

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 818**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 5/02 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016 PCT/US2016/022943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16149535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016 E 16765773 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3270965**

54 Título: **Anticuerpos CD48 y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

18.03.2015 US 201562134981 P

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

24.11.2020

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**LEWIS, TIMOTHY;
GORDON, KRISTINE y
WESTENDORF, LORI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 795 818 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

Anticuerpos CD48 y conjugados de los mismos

5 Campo de la invención

La invención proporciona anticuerpos humanizados que se unen específicamente a CD48 y sus conjugados.

Antecedentes de la invención

10 El antígeno CD48 (Grupo de diferenciación 48) también se conoce como marcador de activación de linfocitos B (BLAST-1) o molécula de activación de la señalización linfocítica 2 (SLAMF2). CD48 es un miembro de la subfamilia CD2 de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) que incluye proteínas SLAM (moléculas de activación de la señalización de linfocitos), tales como CD84, CD150, CD229 y CD244. CD48 se encuentra en la superficie de los linfocitos y otras células inmunes y células dendríticas, y participa en las vías de activación y diferenciación en estas células. Se sabe que CD48 se expresa en las células de mieloma múltiple y otros cánceres de origen en células B, por ejemplo, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crónica (CLL), gammapatía monoclonal de importancia desconocida (MGUS), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), células tumorales primarias/sistémicas de pacientes con amiloidosis y linfoma folicular (FL).

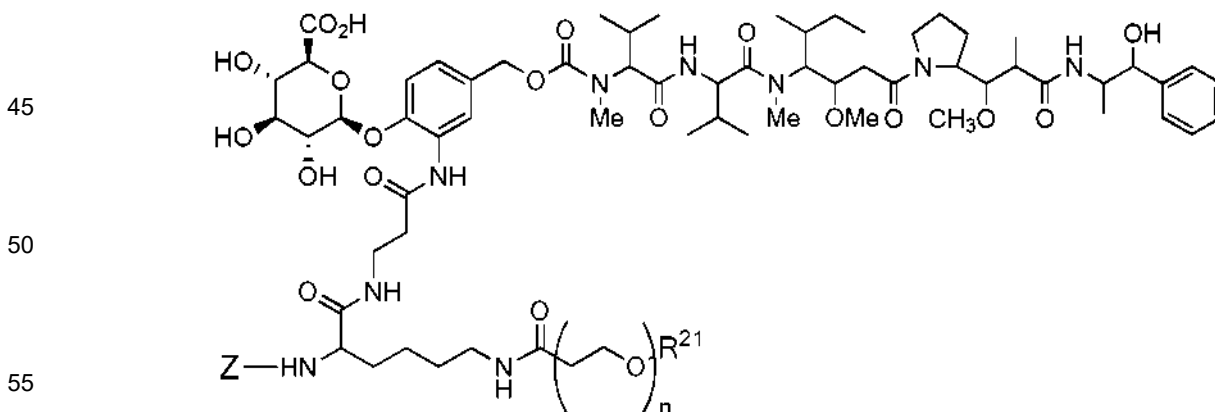
20 Los documentos de patente n^{os} EP1749538, EP2418222 y WO9735614 describen los anticuerpos anti-CD 48.

Breve resumen de la invención

25 La invención se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado que se une específicamente a la proteína CD48 humana. El anticuerpo incluye secuencias de CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO:3-5 y las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:6-8. El anticuerpo exhibe una mayor afinidad de unión a la proteína CD48 humana, en comparación con un anticuerpo murino que se une específicamente a la proteína CD48 humana y también incluye las secuencias CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:3-5 y las secuencias CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:6-8. En una modalidad, el anticuerpo humanizado exhibe una afinidad de unión al menos 2 veces mayor por la proteína CD48 humana, en comparación con el anticuerpo murino. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo de la invención incluye la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:1. El anticuerpo de la invención incluye la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:2. En una modalidad adicional, el anticuerpo incluye la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:1 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:2. En una modalidad, el anticuerpo se conjuga con un fármaco citotóxico unido a un enlazador.

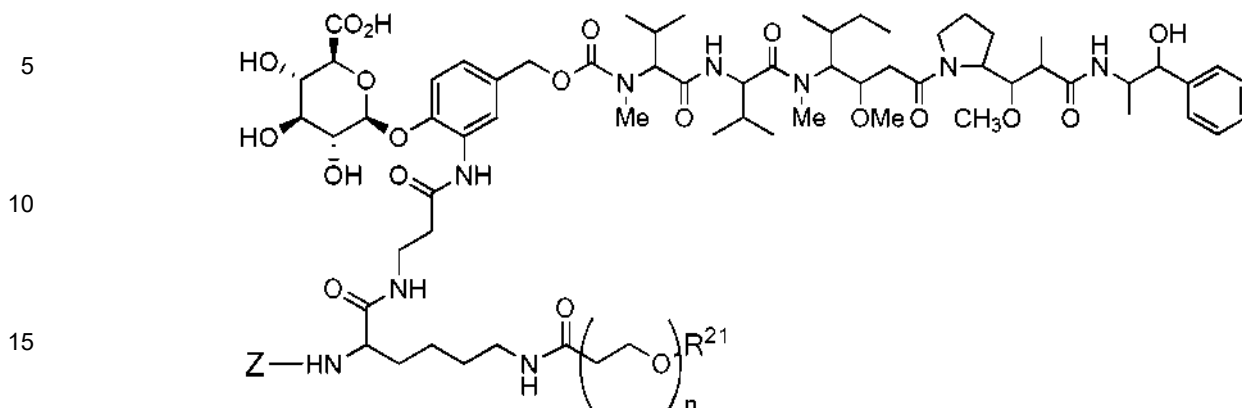
40 En una modalidad adicional, el enlazador de fármaco unido al anticuerpo tiene la fórmula:



60 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que Z representa una porción orgánica que tiene un sitio reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo para formar un enlace covalente al mismo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol.

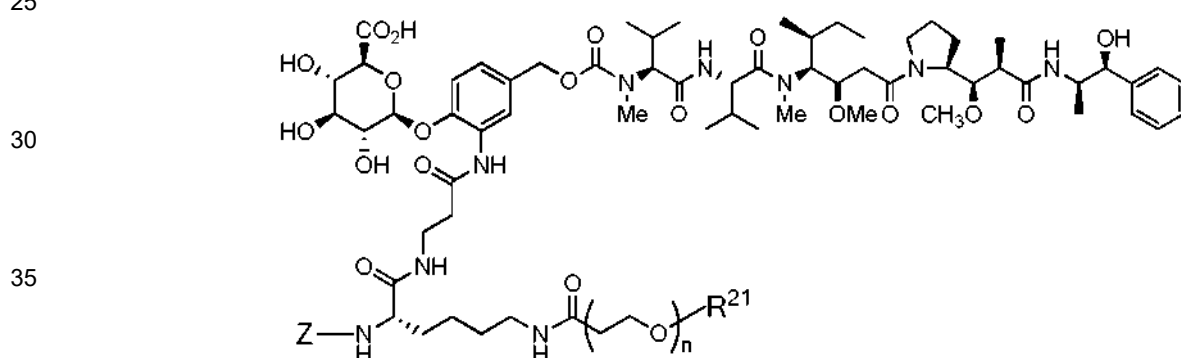
65 La invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la proteína CD48 humana, que incluye una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:2.

El anticuerpo, en una modalidad, se conjuga con un fármaco citotóxico unido a un conector. Un enlazador de fármacos ilustrativo tiene la fórmula:



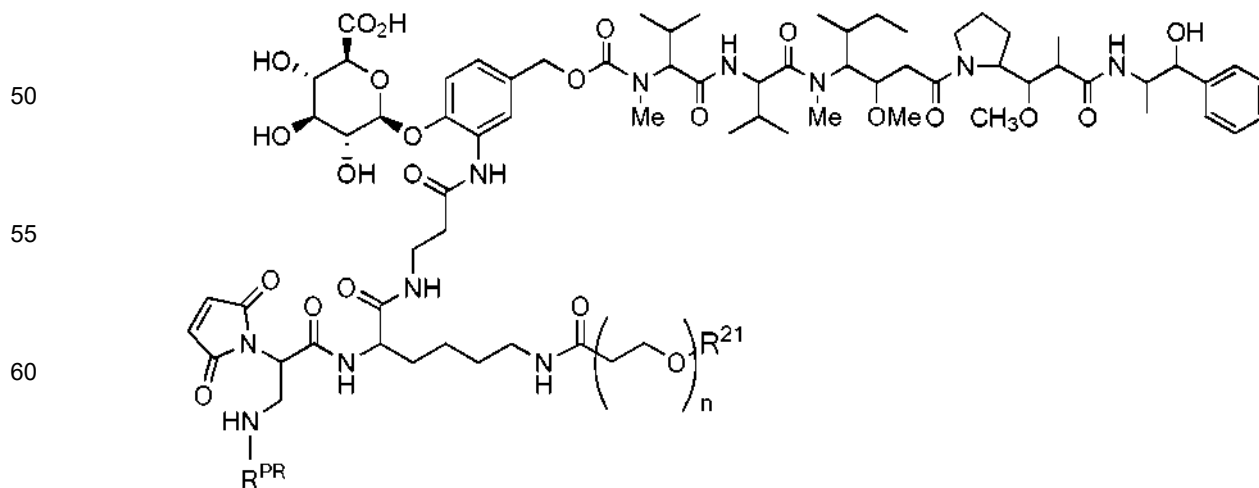
20 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que Z representa una porción orgánica que tiene un sitio reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo para formar un enlace covalente al mismo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol.

25 Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:

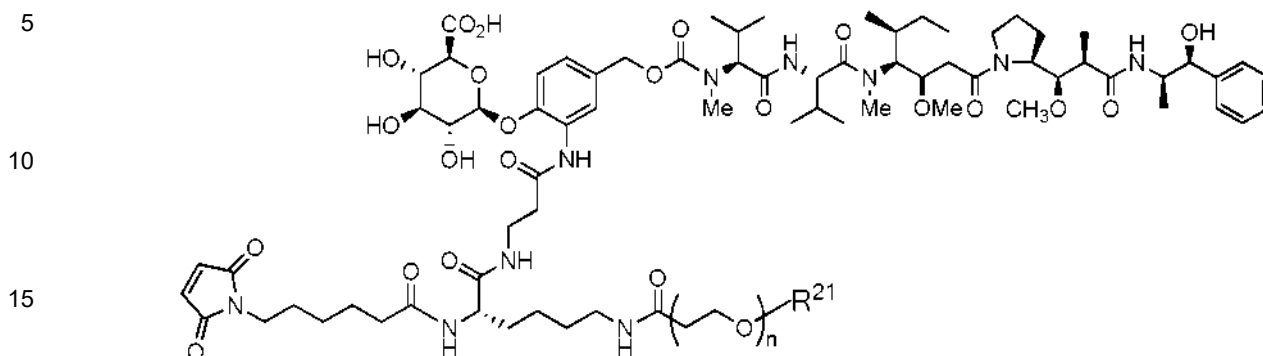


40 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que Z representa una porción orgánica que tiene un sitio reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo para formar un enlace covalente al mismo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol.

45 Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula

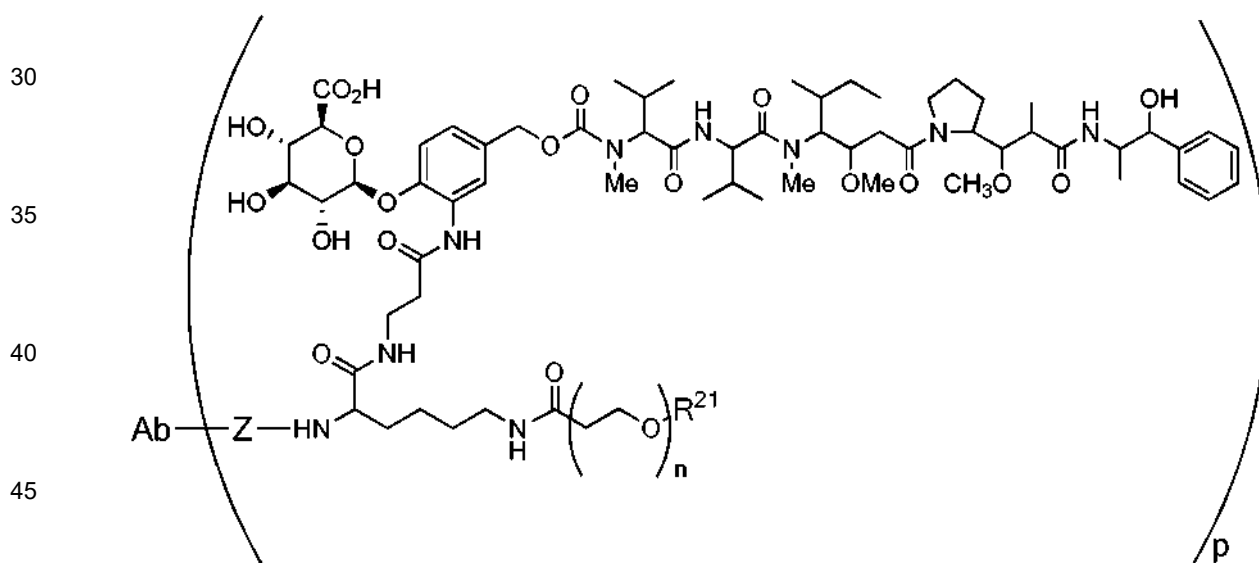


una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol. Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula



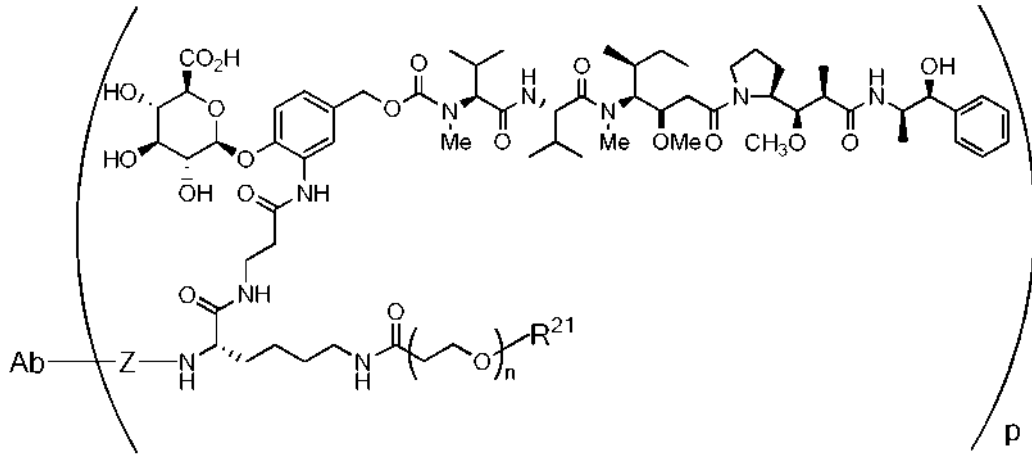
20 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol. En algunas modalidades de esta descripción, el valor n puede encontrarse en el intervalo de 8 a 14. En otra modalidad de esta descripción, el valor n se encuentra en el intervalo de 10 a 12. En una modalidad adicional de esta descripción, el valor de n es 12. En otra modalidad, R²¹ es -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H.

