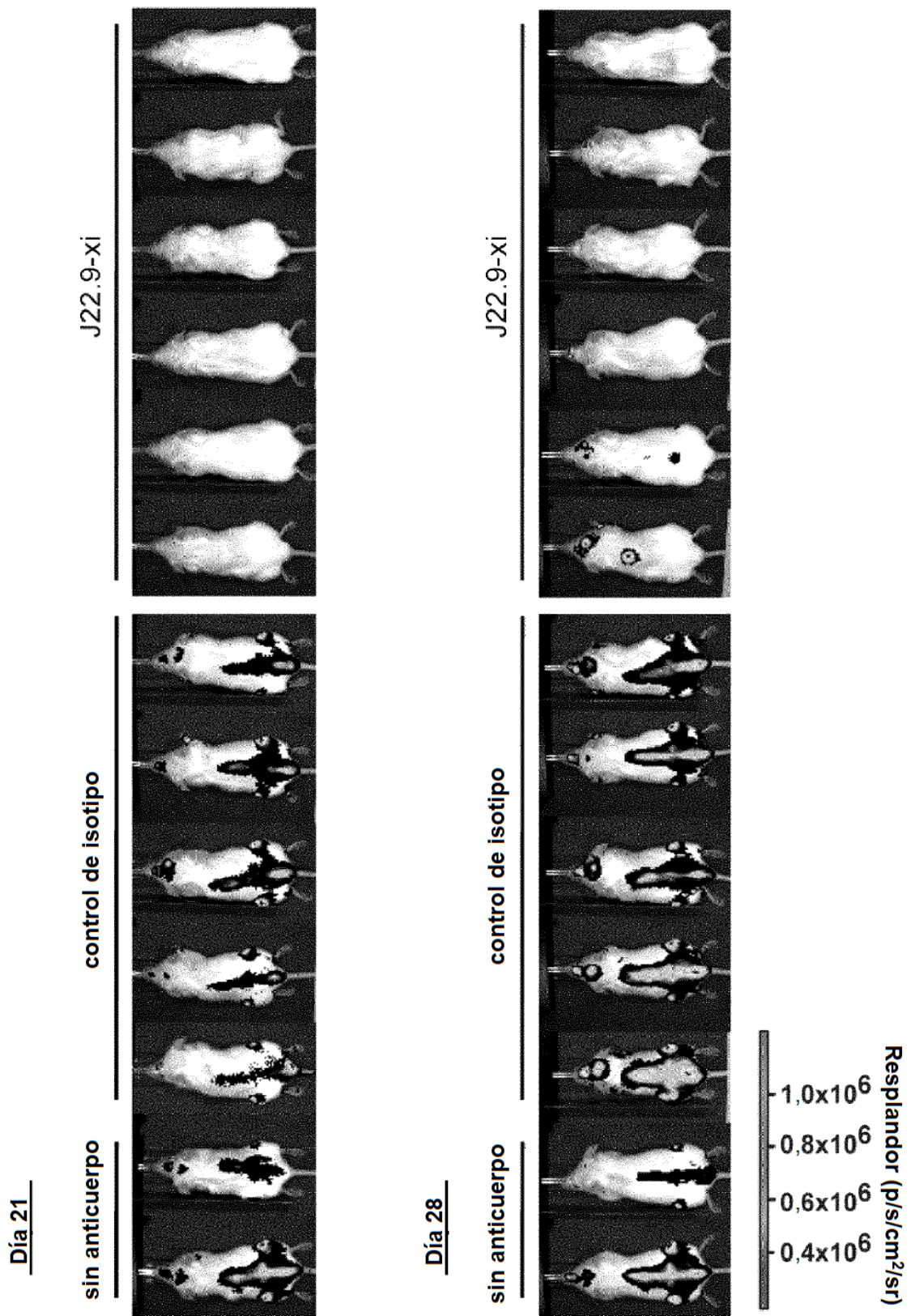
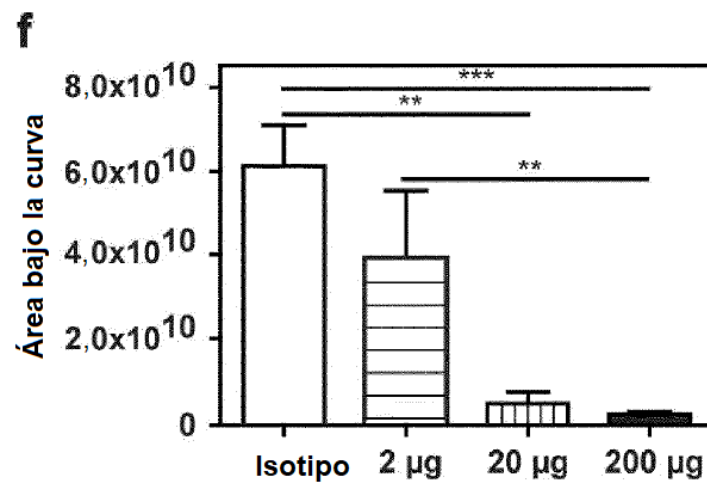
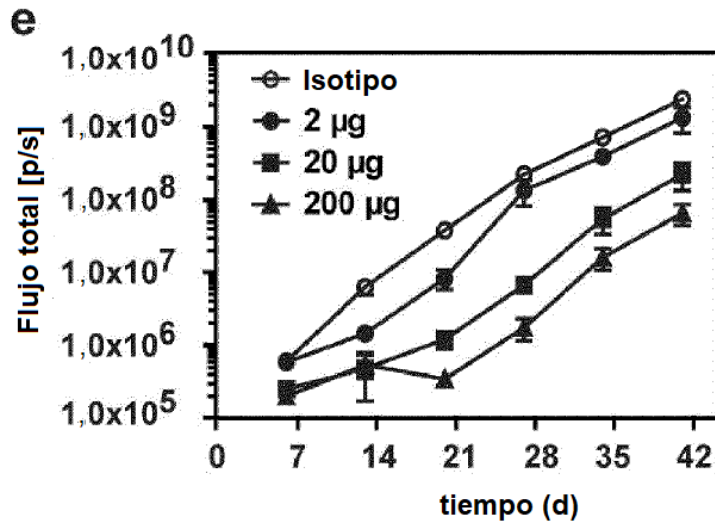


Fig. 4 (continuación)

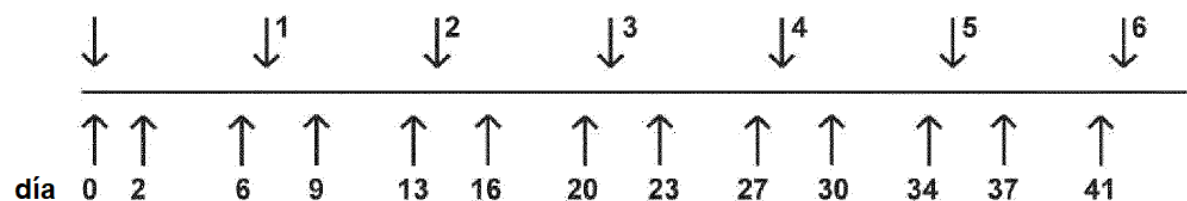


g

Línea de tiempo experimental

inyección de células de tumor (i.v.)
 1×10^7 células/ratón

monitorización de tumor semanal (IVIS)



inyección de anticuerpo (i.p.)

200 µg de J22,9-xi o control de isotipo

Fig. 5

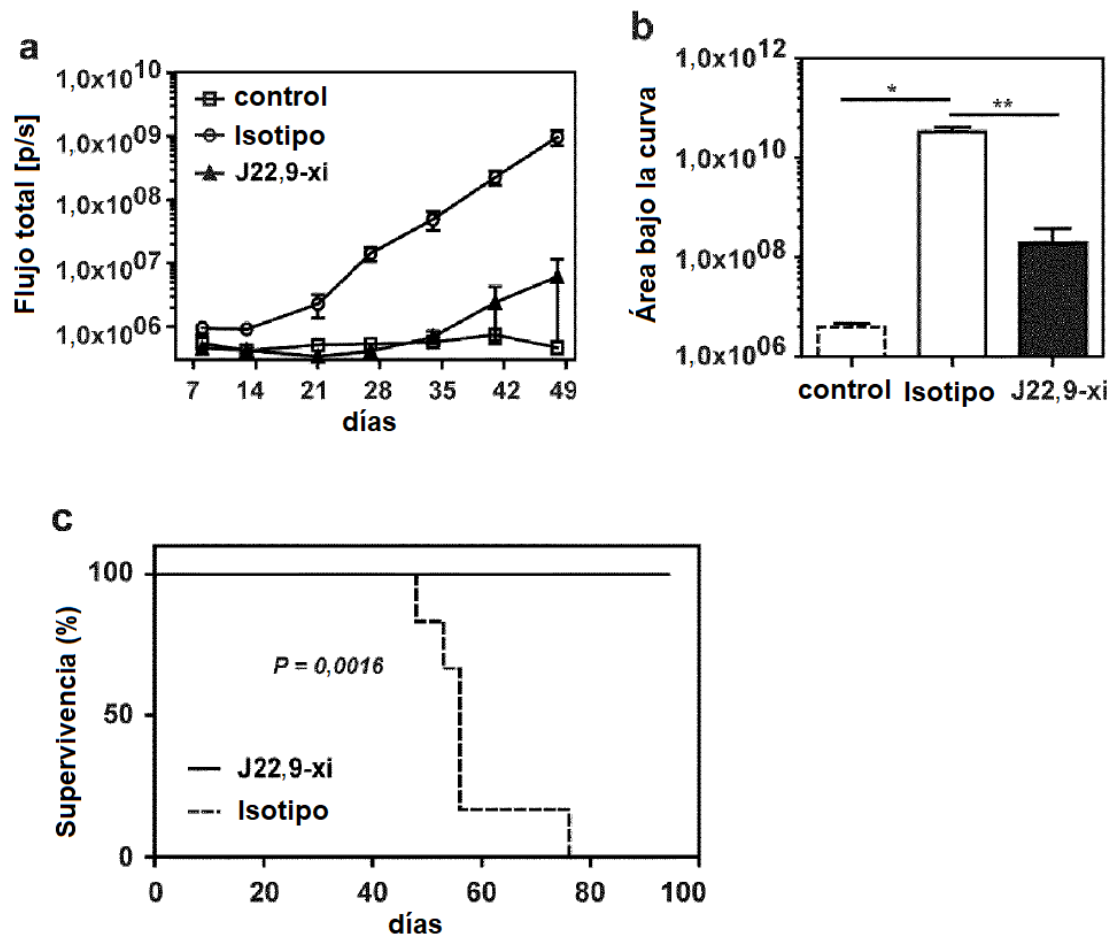


Fig. 6

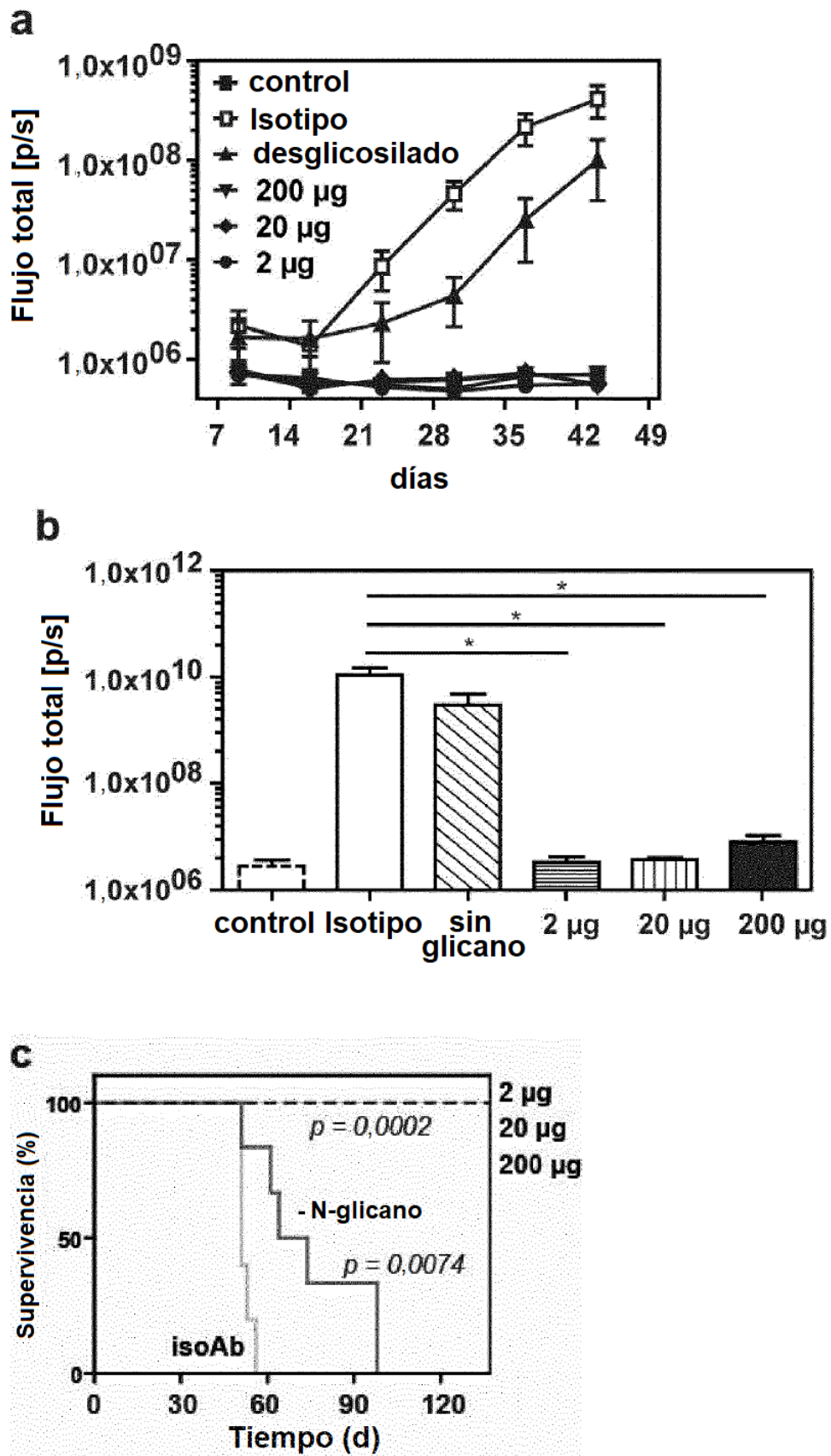


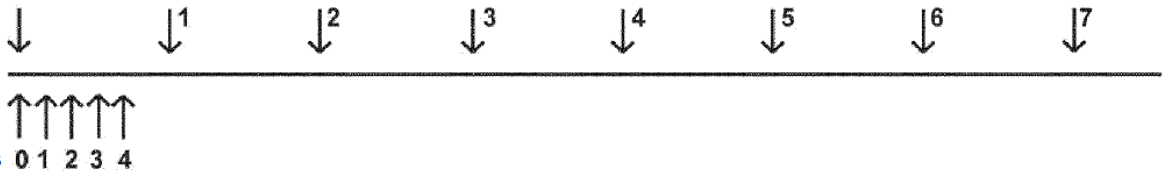
Fig. 6 (continuación)

d

Línea de tiempo experimental

inyección de células de tumor (i.v.)
1 * 10⁷ células/ratón