25 En otro aspecto, esta descripción proporciona un compuesto conjugado de anticuerpo anti-CD48-fármaco que tiene la fórmula



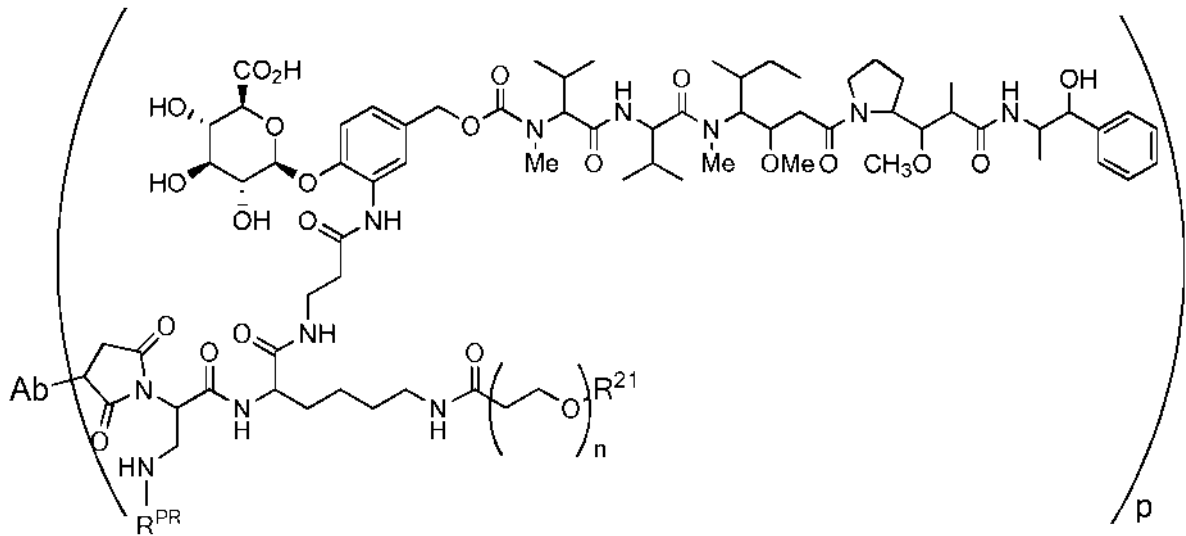
50 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, Z representa una porción orgánica que une el anticuerpo y el resto del enlazador del fármaco a través de enlaces covalentes, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol, y p es de 1 a 16. El anticuerpo puede ser cualquiera de los anticuerpos anti-CD48 descritos. En una modalidad preferida, el anticuerpo tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:2.

55 Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:



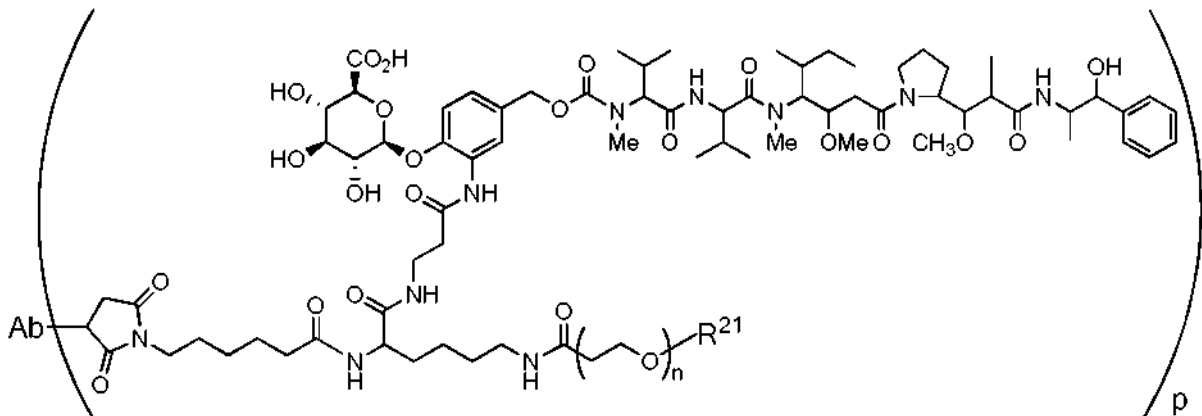
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:



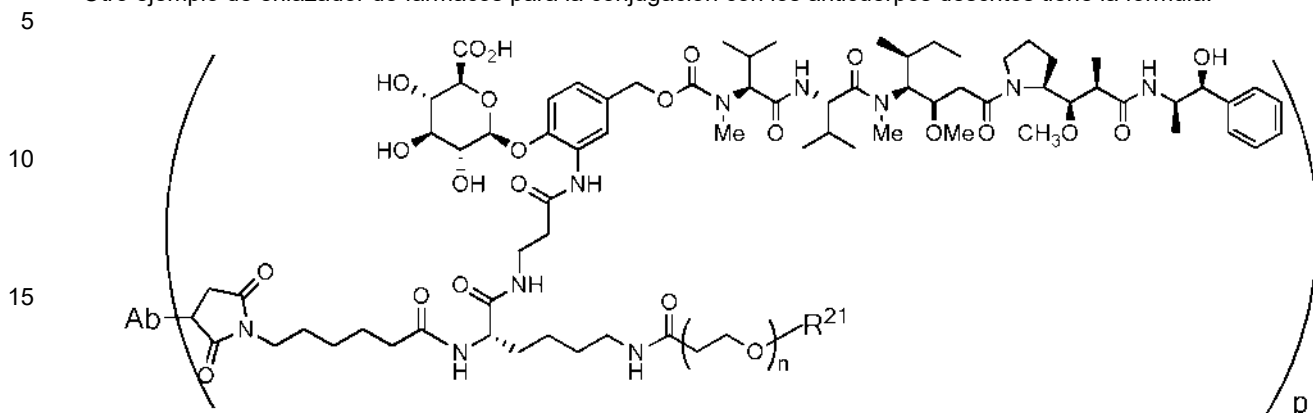
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector.

Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:



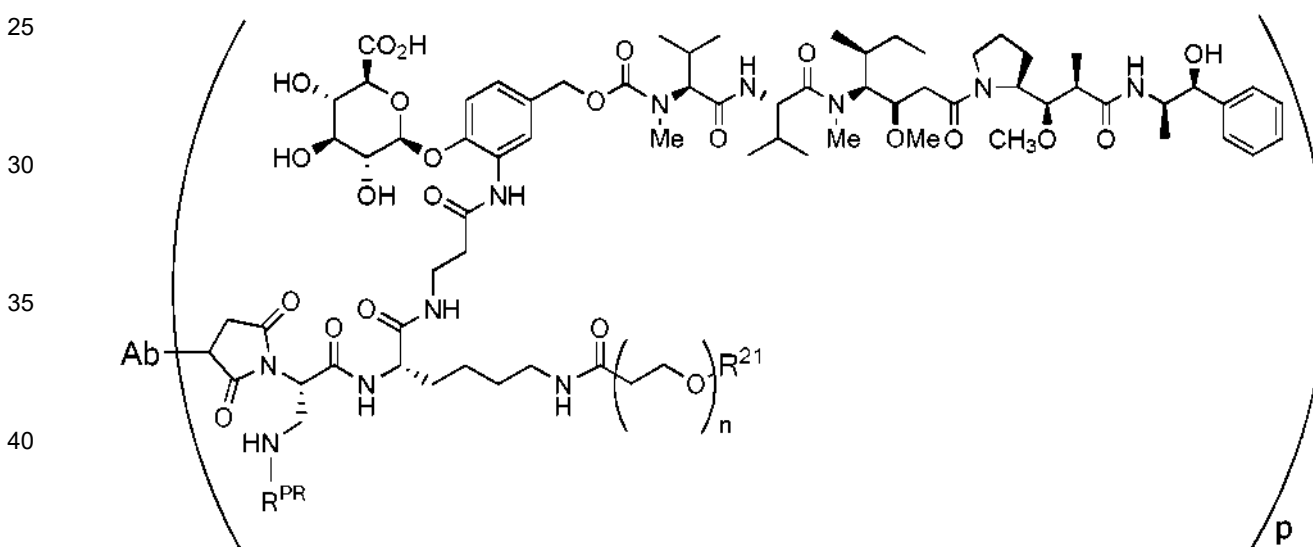
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro ejemplo de enlazador de fármacos para la conjugación con los anticuerpos descritos tiene la fórmula:



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector.

En algunas modalidades de esta descripción, el valor n puede encontrarse en el intervalo de 8 a 14. En otra modalidad de esta descripción, el valor n se encuentra en el intervalo de 10 a 12. En una modalidad adicional de esta descripción, el valor de n es 12. En otra modalidad, R²¹ es -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H.

En otra modalidad, cualquiera de los conjugados anticuerpos-fármacos descritos tiene un valor p de 8. En otra modalidad, el enlazador del fármaco se une al anticuerpo a través de los residuos de cisteína de los enlaces disulfuro intercadena del anticuerpo.

En otra modalidad, la composición de conjugado anticuerpo-fármaco incluye una población de moléculas de conjugado anticuerpo-fármaco anti-CD48 con una carga media de fármaco de 8 y siendo 8 la carga de fármaco predominante en la composición.

En otro aspecto, esta descripción proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen el conjugado de anticuerpo-fármaco CD48 descrito en la presente.

En un aspecto adicional, los conjugados de anticuerpo-fármaco CD48 se usan para tratar pacientes con un cáncer que expresa CD48. El cáncer que expresa CD48, en una modalidad, es el mieloma múltiple. En otras modalidades, el cáncer que expresa CD48 es una neoplasia maligna de células B, por ejemplo, linfoma no hodgkins, linfoma folicular, linfoma de células del manto, gammapatía monoclonal de significado desconocido (MGUS), macroglobulinemia de

Waldenstrom (WM), células tumorales de pacientes con amiloidosis primaria/sistémica y leucemia linfocítica crónica. Otro ejemplo de un cáncer que expresa CD48 que puede tratarse con el uso de los métodos descritos en la presente es la leucemia mielógena aguda.

5 Definiciones

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler y otros, (1975) *Nature* 256:495, o puede hacerse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4 816 567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago con el uso de las técnicas descritas en Clackson y otros, (1991) *Nature*, 352: 624-628 y Marks y otros, (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, por ejemplo, o puede realizarse con otros métodos. Los anticuerpos descritos en la presente descripción son anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo es típicamente al menos 50% p/p puro de proteínas interferentes y otros contaminantes que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo se combine con un exceso de portador(es) farmacéuticamente aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. A veces, los anticuerpos son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o 99% p/p puro de proteínas y contaminantes interferentes de la producción o purificación. Los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos aislados, pueden conjugarse con agentes citotóxicos y proporcionarse como conjugados de fármaco y anticuerpos.

Un polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de componentes de su naturaleza.

La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno objetivo significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . La unión específica es detectablemente mayor en magnitud y puede distinguirse de la unión no específica que se produce al menos a un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre los grupos funcionales particulares o ajustes espaciales particulares (por ejemplo, tipo llave y cerradura), mientras que la unión no específica es generalmente el resultado de las fuerzas de van der Waals. Los conjugados anticuerpos-fármacos dirigidos a CD48 y los anticuerpos anti-CD48 se unen específicamente a CD48.

La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente unida a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina frecuentemente como una región variable madura. Por lo tanto, por ejemplo, una región variable madura de la cadena ligera significa una región variable de la cadena ligera sin el péptido señal de la cadena ligera. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones subíndices o constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Ver *generalmente*, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2da ed. Raven Press, NY, 1989, capítulo. 7). Las regiones maduras variables de cada par de cadena ligera /pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o las CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde el terminal N al terminal C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia y otros, *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (sistema de numeración Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes regiones variables de la cadena pesada o entre diferentes regiones variables de la cadena ligera se les asigna el mismo número. La numeración de la región constante de la cadena pesada se realiza a través del índice de la UE como se establece en Kabat (*Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991).

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena

5 ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}, según sea apropiado para la clase de anticuerpos. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivaron para la unión específica al objetivo, incluyendo cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos y Fv. Los fragmentos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye un diacuerpo (fragmento Fv homodimérico) o un minicuerpo (V_L-V_H-C_{H3}), un anticuerpo biespecífico o similar. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes (ver, *por ejemplo*, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny y otros., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

10 El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento ya sea profiláctico o terapéutico.

15 Para propósitos de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

20 El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región de anticuerpo sujeto (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre el sujeto y las regiones de anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en el sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con espacios sin contar, multiplicados por 100 para convertir a porcentaje.

25 Las composiciones o métodos que "comprenden" uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no específicamente enumerados. Por ejemplo, una composición que comprende anticuerpos puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

30 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad del conjugado anticuerpo-fármaco que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (*es decir*, desacelerar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (*es decir*, desacelerar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir el crecimiento tumoral; y/o aliviar uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). El término "régimen efectivo" se refiere a una combinación de la cantidad de conjugado que se administra y la frecuencia de dosificación adecuada para lograr el tratamiento del trastorno.

35 Los términos "tratar" o "tratamiento", a menos que el contexto indique lo contrario, se refieren al tratamiento terapéutico en donde el objeto es inhibir o desacelerar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la propagación del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, un estado de enfermedad estabilizado (*es decir*, que no empeora), retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o completa), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos con enfermedad detectable. Aquellos que necesitan tratamiento también pueden incluir aquellos con enfermedad indetectable, por ejemplo, pacientes que han logrado una respuesta completa después del tratamiento para el trastorno que expresa CD48 pero que necesitan terapia para prevenir una recaída.

40 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aceptado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figura en la farmacopea de EE. UU. U otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra a un sujeto un anticuerpo anti-CD48 o un conjugado anticuerpo-fármaco.

45 La frase "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables. Las sales ilustrativas incluyen sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato,

- 5 ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1' metilen bis-(2 hidroxí 3 naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los ejemplos donde múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples iones contrarios. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.
- 10 Los solvatos en el contexto de la invención son aquellas formas de los compuestos de la invención que forman un complejo en estado sólido o líquido a través de la coordinación con moléculas solventes. Los hidratos son una forma específica de solvatos, en la que la coordinación se lleva a cabo con agua. Los solvatos preferidos en el contexto de la presente invención son hidratos.
- 15 A menos que sea evidente por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de una desviación estándar de un valor establecido.
- Breve descripción de los dibujos
- 20 La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo murino MEM102 y las secuencias de la región variable de la cadena pesada de vHA, vHB y vHC humanizado y el aceptor de la línea germinal humana seleccionado.
- 25 La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo MEM102 murino y las secuencias de la región ligera de vLA, vLB y vLC humanizadas y la región variable del aceptor de línea germinal humano seleccionado.
- 30 La Figura 3 muestra las curvas de unión de saturación para anticuerpos MEM102 en las células de mieloma múltiple U-266 humano.
- La Figura 4 muestra las curvas de unión de saturación para los anticuerpos MEM102 en células CHO transfectadas con CD48 de mono cinomolgo.
- 35 La Figura 5 muestra la activación de la caspasa 3/7 (muerte celular apoptótica) en células de mieloma múltiple NCI-H929 humanas después del tratamiento con los ADC MEM-102.
- La Figura 6 muestra la activación de la caspasa 3/7 en células de mieloma múltiple U-266 humanas después del tratamiento con los ADC MEM-102.
- 40 La Figura 7 muestra la actividad in vivo de los ADC hMEM102 en un modelo de xenoinjerto de ratón implantado con células NCI-H929. Este es un modelo diseminado de mieloma múltiple.
- 45 La Figura 8 muestra la actividad in vivo de los ADC hMEM102 en un modelo de xenoinjerto de ratón implantado con células NCI-H929. Este es un modelo subcutáneo de mieloma múltiple.
- La Figura 9 muestra la actividad in vivo de los ADC hMEM102 en un modelo de xenoinjerto de ratón implantado con células MM.1R. Este es un modelo diseminado de mieloma múltiple.
- 50 La Figura 10 muestra la actividad in vivo de los ADC hMEM102 en un modelo de xenoinjerto de ratón implantado con células MM.1R. Este es un modelo subcutáneo de mieloma múltiple.
- La Figura 11 muestra la actividad in vivo de los ADC hMEM102 en un modelo de xenoinjerto de ratón implantado con células EJM. Este es un modelo diseminado de mieloma múltiple.
- 55 Descripción detallada
- La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los conjugados de anticuerpo-fármaco, incluyendo los conjugados de anticuerpo-fármaco MMAE-pegilado dirigidos a CD48 son particularmente efectivos para matar las células que expresan CD48+. En particular, se descubrió que se podía construir un anticuerpo humanizado MEM102 de alta afinidad utilizando como secuencia aceptor la región variable de la cadena pesada la línea germinal humana de la región variable de la cadena pesada hlgG VH7-4-1/hlgG-JH5. Para la región variable de la cadena ligera, una secuencia aceptor preferida es la línea germinal humana de la región variable de la cadena ligera hlgG-VK6-21/hlgG-JK4. En particular, el anticuerpo humanizado MEM102 de alta afinidad se construyó sin la necesidad de realizar la maduración por afinidad y al mismo tiempo retener la identidad de las CDR del anticuerpo murino. El anticuerpo humanizado MEM102 de alta afinidad también fue eficaz en la administración de fármacos como parte de un conjugado de fármaco y anticuerpos. Cuando se conjugó con un enlazador de fármaco MMAE pegilado SGD-5088,
- 60
- 65

el conjugado resultante de 8 cargas hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE fue altamente activo contra un panel de múltiples líneas celulares de mieloma.