monitorización de tumor (IVIS) cada semana



inyección de anticuerpo (i.p.)

2 µg, 20 µg o 200 µg de J22,9-xi, J22,9-xi sin N-glicano o control de isotipo

Fig. 7

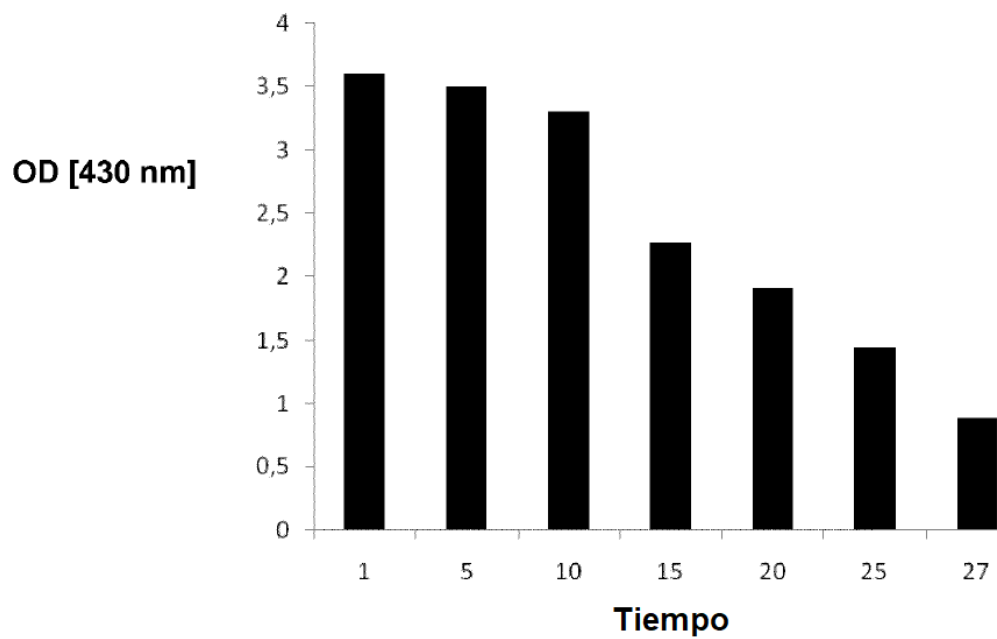


Fig. 8

Cadena pesada de J22,9 (X24,1pg.45, DSP2,2, JH4 / IGHV4-1*01, IGHD2-4*01, IGHJ4*01)