Moléculas objetivo

5 A menos que se indique de cualquier otra forma, CD48 se refiere a CD48 humano. A una secuencia humana ilustrativa se le asigna el número de acceso de GenBank CAG33293.1.

Anticuerpos de la invención

10 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el que las CDR de un anticuerpo "donador" no humano se injertan en las secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (ver, por ejemplo, Queen, US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; y Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpos aceptores pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpos humanos maduros, un
15 secuencia de la región de línea germinal.

Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDR completa o esencialmente de un anticuerpo donador no humano y secuencias marco de la región variable y las regiones constantes, si están
20 presentes, completa o esencialmente de las secuencias de anticuerpos humanos. De manera similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y generalmente las tres CDR completa o esencialmente de una cadena pesada del anticuerpo donador, y una secuencia marco de la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada, si está presente, esencialmente de las secuencias marco de la región variable de la cadena pesada humana y de región constante. De manera similar, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y
25 generalmente las tres CDR completa o esencialmente de una cadena ligera del anticuerpo donador, y una secuencia marco de la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera, si está presente, esencialmente de las secuencias marco de la región variable de la cadena ligera humana y de región constante. Además de nanocuerpos y diacuerpos, un anticuerpo humanizado típicamente comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado o humano es esencialmente de o esencialmente
30 idéntica a una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos 60%, 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (según lo definido por Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. En algunas modalidades, una CDR en un anticuerpo humanizado es esencialmente o esencialmente idéntica a una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando no hay más de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos en cada CDR. Las secuencias marco de la región variable de una cadena de anticuerpos o la región constante de una
35 cadena de anticuerpos son esencialmente de una secuencia marco de la región variable humana o región constante humana, respectivamente, cuando al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos. En algunos anticuerpos humanizados de la presente invención, no hay mutaciones posteriores en la región marco variable de la cadena pesada del anticuerpo y no hay mutaciones posteriores en la región variable de la cadena ligera del anticuerpo.

40 Aunque los anticuerpos humanizados frecuentemente incorporan las seis CDR (preferentemente según lo definido por Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de la totalidad de las CDR (por ejemplo, al menos 3, 4 o 5) CDR de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis y otros, J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos y otros, Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002; Iwahashi y otros, Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura y otros, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

Ciertos aminoácidos de los residuos del marco de la región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de la CDR y/o unión al antígeno. La investigación de tales
50 posibles influencias es mediante el modelaje, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

La invención proporciona anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD48. Los anticuerpos preferidos son anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo MEM102 murino. Una secuencia aceptora preferida para la región variable de la cadena pesada es la línea germinal humana de la región variable de la cadena pesada hlgG VH7-4-1/hlgG-JH5.
55 Para la región variable de la cadena ligera, una secuencia aceptor preferida es la línea germinal humana de la región variable de la cadena ligera hlgG-VK6-21/hlgG-JK4.

Un anticuerpo anti-CD48 ilustrativo es un anticuerpo humanizado que incluye las CDR de cadena pesada como se establece en la SEC ID NO: 1 y las CDR de cadena ligera como se establece en la SEC ID NO:2 y además tiene una
60 región variable de cadena pesada madura con al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera madura con al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2. Las CDR son como definidos por Kabat.

Las formas humanizadas del anticuerpo MEM102 de ratón incluyen tres regiones variables maduras de cadena pesada humanizadas ejemplificadas (HA-HC) y tres regiones variables maduras de cadena ligera humanizadas ejemplificadas (LA-LC). Las permutaciones de estas cadenas incluyen HALA, HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB y
65

HCLC. De estas permutaciones, se prefiere HALA. HALA comprende la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO:1 y la cadena ligera establecida en la SEQ ID NO:2. Sin embargo, puede usarse cualquiera de HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB y HCLC en lugar de HALA.

- 5 En algunos aspectos, la constante de disociación aparente (kd) de los anticuerpos MEM102 humanizados para CD48 humano está preferentemente dentro del intervalo de 0,1 nM a 10 nM, incluso con mayor preferencia dentro del intervalo de 0,1 nM a 5 nM, incluso preferentemente dentro del intervalo de 1 nM a 3 nM o 2 nM a aproximadamente 3 nM. En algún aspecto, los anticuerpos tienen una constante de disociación aparente dentro del intervalo de 0,1 a 2,0 veces, o incluso 0,5 a 4 veces mayor que la constante de disociación aparente del anticuerpo MEM102 murino para CD48 humano. En algunos aspectos, la constante de disociación aparente (kd) de los anticuerpos para CD48 humano es de aproximadamente 5,0.

Selección de región constante

- 15 Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos MEM102 humanizados pueden unirse al menos a una porción de una región constante humana. La elección de la región constante puede depender, en parte, de si se desea la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen una fuerte citotoxicidad dependiente del complemento, el isotipo humano IgG2 tiene una citotoxicidad débil dependiente del complemento y la IgG4 humana carece de citotoxicidad dependiente del complemento. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios suscritos de cadena pesada y ligera se unen a través de un espaciador.

- 20 Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre los diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden variar en los diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes.

- 25 Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxilo de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Pueden hacerse sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, tal como citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (ver, por ejemplo, Winter y otros., patente de los Estados Unidos n.º 5,624,821; Tso y otros, patente de los Estados Unidos n.º 5,834,597; y Lazar y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (ver, por ejemplo, Hinton y otros., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

- 35 La región constante puede modificarse para permitir la conjugación sitio específica de un enlazador de fármacos. Dichas técnicas incluyen el uso de residuos de cisteína, puentes disulfuro, secuencias de polihistidina, etiquetas de glicoingeniería y secuencias de reconocimiento de transglutaminasa de origen natural o diseñados por ingeniería genética. Una sustitución ilustrativa para la conjugación sitio específica con el uso de la transglutaminasa bacteriana es N297S o N297Q. Una sustitución ilustrativa para la conjugación sitio específica con el uso de una cisteína diseñada por ingeniería genética es S239C. Los fragmentos de anticuerpos también pueden modificarse para la conjugación sitio específica de un enlazador de fármacos, ver, por ejemplo, Kim y otros, Mol Cancer Ther 2008;7(8).

Expresión de anticuerpos recombinantes

- 40 Los anticuerpos MEM102 humanizados o quiméricos pueden producirse mediante la expresión recombinante. Los constructos de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, que incluyen regiones promotoras heterólogas o asociadas de forma natural. Preferentemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar las células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

- 45 Las células de mamífero son un huésped preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Ver Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado en la materia varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO (por ejemplo, DG44), varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos, incluyendo Sp2 /0 y NS0. Preferentemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen y otros, Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y los sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de

control de expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares. Ver Co y otros, J. Immunol. 148:1149 (1992).

5 Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluida la purificación por HPLC, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel y similares (ver en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Ácidos nucleicos

10 La invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras humanizadas descritas en la presente. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado a las regiones variables maduras de la cadena pesada y ligera. Las secuencias codificantes en ácidos nucleicos pueden estar en enlace operable con las secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de la transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden separarse, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

20 Esta descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en HA, HB o HC. Por ejemplo, el polinucleótido aislado puede codificar una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Este polinucleótido aislado puede codificar además una región constante de cadena pesada de IgG humana. El isotipo de la región constante de IgG es, por ejemplo, IgG1 IgG2, IgG3 o IgG4. Por ejemplo, el isotipo de la región constante de IgG es IgG1. Por ejemplo, la región constante de IgG1 codificada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución en el residuo 239, de acuerdo con el índice de UE establecido en el sistema Kabat, es decir, S239C. La descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en HA, HB o HC (por ejemplo, SEQ ID NO:1 o variantes de las mismas), y además, un célula huésped que comprende ese vector de expresión. Por ejemplo, la célula huésped es una célula huésped de mamífero, por ejemplo, una célula CHO.

35 Esta descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en LA, LB o LC. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Este polinucleótido aislado puede codificar además una región constante de la cadena ligera de IgG humana. El isotipo de la región constante de la cadena ligera de IgG es, por ejemplo, una región constante kappa. La descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en LA o LB o LC (por ejemplo, SEQ ID NO:2 o variantes de las mismas), y además, un célula huésped que comprende ese vector de expresión. Por ejemplo, la célula huésped es una célula huésped de mamífero, por ejemplo, una célula CHO.

45 En otra modalidad, esta descripción proporciona un polinucleótido o polinucleótidos aislado(s) que codifica(n) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera que forman un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CD48 humano. Esta descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido o polinucleótidos aislado(s) que codifica(n) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. También se proporciona una célula huésped que comprende el vector o vectores de expresión. La célula huésped es preferentemente una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO.

55 En otra modalidad, esta descripción proporciona un primer y un segundo vector que comprenden un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera forman un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD48 humano. Se proporcionan las células huésped que comprenden los vectores, preferentemente las células huésped de mamíferos, tales como una célula CHO.

60 Conjugados de anticuerpo-fármaco

65

Los anticuerpos anti-CD48 pueden conjugarse con agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico o agentes estabilizadores para formar conjugados de anticuerpos. Los anticuerpos anti-CD48 conjugados con agentes terapéuticos se denominan en la presente descripción como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Los agentes terapéuticos ilustrativos tienen un efecto citostático o citotóxico y también pueden denominarse agentes citotóxicos o agentes citostáticos. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, auristatinas, camptotecinas, calicheamicinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinoides (por ejemplo, DM1, DM2, DM3, DM4), taxanos, benzodiazepinas (por ejemplo, pirrolo[1,4]benzodiazepinas, indolinobenzodiazepinas, y, oxazolidinobenzodiazepinas que incluyen dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina, dímeros de indolinobenzodiazepina y dímeros de oxazolidinobenzodiazepina) y alcaloides vinca.

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos, son bien conocidas. (Ver, por ejemplo, Alley y otros, *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14 (3):154-169.) Típicamente, el agente terapéutico se conjuga con el anticuerpo a través de una unidad de enlace. La unidad de enlace puede ser escindible o no escindible. Por ejemplo, el agente terapéutico puede unirse al anticuerpo con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el entorno intracelular de la célula cancerosa que expresa CD48 pero no es esencialmente sensible al entorno extracelular, de modo que, el conjugado se separa del anticuerpo cuando es internalizado por la célula cancerosa que expresa CD48 (por ejemplo, en el entorno endosómico, lisosómico o en el entorno caveolar). En otro ejemplo, el agente terapéutico puede conjugarse con el anticuerpo a través de un enlazador no escindible y la liberación del fármaco es mediante la degradación total del anticuerpo después de la internalización por la célula cancerosa que expresa CD48.

Típicamente, el ADC comprenderá una región de enlace entre el agente citotóxico o citostático y el anticuerpo anti-CD48. Como se indicó anteriormente, típicamente, el enlazador puede ser escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que se escinde mediante una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye una proteasa lisosómica o endosómica. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina (ver, por ejemplo, Dubowchik y Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999). Los más típicos son los enlazadores peptídicos que pueden escindirse mediante enzimas que están presentes en las células que expresan CD48. Por ejemplo, puede usarse un enlazador peptídico que es escindible por la proteasa catepsina B dependiente de tior, que se expresa altamente en tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador que comprende un péptido Phe-Leu o Val-Cit). El enlazador también puede ser un enlazador de carbohidratos, incluyendo un enlazador de azúcar que es escindido por una glucosidasa intracelular (por ejemplo, un enlazador de glucurónido escindible por una glucuronidasa).

El enlazador también puede ser un enlazador no escindible, tal como un enlazador maleimido-alquileo o maleimida-riilo que se une directamente al agente terapéutico y se libera por degradación proteolítica del anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD48 puede conjugarse con el enlazador a través de un heteroátomo del anticuerpo. Estos heteroátomos pueden estar presentes en el anticuerpo en su estado natural o pueden introducirse en el anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD48 se conjugará con el enlazador a través de un átomo de nitrógeno de un residuo de lisina. En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD48 se conjugará con el enlazador a través de un átomo de azufre de un residuo de cisteína. El residuo de cisteína puede ser natural o uno que se diseña por ingeniería genética en el anticuerpo. Los métodos de conjugación de enlazadores y enlazadores de fármacos con anticuerpos mediante residuos de lisina y cisteína se conocen en la materia.

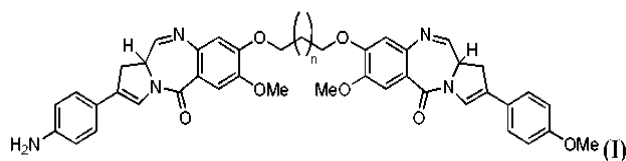
Los ejemplos de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen conjugados anticuerpo-fármaco basados en auristatina (es decir, el componente farmacológico es un fármaco auristatina). Las auristatinas que se unen a la tubulina, se ha demostrado que interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular, y tienen actividad anticancerígena. Típicamente, el conjugado anticuerpo-fármaco basado en auristatina comprende un enlazador entre el fármaco auristatina y el anticuerpo anti-CD48. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador escindible (por ejemplo, un enlazador peptídico, un enlazador de carbohidratos) o un enlazador no escindible (por ejemplo, enlazador liberado por degradación del anticuerpo). Las auristatinas incluyen MMAF, y MMAE. La síntesis y estructura de auristatinas ilustrativas se describen en las publicaciones de los Estados Unidos,

núms. 7,659,241, 7,498,298, 2009-0111756, 2009-0018086, y 7,968, 687.

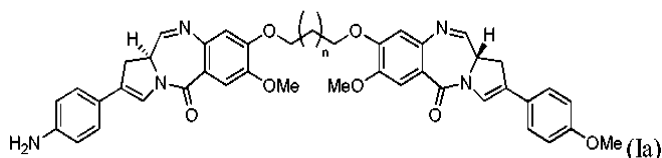
Otros ejemplos de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen conjugados anticuerpo-fármaco maitansinoide (es decir, el componente del fármaco es un fármaco maitansinoide) y conjugados fármaco anticuerpo de la benzodiazepina (es decir, el componente del fármaco es una benzodiazepina (por ejemplo, dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina (dímero PBD), dímeros de indolinobenzodiazepinas y dímeros de oxazolidinobenzodiazepinas)).

Un dímero PBD preferido para usar en la presente invención está representado por la fórmula I. La estereoquímica preferida del dímero PBD es como se muestra en la fórmula:

5



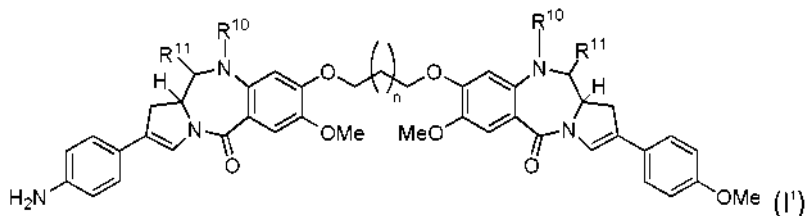
10



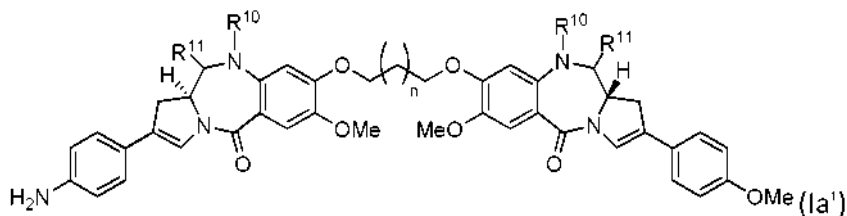
15 una sal, solvato o solvato de la sal farmacéuticamente; en donde el subíndice n es 1 o 3.