Secuencia de ADN (SEQ ID No. 9):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAACTCT
CCTGTGCAGCCTCAGGAATCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTTTCGGCGGGCTCC
AGGGAAAGGACTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACAATAAACTATGCA
CCATCTCTAAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGTTGTACCTGC
AAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTGCAAGTCTCTACTATGA
TTACGGGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de proteínas (código de una sola letra, SEQ ID No. 7):

QVQLQ QSGGG LVQPG GSLKL SCAAS GIDFS RY**WMS** WVRRA PGKGL EWIG**E**
INPDS STINY APSLK DKFII SRDNA KNTLY LQMSK VRSED TALYY CAS**LY**
YDYGD AMDYW GQGTS VTVSS

Se subrayan las regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los aminoácidos implicados en la unión directa al dominio extracelular diana de CD269 se enfatizan en negrita ampliada

Secuencia de proteínas (código de tres letras, SEQ ID No. 7):

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp
Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp
Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg
Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp
Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

Fig. 8 (continuación)

Cadena ligera de J22,9 (19-15, JK5 / IGKV6-15*01, IGKJ5*01)

Secuencia de ADN (SEQ ID No. 10):

GACATTGTGATGACTCAGTCTCAAAGATTCATGACCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGGATAGTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTCG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTTCTCGGCATCCCTCCGGTTCAGTGGAGTCCCTGCTCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAACAATATAACAACCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGAC
CAAGCTGGAGCTGAAACGT

Secuencia de proteínas (código de una sola letra, SEQ ID No. 8):

DIVMT QSQRF MTTSV GDRVS VTCKA SQSVD **SNV**AW **Y**QQKP RQSPK ALI**FS**
ASLRF SGVPA RFTGS **GS**GTG FTLTI SNLQS EDLAE YFC**QQ** **YNNY****P**
LTFGA GTKLE LKR

Se subrayan las regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los aminoácidos implicados en la unión directa al dominio extracelular diana de CD269 se enfatizan en negrita ampliada

Secuencia de proteínas (código de tres letras, SEQ ID No. 8):

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Thr Thr Ser Val Gly Asp Arg
Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Val Ala Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Phe Ser Ala Ser Leu Arg
Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln
Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

Etiqueta GST-BCMA-His (SEQ ID No. 11):

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDG
DVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDF
LSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDP MCLDAFPKLVCFKKRI
EAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSMAGQCSQNEYFDSL LHAC
IPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALEHHHHHH

El dominio extracelular de BCMA (SEQ ID No. 12);

MAGQCSQNEYFDSL LHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALE se subraya.

Fig. 9

HC (IGHV3-74*02, IGHD3-16*02, IGHJ4*01)

	1	11	21	31	41	
HX:	XVQLX	XSGGG	LVQPG	GSLXL	SCAAS	GXXFX
HM:	QVQLQ	QSGGG	LVQPG	GSLKL	SCAAS	GIDFS
H0:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFD</u>
H1:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFD</u>
H2:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFS</u>
H3:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFD</u>
H4:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFS</u>
H5:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFD</u>
H6:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFS</u>
H7:	<u>EVQLV</u>	<u>ESGGG</u>	LVQPG	GSLRL	SCAAS	<u>GFTFS</u>
	51	61	71	81	91	
HX:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>XXFXI</u>	SRDNA	KNTLY
HM:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>DKFII</u>	SRDNA	KNTLY
H0:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H1:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H2:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H3:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H4:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H5:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H6:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
H7:	<u>INPDS</u>	<u>STINY</u>	<u>APSLK</u>	<u>GRFTI</u>	SRDNA	KNTLY
	101	111				
HX:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTG</u>	VTVSS		
HM:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTS</u>	VTVSS		
H0:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H1:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H2:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H3:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H4:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H5:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H6:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		
H7:	<u>YDYGD</u>	<u>AMDYW</u>	<u>GQGTL</u>	VTVSS		

Negro: Aminoácidos cambiados para secuencia humana.