Los solvatos de fórmula (I) y (Ia) se forman típicamente a partir de la adición de agua o disolvente alcohólico a través del grupo funcional imina de uno o ambos monómeros PBD para formar carbinolamina(s) y/o éteres de carbinolamina. Por ejemplo, en la posición N10-C11, puede haber una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o un éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) como se representa por las fórmulas I' y Ia' a continuación:

25



30



40

en donde, ya sea:

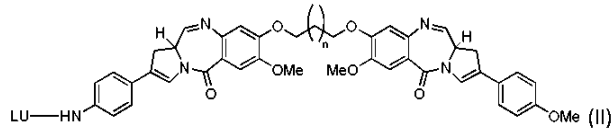
- (a) R^{10} es H, y R^{11} es OH u OR^A , donde R^A es el C_{1-4} alquilo saturado (preferentemente metilo); o
- (b) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o
- (c) uno de R^{10} es H, y R^{11} es OH u OR^A , donde R^A es el alquilo C_{1-4} saturado (preferentemente metilo); y el otro de R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos.

50

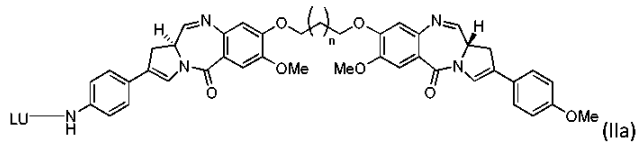
El dímero PBD de fórmula I o Ia (o una sal, solvato o solvato de la sal farmacéuticamente del mismo) está típicamente unido al anticuerpo a través de una unidad de enlace, LU. La unidad de enlace actúa para liberar el dímero PBD de fórmula I o Ia (o una sal, solvato o solvato farmacéuticamente de la sal del mismo) en el sitio objetivo (por ejemplo, dentro de la célula cancerosa). Un compuesto enlazador de fármacos PBD para usar en la presente invención se representa a continuación mediante la fórmula II (estereoquímica preferida como se muestra en IIa) en la que LU es una unidad de enlace. La unidad de enlace puede ser, por ejemplo, una unidad de enlace de péptido escindible (por ejemplo, un enlazador que comprende el péptido valina-alanina) o una unidad de enlace disulfuro escindible:

55

5



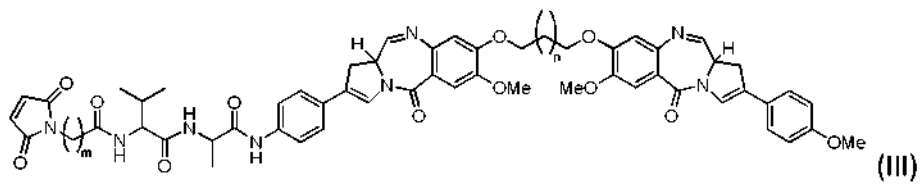
10



una sal, solvato o solvato de la sal farmacéuticamente; en donde el subíndice n es 1 o 3.

15 Un compuesto enlazador de fármaco PBD preferido para usar en la presente invención está representado por la Fórmula III a continuación:

20

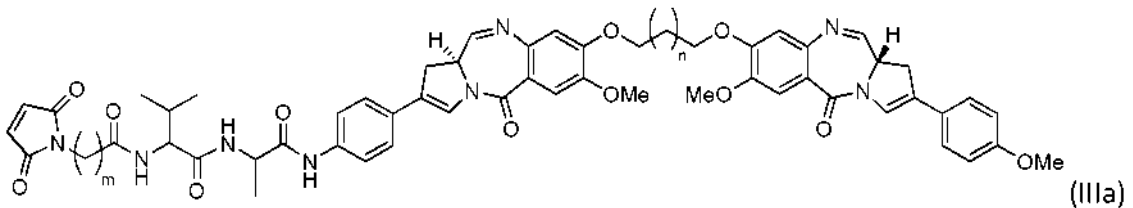


25

una sal, solvato o solvato de la sal farmacéuticamente; en donde el subíndice n es 1 o 3 y el subíndice m es un número entero de 2 a 5.

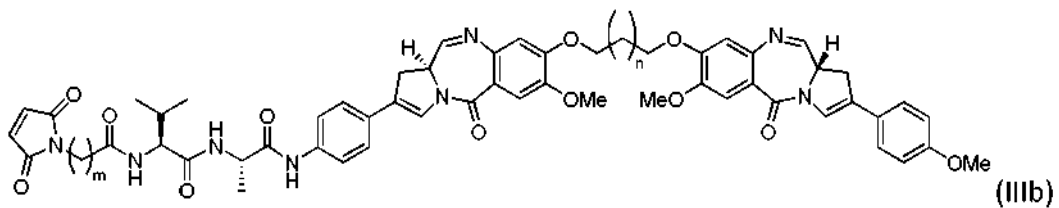
30 La estereoquímica preferida del componente de fármaco PBD del enlazador de fármaco es como se muestra en la Fórmula IIIa a continuación:

35



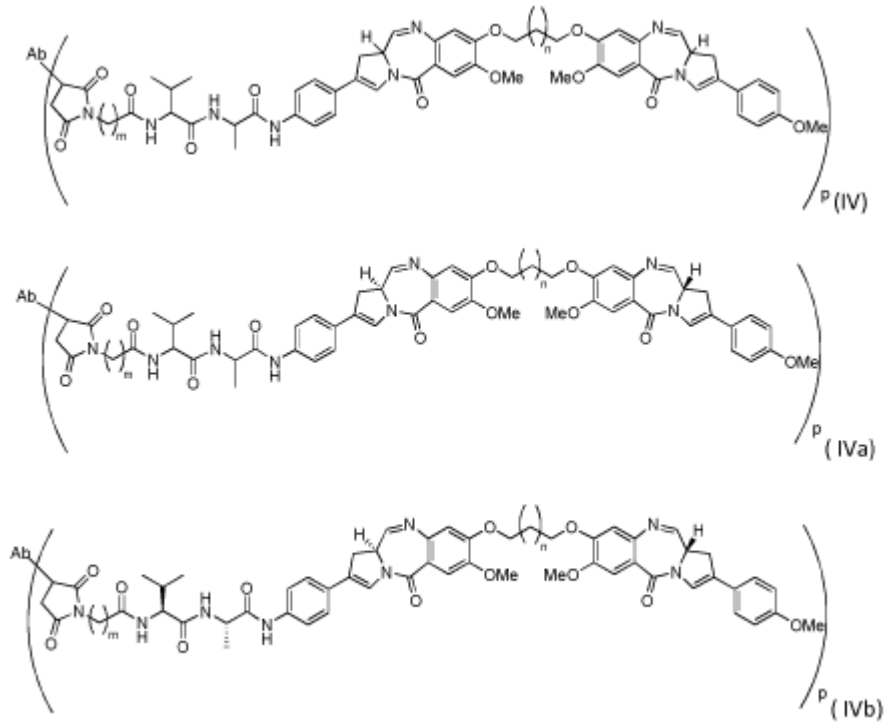
40 La estereoquímica preferida del fármaco PBD y los componentes del enlazador es como se muestra en la Fórmula IIIb a continuación:

45



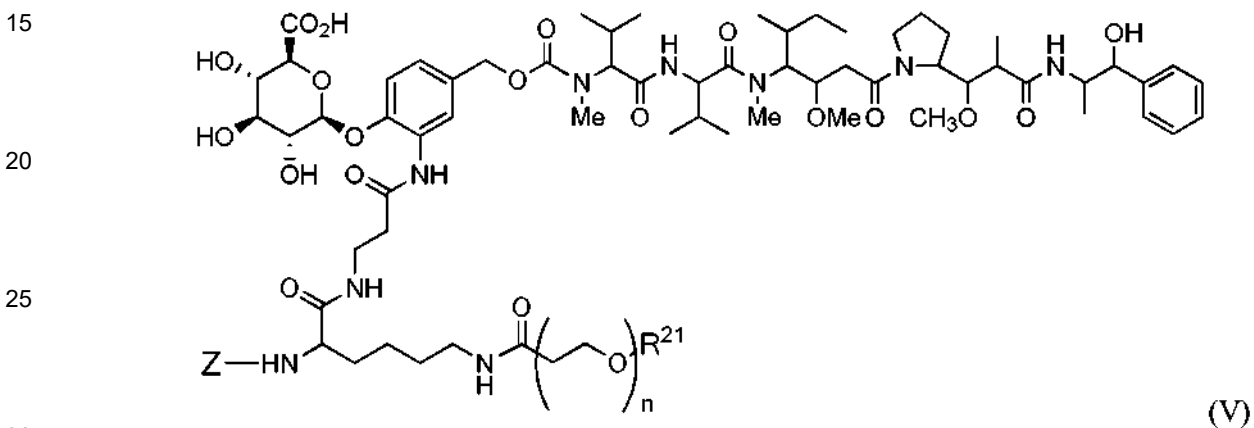
50

El enlazador de fármaco PBD se conjuga con un anticuerpo anti-CD48 para producir un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un enlazador de fármacos de fórmula II o fórmula III. A continuación, se muestra un ejemplo de conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 en las fórmulas IV, IVa y IVb:



5 una sal, solvato o solvato de la sal farmacéuticamente; en donde el subíndice n es 1 o 3; el subíndice m es un entero de 2 a 5; y el subíndice p es de 1 a 4.

Los enlazadores de fármacos ilustrativos incluyen los enlazadores de fármacos MMAE. Los presentes inventores descubrieron que la incorporación de un polímero de polietilenglicol como una cadena lateral en un enlazador de fármacos escindible de MMAE β -glucurónico proporciona conjugados de fármaco de anticuerpo con el aclaramiento plasmático disminuido y actividad antitumoral aumentada en modelos de xenoinjerto en comparación con un control no pegilado. Por consiguiente, los enlazadores de fármacos particularmente ventajosos para la unión a los anticuerpos de la presente invención son los siguientes:

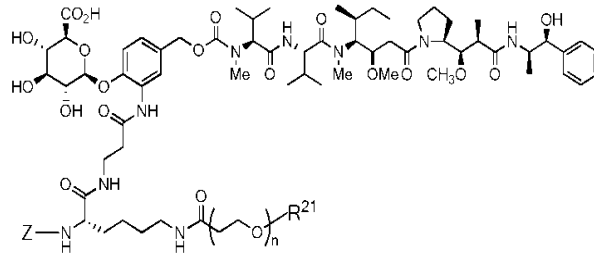


30 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

A continuación, se muestra una estereoquímica preferida para dicho enlazador de fármacos:

35

5



(Va)

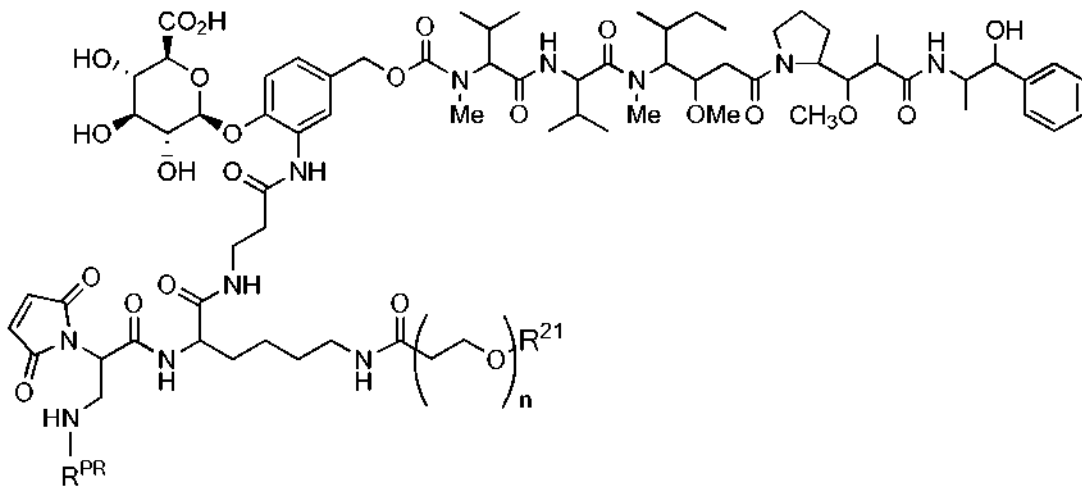
10

15

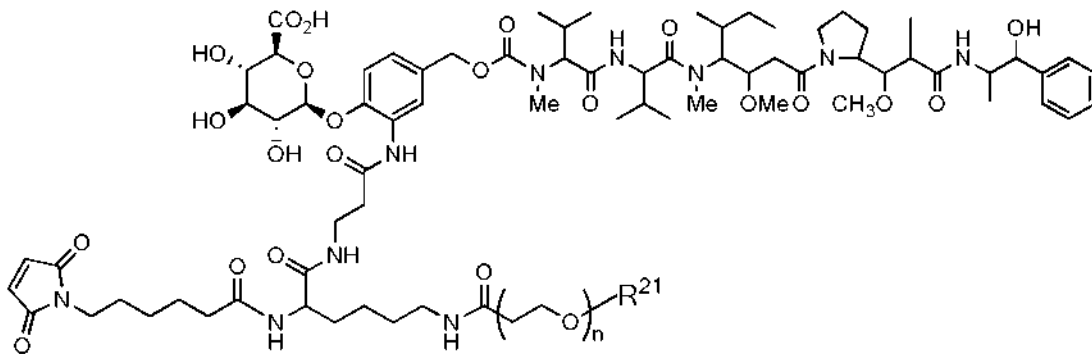
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde para las fórmulas V y Va, Z representa una porción orgánica que tiene un sitio reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo para formar una unión covalente al mismo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36 y con preferencia superlativa se encuentra en el intervalo de 8 a 14 (con preferencia superlativa 12), R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol, preferentemente -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H.

20

Una porción Z preferida es una porción que contiene maleimido. Las porciones Z particularmente preferidos se muestran en los enlaces de fármacos a continuación:



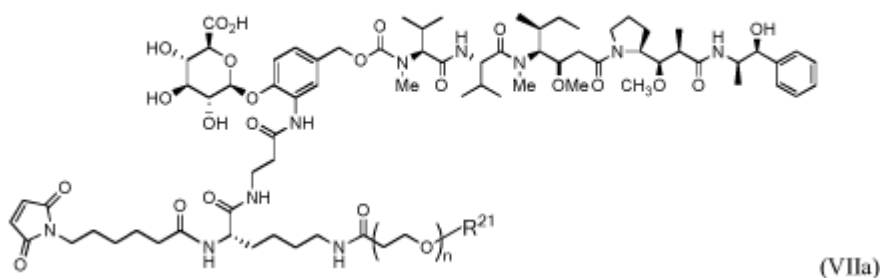
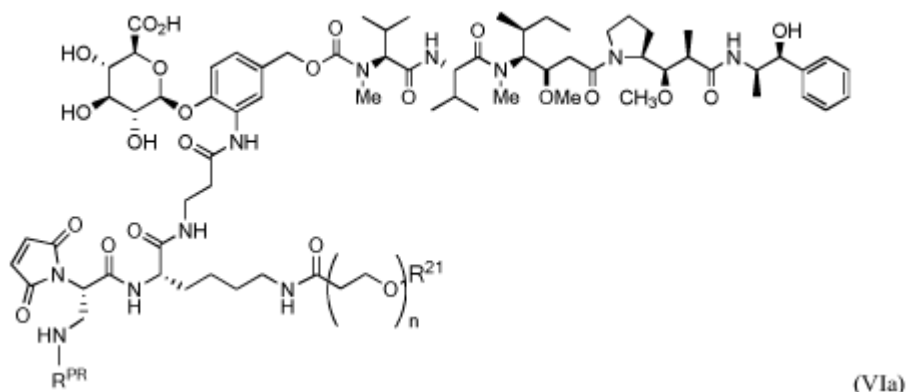
(VI)



(VII)

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

A continuación, se muestra una estereoquímica preferida para dichos enlaces de fármacos:



5 una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde para las fórmulas VI, VIa, VII y VIIa, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36 y con preferencia superlativa se encuentra en el intervalo de 8 a 14 (con preferencia superlativa 12), R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, por ejemplo, grupo protector lábil a ácido, por ejemplo, BOC, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol, preferentemente -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H.

10 Como se señaló anteriormente, R^{PR} puede ser hidrógeno o un grupo protector. Los grupos protectores como se usan en la presente descripción se refieren a grupos que bloquean selectivamente, ya sea temporal o permanentemente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Un grupo protector es un grupo protector adecuado cuando es capaz de prevenir o evitar reacciones secundarias no deseadas o pérdida prematura del grupo protector bajo las condiciones de reacción requeridas para efectuar la transformación química deseada en otra parte de la molécula y durante la purificación de la molécula recién formada cuando se desee, y puede eliminarse en condiciones que no afecten negativamente a la estructura ni la integridad estereoquímica de esa molécula recién formada. Los grupos protectores de amina adecuados incluyen grupos protectores de nitrógeno lábiles a los ácidos, incluyendo los proporcionados por Isidro-Llobel y otros. "Amino acid-protecting groups" Chem. Rev. (2009) 109: 2455-2504. Típicamente, un grupo protector de nitrógeno lábil a los ácidos transforma un grupo amino primario o secundario en su correspondiente carbamato e incluye carbamatos de t-butilo, alilo y bencilo.

20 Como se señaló anteriormente, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol. Como apreciará por el experto en la materia, las unidades de polietilenglicol pueden encapsularse terminalmente con una amplia diversidad de porciones orgánicas, típicamente las que son relativamente no reactivas. Se prefieren los grupos alquilo y alquilo sustituido, que incluyen, por ejemplo, -C₁₋₁₀ alquilo, -C₂₋₁₀ alquil-CO₂H, -C₂₋₁₀ alquil-OH, -C₂₋₁₀ alquil-NH₂, C₂₋₁₀ alquil-NH(C₁₋₃ alquilo), o C₂₋₁₀ alquil-N(C₁₋₃ alquilo)₂.

En general, hay de 1 a 16 enlazadores de fármacos unidos a cada anticuerpo.

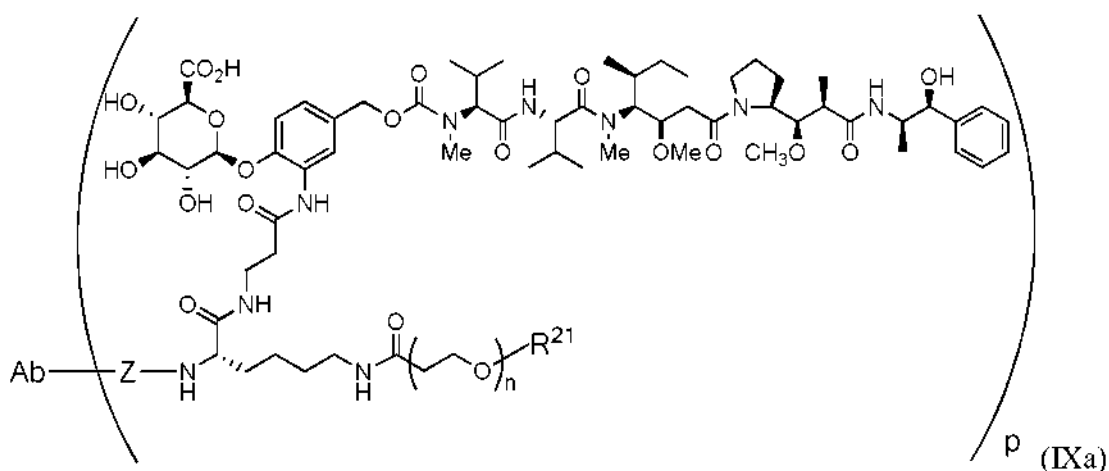
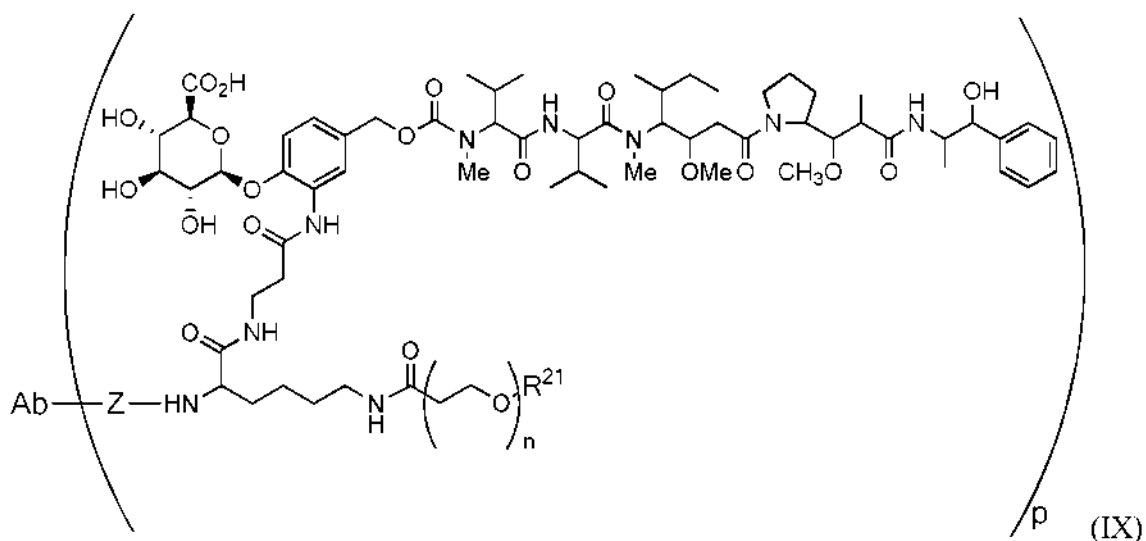
Carga de fármacos - "p"

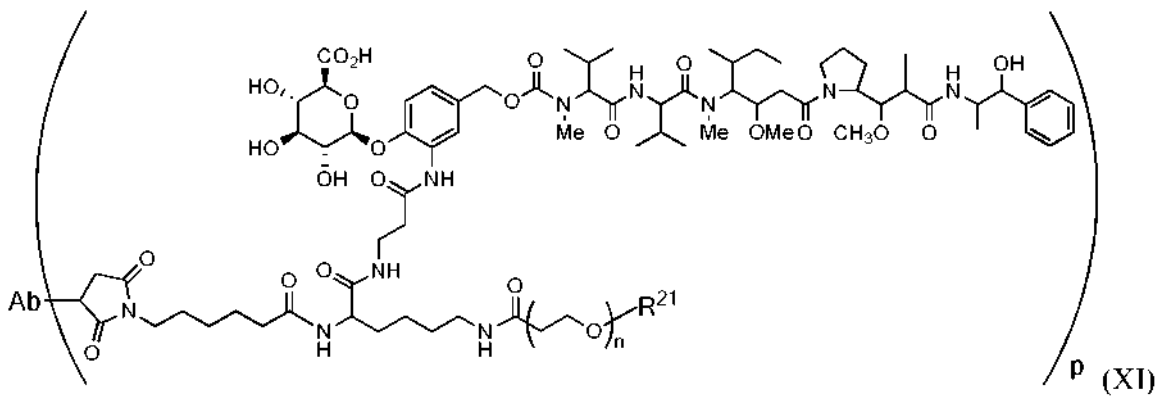
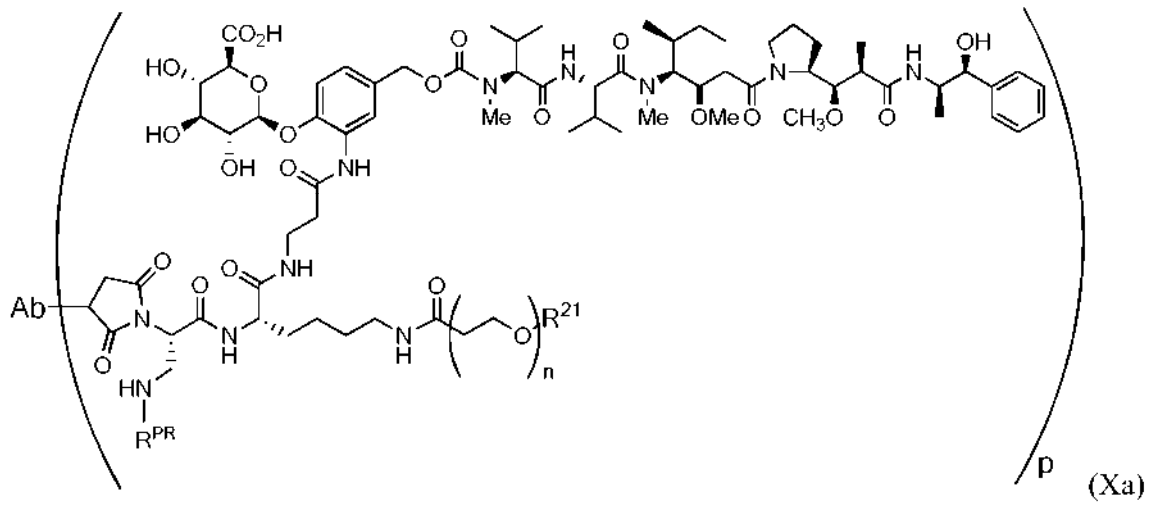
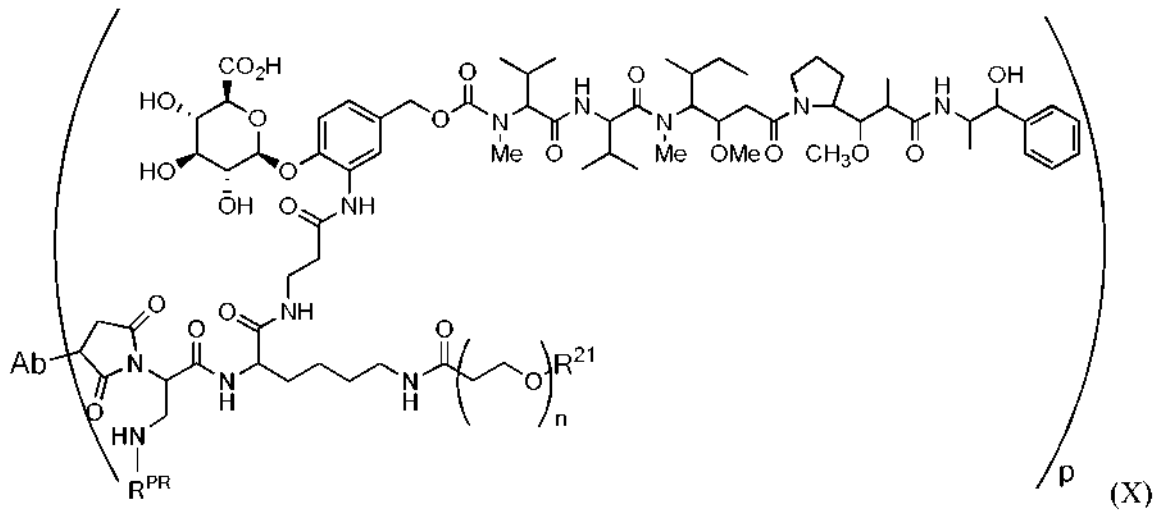
30 Con respecto a los conjugados de anticuerpo-fármaco dirigidos a CD48, el subíndice p representa la carga de fármaco y, según el contexto, puede representar el número de moléculas de moléculas de enlazadores de fármaco unidas a una molécula de anticuerpo individual y, como tal, es un valor entero, o puede representar una carga de fármaco promedio y, como tal, puede ser un valor entero o no entero, pero típicamente es un valor no entero. Una carga de fármaco promedio representa el número promedio de moléculas de enlazadores de fármaco por anticuerpo en una población. Frecuentemente, pero no siempre, cuando nos referimos a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, nos referimos a una población de moléculas de anticuerpos. En una composición que comprende una población de moléculas de conjugado anticuerpo-fármaco, la carga promedio de fármaco es un atributo de calidad importante, ya que determina la cantidad de fármaco que puede administrarse a una célula objetivo. El porcentaje de moléculas de anticuerpo no conjugadas en la composición se incluye en el valor promedio de la carga de fármaco.

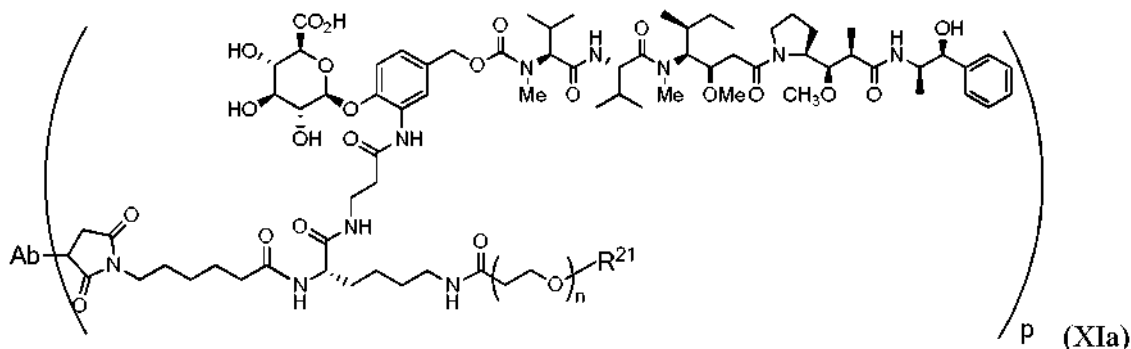
En aspectos preferidos de la presente invención, la carga promedio de fármaco cuando se refiere a una composición que comprende una población de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco es de 1 a aproximadamente 16, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 14, con mayor preferencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. Para los conjugados de fármacos con anticuerpos PBD, tales como los ejemplificados en la presente, una carga de fármaco promedio particularmente preferida es aproximadamente 2. En algunos aspectos, la carga real de fármaco para las moléculas de anticuerpos individuales en la población de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco es de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2 con una carga de fármaco predominante de 2. En aspectos preferidos, la carga promedio de fármaco de 2 se logra mediante técnicas de conjugación sitio específicas (por ejemplo, cisteínas modificadas por ingeniería genética introducidas en el anticuerpo, incluida la posición 239, de acuerdo con el sistema de numeración del índice de UE).

Para los ADC PEGilados con MMAE, como los ejemplificados en la presente, una carga de fármaco promedio particularmente preferida es aproximadamente 8. En modalidades ilustrativas, los enlazadores de fármacos se conjugan con los residuos de cisteína de los disulfuros intercadena reducidos. En algunos aspectos, la carga real de fármaco para las moléculas de anticuerpos individuales en la población de compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco es de 1 a 10 (o de 6 a 10 o de 6 a 8) con una carga de fármaco predominante de 8. Puede lograrse una mayor carga de fármaco, por ejemplo, si, además de los disulfuros entre cadenas, el enlazador de fármacos se conjuga con los residuos de cisteína introducidos (como un residuo de cisteína introducido en la posición 239, de acuerdo con el índice de UE).

Los ADC ilustrativos incluyen lo siguiente:





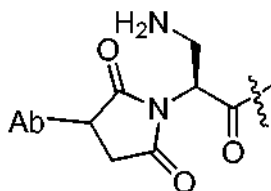


una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en donde n se encuentra en el intervalo de 8 a 36 y con preferencia superlativa se encuentra en el intervalo de 8 a 14 (con preferencia superlativa 12), R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, por ejemplo, un grupo protector lábil a ácido, por ejemplo, BOC, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol, preferentemente -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H, Ab representa un anticuerpo anti-CD48 y p representa un número entero que se encuentra en el intervalo de 1 a 16, preferentemente de 1 a 14, 6 a 12, 6 a 10 u 8 a 10 cuando se refiere a moléculas de anticuerpos individuales o a una carga de fármaco promedio de aproximadamente 4 o aproximadamente 6 a aproximadamente 14, preferentemente aproximadamente 8 cuando se refiere a una población de moléculas de anticuerpos.