Subrayado: Regiones CDR

X: Aminoácido variable de acuerdo con cualquiera de las secuencias de ratón o humanizadas

Fig. 9 (continuación)

LC (IGKV1-16*01, IGKJ2*04)

	1		11		21		31		41	
LX:	DIVMT	QSXXX	XXSV	GDXVX	XTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	XQXPK	XLIXS
LM:	DIVMT	QSQR	MTTSV	GDRVS	VTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	RQSPK	ALIFS
L0:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIYS
L1:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIYS
L2:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIYS
L3:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIYS
L4:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIYS
L5:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIYS
L6:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIYS
L7:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIYS
L8:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIYS
L9:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIYS
L10:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIYS
L11:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIYS
L12:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIYS
L13:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIYS
L14:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIYS
L15:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIYS
L16:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIFS
L17:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIFS
L18:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L19:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L20:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L21:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L22:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIFS
L23:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIFS
L24:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIFS
L25:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIFS
L26:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	LLIFS
L27:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L28:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	ALIFS
L29:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQSPK	LLIFS
L30:	DIVMT	QSPAT	LSVSV	GDEVT	LTCKA	<u>SQSVD</u>	<u>SNVAW</u>	YQQKP	GQAPK	ALIFS

Negro: Aminoácidos cambiados para secuencia humana.

Subrayado: Regiones CDR

X: Aminoácido variable de acuerdo con cualquiera de las secuencias de ratón o humanizadas

Fig. 9 (continuación)

	51	61	71	81	91				
LX:	<u>XXLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFXGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SXLQS</u>	<u>EDXAX</u>	<u>YXCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
LM:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFTGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SNLQS</u>	<u>EDLAE</u>	<u>YFCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L0:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L1:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L2:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L3:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L4:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L5:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L6:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L7:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L8:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L9:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L10:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L11:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L12:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L13:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L14:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L15:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L16:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L17:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L18:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L19:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L20:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L21:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L21:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L23:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L24:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L25:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L26:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L27:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAV</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L28:	<u>DDLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L29:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>
L30:	<u>ASLRF</u>	<u>SGVPA</u>	<u>RFSGS</u>	<u>GSGTD</u>	<u>FTLTI</u>	<u>SSLQS</u>	<u>EDFAE</u>	<u>YYCQQ</u>	<u>YNNYP</u>

Negro: Aminoácidos cambiados para secuencia humana.

Subrayado: Regiones CDR

X: Aminoácido variable de acuerdo con cualquiera de las secuencias de ratón o humanizadas

Fig. 9 (continuación)

101

LX: LTFGA GTKLE LKR
 LM: LTFGA GTKLE LKR
 L0: LTFGA GTKLE LKR
 L1: LTFGA GTKLE LKR
 L2: LTFGA GTKLE LKR
 L3: LTFGA GTKLE LKR
 L4: LTFGA GTKLE LKR
 L5: LTFGA GTKLE LKR
 L6: LTFGA GTKLE LKR
 L7: LTFGA GTKLE LKR
 L8: LTFGA GTKLE LKR
 L9: LTFGA GTKLE LKR
 L10: LTFGA GTKLE LKR
 L11: LTFGA GTKLE LKR
 L12: LTFGA GTKLE LKR
 L13: LTFGA GTKLE LKR
 L14: LTFGA GTKLE LKR
 L15: LTFGA GTKLE LKR
 L16: LTFGA GTKLE LKR
 L17: LTFGA GTKLE LKR
 L18: LTFGA GTKLE LKR
 L19: LTFGA GTKLE LKR
 L20: LTFGA GTKLE LKR
 L21: LTFGA GTKLE LKR
 L22: LTFGA GTKLE LKR
 L23: LTFGA GTKLE LKR
 L24: LTFGA GTKLE LKR
 L25: LTFGA GTKLE LKR
 L26: LTFGA GTKLE LKR
 L27: LTFGA GTKLE LKR
 L28: LTFGA GTKLE LKR
 L29: LTFGA GTKLE LKR

Negro: Aminoácidos cambiados para secuencia humana.

Subrayado: Regiones CDR

X: Aminoácido variable de acuerdo con cualquiera de las secuencias de ratón o humanizadas