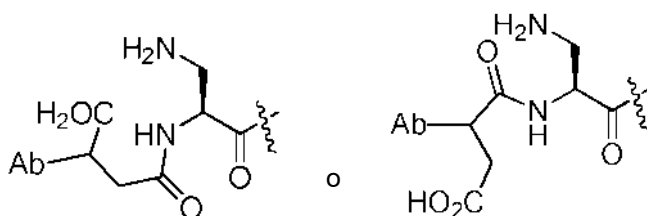
Como se señaló anteriormente, la porción de PEG (polietilenglicol) del enlazador de fármacos puede encontrarse en el intervalo de 8 a 36, sin embargo, se ha encontrado que un PEG de 12 unidades de óxido de etileno es particularmente preferido. Se ha descubierto que las cadenas de PEG más largas pueden dar como resultado un aclaramiento más lento, mientras que las cadenas de PEG más cortas pueden provocar una disminución de la actividad. Por consiguiente, el subíndice n en todas las modalidades anteriores es preferentemente de 8 a 14, de 8 a 12, de 10 a 12 o de 10 a 14 y con preferencia superlativa es 12.

Pueden usarse los PEG polidispersos, PEG monodispersos y PEG discretos para preparar los conjugados de fármacos de anticuerpos PEGilados de la presente invención. Los PEG polidispersos son una mezcla heterógena de tamaños y pesos moleculares, mientras que los PEG monodispersos se purifican típicamente de mezclas heterogéneas y, por lo tanto, proporcionan una longitud de cadena única y un peso molecular. Las unidades de PEG preferidas son los PEG discretos, compuestos que se sintetizan por etapas y no a través de un proceso de polimerización. Los PEG discretos proporcionan una sola molécula con una longitud de cadena definida y especificada. Al igual que con el subíndice "p", cuando se hace referencia a las poblaciones de conjugados de anticuerpo-fármaco, el valor para el subíndice "n" puede ser un número promedio y puede ser un número entero o no entero.

En modalidades preferidas, la unión covalente del anticuerpo al enlazador del fármaco se logra a través de un grupo funcional sulfhídrido del anticuerpo que interactúa con un grupo funcional maleimida de un enlazador del fármaco para formar una succinimida sustituida con tio. El grupo funcional sulfhídrido puede estar presente en la unidad de ligando en el estado natural del ligando, por ejemplo, en un residuo natural (reside el disulfuro intercatenario), o puede introducirse en el ligando mediante la modificación química o por ingeniería biológica, o una combinación de las dos. Se entenderá que una succinimida sustituida con el anticuerpo puede existir en forma(s) hidrolizada(s). Por ejemplo, en modalidades preferidas, un ADC se compone de una porción succinimida que, cuando se une al anticuerpo, está representado por la estructura de



está compuesto por su correspondiente porción ácido-amida que cuando está unido al anticuerpo está representado por la estructura de:



La línea ondulada indica un enlace con la porción del enlazador de fármaco.

5 Aplicaciones terapéuticas

Los conjugados de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar un trastorno que expresa CD48, tal como el cáncer que expresa CD48. Típicamente, tales cánceres muestran niveles detectables de CD48 medidos a nivel de la proteína (por ejemplo, por inmunoensayo) o de ARN. Algunos de estos cánceres muestran niveles elevados de CD48 en relación con el tejido no canceroso del mismo tipo, preferentemente del mismo paciente. Opcionalmente, se mide un nivel de CD48 en un cáncer antes de realizar el tratamiento.

Los ejemplos de cánceres asociados con la expresión de CD48 incluyen mieloma múltiple y otras neoplasias malignas de células B, incluyendo la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células del manto, macroglobulinemia de Waldenström, células tumorales de pacientes con amiloidosis primaria/sistémica, MGUS, y amiloidosis. Se ha observado que algunas líneas celulares de leucemia mieloide aguda (AML) (por ejemplo, células blásticas leucémicas de pacientes con AML) expresan CD48 y, por lo tanto, los pacientes con cánceres de AML que expresan CD48 pueden tratarse con el uso de los ADC CD48 descritos.

Los métodos de la presente descripción incluyen el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer que expresa CD48 que comprende administrar al paciente un conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención. El cáncer puede ser cualquier cáncer que exprese CD48, incluyendo, por ejemplo, el mieloma múltiple.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 se administran en un régimen efectivo que significa una dosificación, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el inicio, reduce la gravedad, inhibe un mayor deterioro y/o mejora al menos un signo o síntoma del cáncer.

Las dosificaciones ilustrativas para los conjugados de MMAE pegilado dirigido a CD48 son generalmente de aproximadamente 1,0 µg/kg a 10,0 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a 5,0 mg/kg o de aproximadamente 0,5 mg/kg a 1,0, 2,0 o 4,0 µg/kg, aunque se contemplan dosificaciones alternativas. Un intervalo de dosis preferido es de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg.

La administración puede ser por una variedad de rutas de administración. En ciertas modalidades, los conjugados se administran parenteralmente, tales como por la vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración de un ADC para el tratamiento del cáncer, el suministro puede realizarse en la circulación sistémica mediante la administración intravenosa o subcutánea. En una modalidad particular, la administración se suministra por la vía intravenosa. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período tal como 30-90 minutos o por una única inyección en bolo. En algunos aspectos, la administración se realizará a través de un impulso IV lento (es decir, más de 30-60 segundos) en un catéter central insertado periféricamente.

La frecuencia de administración depende de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, y otros medicamentos administrados. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a los cambios en la afección del paciente o la progresión del cáncer que se está tratando. Una frecuencia ilustrativa para la administración intravenosa es entre dos veces por semana y trimestralmente durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Otras frecuencias ilustrativas para la administración intravenosa son cada tres semanas o entre una vez a la semana o una vez al mes durante un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Otra frecuencia ilustrativa es la administración cada seis semanas. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ilustrativa es diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferentemente estériles y esencialmente isotónicas y se fabrican en condiciones de GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con el uso de uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la ruta de administración elegida. Para la inyección, los conjugados pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o la solución salina fisiológica o el tampón de acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. La concentración de conjugado en una formulación líquida puede variar ampliamente. En algunos aspectos, el ADC está presente en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

- El tratamiento con conjugados de la invención puede combinarse con quimioterapia, radiación, tratamiento con células madre, cirugía y otros tratamientos efectivos contra el trastorno que se está tratando, incluyendo el estándar de cuidados para el trastorno particular que se está tratando. Por consiguiente, la presente descripción abarca los métodos para tratar la enfermedad y los trastornos descritos en la presente descripción como una monoterapia o en combinación con, por ejemplo, un estándar de cuidados o fármacos en investigación para el tratamiento de tales enfermedades y/o trastornos. Los métodos para el tratamiento del cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención en combinación con un agente anticancerígeno u otro agente adicional para tratar el cáncer.
- Un agente ilustrativo para la terapia combinada es el carfilzomib (por ejemplo, KYPROLIS®), un inhibidor del proteosoma utilizado para tratar el mieloma múltiple (*ver* Siegel DS y otros, A phase 2 study of single-agent el carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2012; 120:2817-2825). El carfilzomib puede administrarse como una infusión intravenosa/IV. En una modalidad, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.
- El carfilzomib también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. El carfilzomib se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el carfilzomib se ha combinado con la lenalidomida y la dexametasona (*ver* Stewart KA y otros, Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015; 372:142-152). En una modalidad, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.
- El carfilzomib también se ha combinado con la dexametasona (*ver* Dimopoulos MD y otros, Carfilzomib and dexamethasone versus el bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncology* 2016; 17:27-38). En una modalidad, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.
- El carfilzomib también se ha combinado con el panobinostat (*ver* Berdeja JG y otros, Phase I/II study of the combination of panobinostat and el carfilzomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2015; 100:670-676). En una modalidad, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención. El carfilzomib también se ha combinado con pomalidomida y la dexametasona (*ver* Shah J y otros, Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2015; 126:2284-2290). En una modalidad, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la pomalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la pomalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el carfilzomib se administra en una terapia combinada con la pomalidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.
- Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el daratumumab (por ejemplo, DARZALEX™), un anticuerpo monoclonal humano que se une a CD38 (una glucoproteína altamente expresada en células de mieloma múltiple). Daratumumab puede administrarse a pacientes mediante infusión intravenosa para tratar el mieloma múltiple (*ver* Lokhorst HM y otros, Targeting CD38 with el daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:1207-1219). En una modalidad, el daratumumab se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.
- El daratumumab también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. Daratumumab se ha combinado con varios agentes

5 adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el daratumumab se ha combinado con el bortezomib y la lenalidomida (*ver Phipps C y otros, Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. Ther Adv Hematol 2015; 6:120-127*). En una modalidad, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la lenalidomida y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la lenalidomida y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la lenalidomida y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

10 El daratumumab también se ha combinado con el bortezomib y la dexametasona (*ver Phipps C y otros*). En una modalidad, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el daratumumab se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

20 Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el elotuzumab (por ejemplo, EMLICITI™), un anticuerpo monoclonal que se une a CD319, o a la molécula de señalización de la activación linfocítica F7 (SLAMF7), un marcador de células malignas de mieloma múltiple. El elotuzumab puede administrarse a pacientes mediante infusión intravenosa para tratar el mieloma múltiple (*ver Zonder JA y otros, A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. Blood 2012; 120:552-559*). En una modalidad, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

30 El elotuzumab también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. El elotuzumab se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el elotuzumab se ha combinado con la lenalidomida y la dexametasona (*ver Lonial S y otros, Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med 2015; 373:621-631*;). En una modalidad, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el elotuzumab se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

40 Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es la lenalidomida (por ejemplo, REVLIMID®), un agente inmunomodulador administrado a pacientes para tratar el mieloma múltiple (*ver Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. Blood 2006; 108:3458-3464*). La lenalidomida puede empaquetarse como una cápsula, píldora o tableta para administración oral. En una modalidad, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

50 La lenalidomida también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. La lenalidomida se ha combinado con varios agentes adicionales que tratan el mieloma múltiple. Por ejemplo, la lenalidomida se ha combinado con el bortezomib y la dexametasona (*ver Richardson PG y otros, Lenalidomide, el bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Blood 2010; 116:679-686*). En una modalidad, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

60 La lenalidomida también se ha combinado con el carfilzomib y la dexametasona (*ver Stewart KA y otros*). En una modalidad, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia

combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

5 La lenalidomida también se ha combinado con el daratumumab y el bortezomib (ver Phipps C y otros). En una modalidad, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el daratumumab, el bortezomib y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el daratumumab, el bortezomib y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el daratumumab, el bortezomib y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

15 La lenalidomida también se ha combinado con elotuzumab y la dexametasona (ver Lonial S y otros, Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med 2015; 373:621-631). En una modalidad, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el elotuzumab, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el elotuzumab, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la lenalidomida se administra en una terapia combinada con el elotuzumab, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

20 Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el bortezomib (por ejemplo, VELCADE®), un inhibidor del proteosoma que se administra a los pacientes para tratar el mieloma múltiple y el linfoma de células del manto (ver Richardson PG y otros, A phase 2 study of el bortezomib in relapsed, refractory myeloma. N Engl J Med 2003; 348:2609-2617). El bortezomib puede administrarse a pacientes mediante inyección intravenosa. En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

30 El bortezomib también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. El bortezomib se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el bortezomib se ha combinado con la talidomida y la dexametasona (ver Kapoor P y otros, Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. Semin Hematol 2012; 3:228-242). En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con talidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con talidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con talidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

40 El bortezomib también se ha combinado con la dexametasona, la talidomida, el cisplatino, la doxorubicina, la ciclofosfamida y el etopósido (ver Kapoor P y otros). En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona, la talidomida, el cisplatino, la doxorubicina, la ciclofosfamida, el etopósido y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona, la talidomida, el cisplatino, la doxorubicina, la ciclofosfamida, el etopósido y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la dexametasona, la talidomida, el cisplatino, la doxorubicina, la ciclofosfamida, el etopósido y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

50 Bortezomib también se ha combinado con el daratumumab y la lenalidomida (ver Phipps C y otros). En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el daratumumab, la lenalidomida y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el daratumumab, la lenalidomida y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el daratumumab, la lenalidomida y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

60 Bortezomib también se ha combinado con la lenalidomida y la dexametasona (ver Richardson PG y otros, 2010). En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

El bortezomib también se ha combinado con el panobinostat y la dexametasona (*ver* Richardson P y otros, PANORAMA 2: panobinostat in combination with el bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and el bortezomib-refractory myeloma. Blood 2013; 122:2331-2337). En una modalidad, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el bortezomib se administra en una terapia combinada con el panobinostat, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es la dexametasona (por ejemplo, DECADRON®), un glucocorticosteroide utilizado para tratar el cáncer (incluyendo el mieloma múltiple, la leucemia y el linfoma), la inflamación, las alergias y náuseas. La dexametasona puede administrarse en forma de tableta, píldora o cápsula para administración oral o por infusión intravenosa. En una modalidad, la dexametasona se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la dexametasona se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la dexametasona se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención. La dexametasona también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es la ciclofosfamida (por ejemplo, CYTOXAN®), un agente alquilante utilizado para tratar el cáncer (incluyendo el mieloma múltiple, la leucemia mielocítica aguda, el linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón, entre otros). La ciclofosfamida puede administrarse mediante inyección, infusión, como una tableta, píldora o cápsula para administración oral, o mediante la inyección en un músculo, en el revestimiento abdominal o en el revestimiento pulmonar. En una modalidad, la ciclofosfamida se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la ciclofosfamida se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la ciclofosfamida se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención. La ciclofosfamida también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el melfalán, un agente alquilante utilizado para tratar el cáncer (incluyendo el mieloma múltiple y el cáncer de ovario). El melfalán puede administrarse por vía oral, como inyección o infusión. En una modalidad, el melfalán se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el melfalán se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el melfalán se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

El melfalán también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es la pomalidomida (por ejemplo, POMALYST®), un agente inmunomodulador utilizado para tratar el mieloma múltiple. La pomalidomida puede administrarse como una cápsula, píldora o tableta para administración oral. En una modalidad, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

La pomalidomida también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. La pomalidomida se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. La pomalidomida se ha combinado con la dexametasona (*ver* Richardson P y otros, Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. Blood 2014; 123:1826-1832). En una modalidad, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

La pomalidomida también se ha combinado con el carfilzomib y la dexametasona (*ver* Shah J y otros, Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126:2284-2290). En una modalidad, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad

adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, la pomalidomida se administra en una terapia combinada con el carfilzomib, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el panobinostat (por ejemplo, FARYDAK®), un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) que se usa para tratar el cáncer (incluyendo el mieloma múltiple) (ver Wolf JL y otros, A phase II study of oral panobinostat (LBH589) in adult patients with advanced refractory multiple myeloma. ASH Annual Meeting Abstracts, 2008). El panobinostat puede administrarse en forma de píldora, cápsula o tableta para administración oral. En una modalidad, el panobinostat se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

El panobinostat también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. El panobinostat se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el panobinostat se ha combinado con el carfilzomib (ver Berdeja JG y otros). En una modalidad, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el carfilzomib y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el carfilzomib y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el carfilzomib y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención. El panobinostat también se ha combinado con el bortezomib y la dexametasona (ver Richardson P y otros, 2013). En una modalidad, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el panobinostat se administra en una terapia combinada con el bortezomib, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

Otro agente ilustrativo para la terapia combinada es el ixazomib (NINLARO®), un inhibidor del proteosoma utilizado para tratar el cáncer (incluyendo el mieloma múltiple). El ixazomib puede administrarse por vía oral. En una modalidad, el ixazomib se administra en una terapia combinada con un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el ixazomib se administra en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el ixazomib se administra en una terapia combinada con un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención. El ixazomib también puede administrarse en una terapia combinada con un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención y un agente adicional. El ixazomib se ha combinado con varios agentes adicionales para tratar el mieloma múltiple. Por ejemplo, el ixazomib se ha combinado con la lenalidomida y la dexametasona (ver Moreau P y otros, Ixazomib, an investigational oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone, significantly extends progression-free survival for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: the phase 3 taurmaline-MM1 study. ASH Annual Meeting Abstracts, 2015). En una modalidad, el ixazomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco dirigido a CD48 de la presente invención. En una modalidad adicional, el ixazomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un conjugado de anticuerpo-fármaco hMEM102 de la presente invención. En una modalidad adicional, el ixazomib se administra en una terapia combinada con la lenalidomida, la dexametasona y un hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE de carga 8 de la presente invención.

Cualquier característica, etapa, elemento, modalidad o aspecto de la invención puede usarse en combinación con cualquier otra, a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera. Aunque la presente invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, será evidente que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Selección de anticuerpos y humanización

El anticuerpo murino MEM102 se une a la proteína CD48 humana y se describió por primera vez en Bazil y otros, Folia Biologica 35:289-297 (1989). Los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo murino MEM102 se secuenciaron y se identificaron las secuencias codificadas de CDR de cadena pesada y ligera, es decir, SEC ID NO:3-8. Se construyeron varios anticuerpos humanizados MEM102 utilizando la línea germinal humana de la región variable de cadena pesada hlgG VH7-4-1/hlgG-JH5 y la línea germinal humana de la región variable de cadena ligera hlgG-VK6-21/hlgG-JK4 como secuencias aceptoras humanas. Los anticuerpos diferían en la selección de los residuos de aminoácidos para

volver a mutar al anticuerpo del ratón o la secuencia de la línea germinal del ratón. El anticuerpo designado HALA (la cadena pesada como se establece en SEQ ID NO:1 (vHA) y la cadena ligera como se establece en SEQ ID NO:2 (vLA) se seleccionó como el anticuerpo MEM102 humanizado principal en base a sus (i) características de unión, (ii) capacidad para administrar el fármaco y (iii) número de mutaciones posteriores en comparación con las otras variantes. El anticuerpo MEM102 humanizado también se conoce como hMEM102.

Los anticuerpos designados HCLA (anticuerpo que tiene la región variable de la cadena pesada designada vHC y la región variable de la cadena ligera designada vLA), HALB (anticuerpo que tiene la región variable de la cadena pesada designada vHA y la región variable de la cadena ligera designada vLB), HBLA (anticuerpo que tiene la región variable de la cadena pesada designada vHB y la región variable de la cadena ligera designada vLA), HBLB (anticuerpo que tiene la región variable de la cadena pesada designada vHB y la región variable de la cadena ligera designada vLB), HCLB (anticuerpo que tiene la región variable de la cadena pesada designada vHC y la región variable de cadena ligera designada vLB) pueden usarse en la presente invención en lugar del anticuerpo HALA. Ver las Figuras 1 y 2 para las secuencias vHA, vHB, vHC, vLA, vLB y vLC. Las afinidades de unión para las diversas formas humanizadas de MEM102 son similares si se prueban contra células que sobreexpresan el CD48 humano o de cinomolgo.

Ejemplo 2: Características de unión de hMEM102

Métodos: Para determinar la unión de saturación de los anticuerpos anti-CD48, se tiñeron las células clonales CHO-DG44 transfectadas establemente con CD48 de células de tumor de mieloma múltiple U-266 humano o de mono cinomolgo con anticuerpo conjugado Alexa Fluor-647 titulado (0,8ng/ml - 50µg/mL) cargado con aproximadamente 2-4 fluoróforos por anticuerpo. Después de una hora de incubación en hielo, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía suero bovino fetal al 2% y azida de sodio al 0,02%. Se detectó fluorescencia en un citómetro de flujo LSRII y se determinaron los valores de Kd con el uso de la regresión no lineal de un sitio unión (hipérbola) en GraphPad Prism.

Resultados: La Tabla 1 y las Figuras 3 y 4 muestran que el anticuerpo hMEM102-HALA tiene una afinidad de unión similar en comparación con cMEM102 en las células U-266, como lo indican los bajos valores de Kd. La afinidad de unión de hMEM102-HALA y cMEM102 a CD48 de mono cinomolgo en células clonales CHO-DG44 transfectadas de forma estable también fue comparable. Tanto hMEM102-HALA como cMEM102 tienen más de 4 veces menor la Kd en comparación con mMEM102 en ambas líneas celulares. Los anticuerpos anti-CD48 tuvieron una afinidad de unión aproximadamente 6 veces más fuerte con el CD48 humano en comparación con el CD48 del mono cinomolgo.

Tabla 1

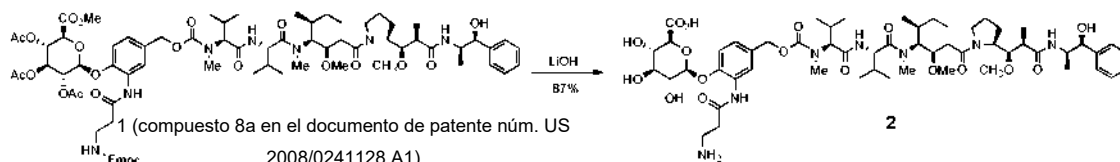
Anticuerpo	Lote#	Kd (nM)	
		U-266	CD48 de mono cinomolgo-CHO-DG44
hMEM102-HALA	9915029F	5,0	31,1
cMEM102	7713039A	5,8	40,5
mMEM102	275036T	20,8	164,7

Ejemplo 3: Síntesis de MDpr-PEG(12)-glyc-MMAE y conjugación con el hMEM102

Información general. Todos los solventes anhidros comercialmente disponibles se usaron sin purificación adicional. Los reactivos de PEG se obtuvieron de Quanta BioDesign (Powell, OH). La cromatografía analítica en capa fina se realizó sobre láminas de aluminio de gel de sílice 60 F254 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). La cromatografía radial se realizó en un aparato de Chromatotron (Harris Research, Palo Alto, CA). La cromatografía en columna se realizó en un sistema de purificación rápido de Biotage Isolera One (Charlotte, NC). La HPLC analítica se realizó en un sistema de suministro de disolvente Varian ProStar 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Las muestras se eluyeron sobre una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80 A. La fase móvil ácida consistió en acetonitrilo y agua que contenían ácido trifluoroacético al 0,05% o ácido fórmico al 0,1% (indicado para cada compuesto). Los compuestos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo ácido desde el 5% a 1 min después de la inyección, hasta el 95% a los 11 min, seguido de acetonitrilo isocrático al 95% a los 15 min (velocidad de flujo = 1,0 ml/min). La LC-MS se realizó en dos sistemas diferentes. El sistema LC-MS 1 consistió en un espectrómetro de masas ZMD Micromass conectado a un instrumento HP Agilent 1100 HPLC equipado con una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80 A. El eluyente ácido consistió en un gradiente lineal de acetonitrilo del 5% al 95% en ácido fórmico acuoso al 0,1% durante 10 minutos, seguido de acetonitrilo isocrático al 95% durante 5 minutos (velocidad de flujo = 0,4 ml/min). El sistema LC-MS 2 consistió en un espectrómetro de masas Waters Xevo G2 T conectado a un módulo de separaciones Waters 2695 con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996; la columna, las fases móviles, el gradiente y la velocidad de flujo fueron los mismos que para el sistema LC-MS 1. UPLC-MS se llevó a cabo en un detector de masas Waters SQ conectado a un Acquity Ultra Performance LC equipado con una columna de fase inversa Acquity UPLC BEH C18 2,1 x 50 mm, 1,7 µm. La fase móvil ácida (ácido fórmico al 0,1%) consistió en un gradiente de acetonitrilo al 3%/agua al 97% hasta acetonitrilo al 100% (velocidad de flujo = 0,5 ml/min). La HPLC preparativa se realizó en un sistema de suministro de disolvente Varian ProStar 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Los productos se purificaron sobre una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi 10,0 x 250 mm, 4 µm, 80 A eluyendo con ácido fórmico al 0,1%

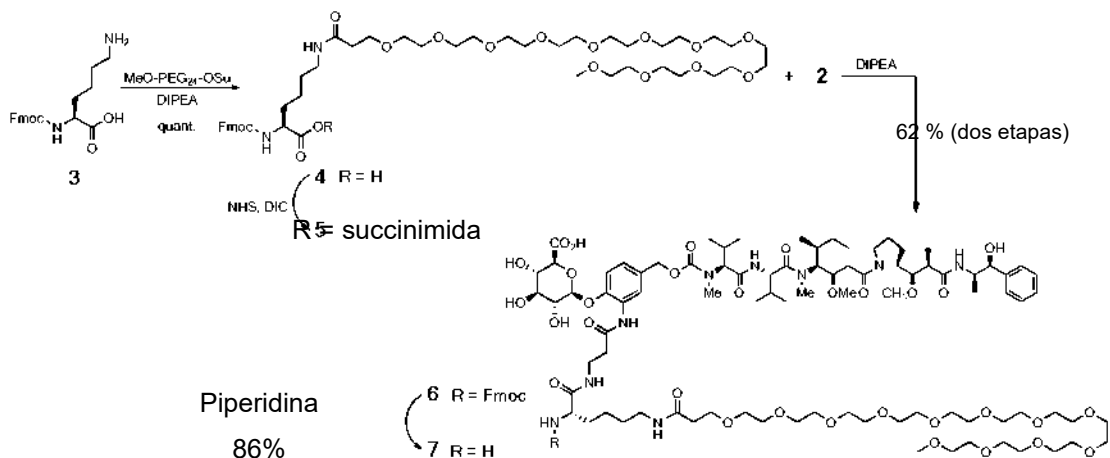
en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B). El método de purificación consistió en el siguiente gradiente de disolvente A al disolvente B: 90:10 de 0 a 5 min; 90:10 a 10:90 de 5 min a 80 min; seguido de isocrático 10:90 durante 5 min. La velocidad de flujo fue de 4,6 ml/min con monitorización a 254 nm. La HPLC preparativa para los compuestos en los Esquemas 3 y 4 se realizó con ácido trifluoroacético al 0,1% en ambas fases móviles, en lugar de ácido fórmico al 0,1%.

Esquema 1.



Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-aminopropanamido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxa-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-tri-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (2): En un frasco que contiene el intermedio 2 de glucurónido-MMAE conocido (compuesto 8a en el documento de patente núm. US 2008/0241128 A1) (40 mg, 26,8 μ mol) se añadió 0,9 ml de metanol y 0,9 ml de tetrahidrofurano. La solución se enfrió luego en un baño de hielo y se añadió gota a gota hidróxido de litio monohidrato (6,8 mg, 161 μ mol) como solución en 0,9 ml de agua. La reacción se agitó luego en hielo durante 1,5 h, momento en el que el LC/MS reveló la conversión completa en producto. Luego se añadió el ácido acético glacial (9,2 μ L, 161 μ mol) y la reacción se concentró a sequedad. La HPLC preparativa proporcionó el intermedio 3 enlazador glucurónido-MMAE completamente desprotegido (26 mg, 87%) como un residuo oleoso. La HPLC analítica (0,1% de ácido fórmico): t_R 9,3 min. Sistema de LC-MS 1: t_R 11,10 min, m/z (ES⁺) encontrado 1.130,48 (M+H)⁺, m/z (ES⁻) encontró 1.128,63 (M-H)⁻.

Esquema 2.



Ácido (S)-44-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azapentatetracontan-45-oico (4): En un frasco que contiene N_α -Fmoc-lisina 3 (59 mg, 161 μ mol) se añadieron 2,9 ml de diclorometano anhidro, seguido de metoxi-PEG12-OSu (100 mg, 146 μ mol). Luego se añadió DIPEA (127 μ L, 730 μ mol) y la reacción se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente y luego mediante TLC y LC/MS. Después de 2 h, LC/MS reveló la conversión al producto. La solución de reacción se diluyó en diclorometano y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice. La fase estacionaria se eluyó con diclorometano con cantidades crecientes de metanol (0% a 20%) para proporcionar el producto deseado 4 (153 mg, 112%). UPLC-MS: t_R 1,77 min, m/z (ES⁺) encontrado 939,58 (M+H)⁺.

(S)-2,5-dioxopirrolidin-1-il 44-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azapentatetracontan-45-oato (5): Se cargó un frasco con N_α -Fmoc-lisina(PEG12)-OH 4 (153 mg, 163 μ mol) y 1,6 ml de tetrahidrofurano anhidro. Se añadió N-hidroxisuccinimida (28 mg, 245 μ mol), seguido de diisopropilcarbodiimida (38 μ L, 245 μ mol). La reacción se selló bajo nitrógeno y se agitó durante la noche. La reacción cruda se diluyó en diclorometano y se purificó sobre gel de sílice eluido con diclorometano con cantidades crecientes de metanol (0% a 10%) para proporcionar el éster 5 activado deseado (155 mg). El material se llevó adelante sin caracterización adicional. UPLC-MS: t_R 1,92 min, m/z (ES⁺) encontrado 1036,48 (M+H)⁺.

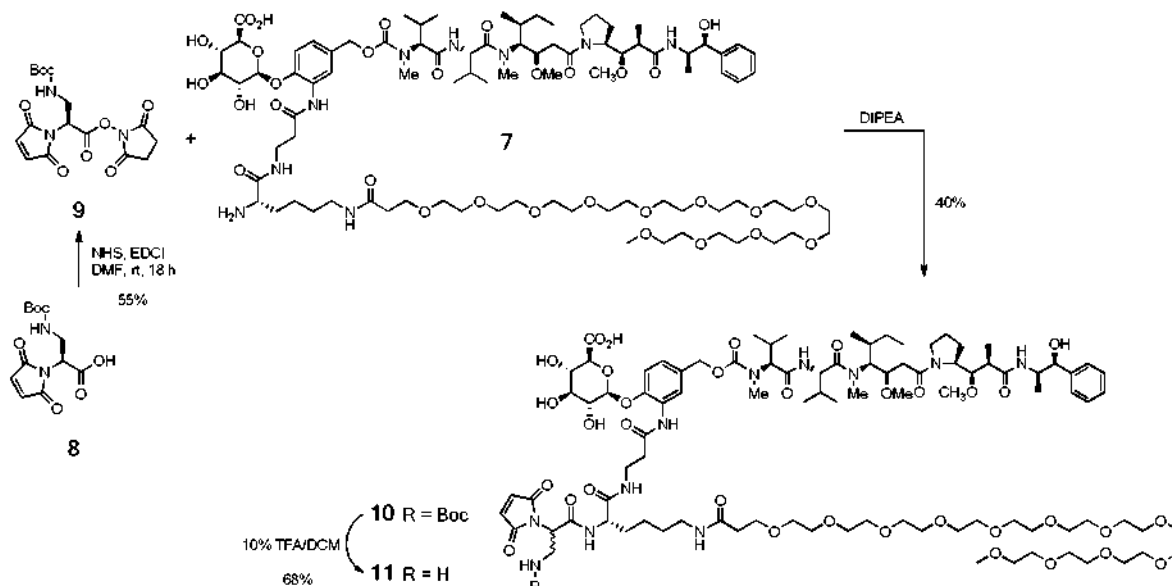
Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46-diazanonatetracontanamido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-

butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (6): El intermedio 2 enlazador glucurónido-MMAE desprotegido (92 mg, 81 μmol) se disolvió en dimetilformamida anhidra (1,6 ml) y se agregó a un frasco que contiene N_{α} -Fmoc-lisina(PEG12)-OSu 5 (101 mg, 97 μmol). Luego se añadió diisopropiletilamina (70 μL , 405 μmol), la reacción se agitó entonces bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Después de 4,5 h, LC-MS reveló la conversión al producto. El producto se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el intermedio 6 Fmoc-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (111 mg, 62% en dos etapas) como un residuo oleoso. UPLC-MS: t_R 2,01 min, m/z (ES^+) encontrado 2.050,92 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-amino-38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46-diazanonatetracontanamido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (7): El intermedio 6 Fmoc-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (111 mg, 54 μmol) se disolvió en 2,2 ml de dimetilformamida anhidra, seguido de la adición de 0,5 ml de piperidina. La reacción se agitó bajo nitrógeno durante 3 horas y luego se concentró hasta sequedad. El producto se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el intermedio 7 H-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (85 mg, 86%) como un residuo aceitoso. UPLC-MS: t_R 1,50 min, m/z (ES^+) encontrado 1.829,31 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(S)-2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1 H-pirrol-1-il)propanoato (9): El ácido (S)- N_{α} -maleimido- N_{β} -Boc-diaminopropanoico 8 (Nature Biotechnology, 2014, 32, 1059-1062) (400 mg, 1,4 mmol) se disolvió en 7 mL de dimetilformamida anhidra. Se añadió N-hidroxisuccinimida (178 mg, 1,5 mmol), seguido de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (298 mg, 1,5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 3 horas. El tratamiento acuoso se logró mediante dilución en 120 mL de agua; la capa acuosa se extrajo luego tres veces con 60 mL de acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró hasta sequedad. El producto se purificó por cromatografía rápida en columna, eluyendo mezclas de hexanos: acetato de etilo (50:50 a 0:100) para proporcionar el éster NHS del ácido (S)- N_{α} -maleimido- N_{β} -Boc-diaminopropanoico [MDpr(Boc)-OSu] 9 (297 mg, 55%). Sistema de LC-MS 1: t_R 12,23 min, m/z (ES^+) encontrado 282,0599 (grupo $\text{M}+\text{H}-\text{Boc}$)⁺. Sistema de LC-MS 2: t_R 11,30 min, m/z (ES^+) encontrado 2.580,2515 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Esquema 3.



Ácido (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46-diazanonatetracontanamido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (10): MDpr(Boc)-OSu 9 (20 mg, 53 μmol) se disolvió en 2,2 ml de dimetilformamida anhidra y se añadió a un frasco que contenía el intermedio 7 enlazador H-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (86 mg, 44 μmol). Luego se añadió diisopropiletilamina (15 μL , 88 μmol), la reacción se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 2,5 h. La reacción se inactivó con 15 μL de ácido acético glacial y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el intermedio 10 MDp(Boc)-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (37 mg, 40%), como una mezcla de diastereómeros. Los diastereómeros se separaron por cromatografía quiral. UPLC-MS: t_R 1,84 min, m/z (ES^+) encontrado 2.095,44 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Ácido (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-yl)propanamido)-38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46-diazanonatetracontanamido)-4-(((S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxo-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-pirran-2-carboxílico (11): Un frasco que contenía el intermedio 10 MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (34 mg, 16 umol) se enfrió a 0 °C en un baño de hielo bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución de ácido trifluoroacético al 10% en diclorometano (0,8 ml). La reacción se agitó entonces a 0 °C durante 2 h, momento en el cual la LC-MS reveló la desprotección completa de Boc. La reacción se concentró luego a un residuo crudo y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el enlazador 11 MDpr-Lys(PEG12)-glucurónido-MMAE (22 mg, 68%). UPLC-MS: t_R 1,50 min, m/z (ES⁺) encontrado 1.995,18 (M+H)⁺.

El compuesto 11 se conjugó a través de sus tioles intercatenarios con el anticuerpo anti-CD48 a una carga de fármaco promedio de 8 fármacos por anticuerpo utilizando los métodos conocidos en la materia (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 7.659.241).

Ejemplo 4: Citotoxicidad de los ADC hMEM-102 en líneas celulares de cáncer de mieloma múltiple.

Métodos: Las líneas celulares de mieloma múltiple humano EJM (DSMZ; IMDM +FBS al 20%), L363 (DSMZ; RPMI 1640 +FBS al 15%), MM.1R (ATCC; RPMI 1640 +FBS al 10%), NCI-H929 (ATCC; RPMI 1640 +FBS al 10%), U-266 (ATCC; RPMI 1640 +FBS al 15%), y LP-1 (DSMZ; IMDM +FBS al 20%) se cultivaron a 37°C, CO₂ al 5%. Los conjugados de fármaco anticuerpo auristatina anti-CD48 se diluyeron en serie 3 veces en medio para producir curvas de dosis de 10 puntos (1.000 ng/mL – 0,05081 ng/mL) y se aplicaron a células de mieloma múltiple cultivadas en placas de ensayo de 96 pocillos (10 000 a 15 000 células por pocillo en 200 µL de medio). Las células se incubaron con ADC durante 96 horas en total a 37°C, CO₂ al 5%. La viabilidad celular se analizó utilizando el ensayo de citotoxicidad luminiscente Cell Titer Glo (Promega), y los datos se recopilaron utilizando un lector de placas EnVision (PerkinElmer). Todos los ensayos de citotoxicidad se realizaron con puntos de datos por cuadruplicado y se informan los valores promedios de CI50 de 2-3 experimentos independientes.

La muerte celular apoptótica se midió con el uso del ensayo Caspasa-Glo 3/7 (Promega), utilizando condiciones de ensayo idénticas a las descritas anteriormente.

Resultados: Los resultados se muestran en la Tabla 2. El anticuerpo hMEM102 se conjugó con vcMMAE(4 cargas), mcMMAF(4 cargas), y MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE, como una carga de ocho, también denominado hMEM102-5088(8). Se realizaron conjugaciones similares en un anticuerpo de control, un anticuerpo que no se une a CD48. El hMEM102-5088(8) exhibió una actividad citotóxica mejorada en comparación con el mismo anticuerpo conjugado con vcMMAE(4) y mcMMAF(4). Como control negativo, también se incluyó una línea celular que no expresa CD48, LP-1.

Tabla 2

Anticuerpo	Enlazador de fármaco	Carga de fármaco	Líneas celulares de mieloma múltiple (# receptores CD48/célula)					
			EJM (135 000)	L363 (460 000)	MM.1R (336 000)	NCI-H929 (483 000)	U-266 (270 000)	LP-1 (0)
hMEM102	vcMMAE	4	8,7	36	12	13	6,0	>1000
hMEM102	mcMMAF	4	4,0	34	7,0	No probado	3,0	>1000
hMEM102	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	2,0	11	2,0	2,5	1,0	>1000
hMEM102	Auristatina T	8	1,0	15	1,7	1,5	1,0	>1000
hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	mcMMAF	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	Auristatina T	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Se evaluaron dos líneas celulares para la muerte celular apoptótica, NCI-H929 y U-266. Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. En ambas líneas celulares, el conjugado hMEM102-MDpr-PEG (12)-gluc-MMAE (8) indujo la muerte celular apoptótica después de setenta horas de exposición al fármaco. No se observó muerte apoptótica en las células tratadas con un anticuerpo de control conjugado con MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8). En la Figura, el enlazador de fármacos se hace referencia como 5088 y se conjugan ocho enlazadores de fármacos por anticuerpo. En ambas Figuras 5 y 6, el conjugado de hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) está representado por cuadrados rellenos, mientras que el conjugado de anticuerpo de control-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) se representa por cuadrados abiertos.

Ejemplo 5: Estudios in vivo de xenoinjerto de mieloma múltiple

Los ratones hembras NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) se implantaron por vía intravenosa con 2,5 millones de células NCI-H929, por animal para generar un modelo diseminado de mieloma múltiple. Cinco días después del implante de células tumorales, n=8 ratones por grupo de tratamiento recibieron una inyección intraperitoneal única de ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o ADC de control sin unión hlgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o hMEM102-Auristatina T (4830) o control sin unión hlgG-Auristatina T (4830). Los niveles de dosis de ADC examinados fueron 0,33 mg/kg y 1,0 mg/kg. Los ratones con carga tumoral avanzada se sacrificaron al mostrar síntomas de parálisis de las extremidades posteriores, hinchazón craneal y/o morbilidad. Como se muestra en la Figura 7, ambos ADC produjeron respuestas completas duraderas en ratones de 8/8 a todos los niveles de dosis (dosis única), mientras que los ratones dosificados con ADC de control sin unión se sacrificaron debido a la enfermedad en el día 60 del estudio.

Los ratones hembras NSG (NOD scid gamma; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) se implantaron por vía subcutánea con 1 millón de células de mieloma múltiple NCI-H929 por animal. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 100 mm³, n=7 ratones por grupo de tratamiento recibieron una inyección intraperitoneal única de ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o ADC control sin unión hlgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o hMEM102-Auristatina T (4830) o control sin unión hlgG-Auristatina T (4830), o ADC hMEM102-vcMMAE (1006) o control sin unión hlgG-vcMMAE (1006). Los niveles de dosis de ADC examinados fueron 0,33 mg/kg y 1,0 mg/kg. Los ratones individuales se sacrificaron cuando el volumen subcutánea tumor NCI-H929 alcanzó 1000 mm³. Como se muestra en la Figura 8, el ADC hMEM102-MDPR-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) produjo respuestas completas duraderas en todos los ratones en los niveles de 1,0 mg/kg dosis. En el nivel de dosis más bajo de 0,33 mg/kg, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) produjo un retraso tumoral. Los ADC vcMMAE y Auristatina T indujeron retraso tumoral solo a las dosis más altas.

Los ratones hembras NSG (NOD scid gamma; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) se implantaron por vía intravenosa con 1 millón de células MM.1R, por animal para generar un modelo diseminado de mieloma múltiple. Cinco días después del implante de células tumorales, n=7 ratones por grupo de tratamiento recibieron una inyección intraperitoneal única de ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o ADC de control sin unión hlgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o hMEM102-Auristatina T (4830) o control sin unión hlgG-Auristatina T (4830). Los niveles de dosis de ADC examinados fueron 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg. Los ratones con carga tumoral avanzada se sacrificaron al mostrar síntomas de parálisis de las extremidades posteriores, hinchazón craneal y/o morbilidad. Como se muestra en la Figura 9, ambos ADC produjeron respuestas completas duraderas en ratones en todos los niveles de dosis probados (dosis única), mientras que los ratones dosificados con ADC de control sin unión se sacrificaron debido a la enfermedad en el día 60 del estudio.

Los ratones hembras NSG (NOD scid gamma; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) se implantaron por vía subcutánea con 5 millones de células de mieloma múltiple MM.1R por animal. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 100 mm³, n=7 ratones por grupo de tratamiento recibieron una inyección intraperitoneal única de ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o ADC control sin unión hlgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o hMEM102-Auristatina T (4830) o control sin unión hlgG-Auristatina T (4830), o ADC hMEM102-vcMMAE (1006) o control sin unión hlgG-vcMMAE (1006). Los niveles de dosis de ADC examinados fueron 0,33 mg/kg y 1,0 mg/kg. Los ratones individuales se sacrificaron cuando el volumen del tumor MM.1R subcutáneo alcanzó 1000 mm³. Como se muestra en la Figura 10, el ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) produjo la respuesta antitumoral más potente y el retraso tumoral más prolongado.

Los ratones hembras NSG (NOD scid gamma; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) se implantaron por vía intravenosa con 5 millones de células EJM, por animal para generar un modelo diseminado de mieloma múltiple. Cinco días después del implante de células tumorales, n=8 ratones por grupo de tratamiento recibieron una inyección intraperitoneal única de ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o ADC de control sin unión hlgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) o hMEM102-Auristatina T (4830) o control sin unión hlgG-Auristatina T (4830). Los niveles de dosis de ADC examinados fueron 0,33 mg/kg y 1,0 mg/kg. Los ratones con carga tumoral avanzada se sacrificaron al mostrar síntomas de parálisis de las extremidades posteriores, hinchazón craneal y/o morbilidad. Como se muestra en la Figura 11, el ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) produjo la respuesta antitumoral más potente, 6/8 respuestas completas a 0,33 mg/kg y 7/8 respuestas completas a 1,0 mg/kg. Los ratones dosificados con ADC de control sin unión se sacrificaron todos debido a la enfermedad en el día 60 del estudio.

Ejemplo 6: Función efectora

Métodos Para células objetivo WIL2-S, se midió la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de la liberación de cromo-51 con el uso de células asesinas naturales (NK) purificadas combinadas con células objetivo CD48 positivas recubiertas con anticuerpo. Las células tumorales WIL2-S se marcaron con cromo-51 y se incubaron previamente durante 30 minutos con el anticuerpo (0,1 ng/mL - 10 µg/mL). Las células objetivo se combinan luego con las células NK efectoras (relación efector/objetivo de 10:1) y se incubaron 4 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Después, el cromo-51 en el sobrenadante se cuantificó en un lector de placas Perkin Elmer TopCount. La actividad de ADCC se mide como un porcentaje de la lisis máxima en relación con las células objetivo de controles tratados con Tritón X-100 al 1%. La ADCC se analizó para detectar las células T humanas normales en reposo (todas las células) utilizando la misma relación de efector de células NK y anticuerpo anti-CD48 o el intervalo de titulación de ADC descrito

anteriormente; sin embargo, se usó el kit de enlazador de células verdes fluorescentes PKH2 (Sigma) para marcar la membrana celular (sin cromo-51). El colorante 7-AAD se usó para medir la viabilidad de las células T mediante citometría de flujo, utilizando el citómetro de flujo LSRII (Becton Dickinson).

5 La citotoxicidad dependiente del complemento se midió incubando las células T humanas normales o células tumorales WIL2-S con el anticuerpo diluido en serie (0,02 - 50 µg/mL) en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene suero AB humano al 10% inactivado por calor y 5µM del colorante fluorescente Sytox Green. Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C, CO₂ al 5%. La fluorescencia de las células lisadas se midió en un lector de placas Envision. La lisis específica máxima de las células objetivo se calculó como un porcentaje del 1% de las células de control tratadas con Tritón X-100.

15 La fagocitosis celular dependiente de anticuerpos se midió con el uso de macrófagos derivados de monocitos como células efectoras y células T humanas marcadas con colorante fluorescente rojo PKH26 (todas las células), células tumorales WIL2-S o Raji. Las células de control se preincubaron con el anticuerpo diluido en serie (0,2 ng/mL - 2 µg/mL) durante 30 minutos, y luego se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato. Se agregaron los macrófagos a las células objetivo en una relación de 4:1 en medio de cultivo RPMI 1640 que contenían suero bovino fetal al 10% de bajo contenido en IgG y se incubaron durante 2 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Los macrófagos se marcaron con el anticuerpo de ratón CD11b anti-humano conjugado con Alexa Fluor®-488. Los macrófagos positivos de células tumorales se detectaron como eventos que mostraban fluorescencia dual verde y roja en un citómetro de flujo FACSCalibur. La actividad fagocítica específica máxima se presenta como el porcentaje de macrófagos positivos para tumor después de restar la actividad de fondo del control de isotipo que no se une.

25 Resultados: Se evaluaron la actividad ADCC del anticuerpo hMEM102 no conjugado y del ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) y se compararon con la actividad ADCC de CAMPATH® (Alemtuzumab, anticuerpo anti-CD52) y rituximab (anticuerpo anti-CD20). Como se muestra en la Tabla 3, el anticuerpo MEM102-HALA humanizado tiene una actividad de ADCC moderada contra las células T normales en reposo y la línea celular tumoral WIL2-S. La actividad ADCC se reduce significativamente con la conjugación a 5088, lo que resulta en una actividad ADCC 2,7 veces menor en las células T en comparación con el anticuerpo desnudo.

30 Tabla 3: ADCC

Tipo de célula	# Receptor	# Receptor	# Receptor	% Máximo de lisis celular específica			
				hMEM102-HALA	hMEM102-HALA-5088	Campath (CD52)	Rituximab (CD20)
Células humanas Normales (n=2)	38.900	115.200		65 ± 3,1	24 ± 4,4	60 ± 3,5	
WIL2-5 (n = 2)	359.558	34.200	502.700	43 ± 0,6	17 ± 1,0		42 ± 6,0

40 Los resultados de la actividad de los CDC se muestran en la Tabla 4. Ni el anticuerpo hMEM102 no conjugado ni el ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) exhibieron actividad de CDC contra las células T normales en reposo y células tumorales WIL2-S. Tanto el alemtuzumab como el rituximab exhibieron una actividad de CDC sustancial contra las células de control.

45 Tabla 4: CDC

Tipo de célula	# Receptor	# Receptor	# Receptor	% Máximo de lisis celular específica			
				hMEM102-HALA	hMEM102-HALA-5088	Campath (CD52)	Rituximab (CD20)
Células humanas Normales (n=2)	38.900	115.200		2,4 ± 0,6	1,9 ± 2,7	108 ± 5,2	
WIL2-5 (n = 2)	359.558	34.200	502.700	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,9		66 ± 1,4

60 Los resultados de ADCP se muestran en la Tabla 5. Tanto el anticuerpo hMEM102 no conjugado como el ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) exhibieron actividad de ADCP moderada contra células T normales en reposo o líneas de células tumorales WIL2-S y Raji, consistentes con los niveles observados con Campath y Rituximab.

Tabla 5: ADCP

				% Máximo de lisis celular específica			
Tipo de célula	# Receptor CD48	# Receptor CD52	# Receptor CD20	hMEM102- HALA	hMEM102- HALA-5088	Campath (CD52)	Rituximab (CD20)
Células humanas Normales (n=2)	38.900	115.200		56	54	57	
WIL2-5 (n = 2)	359.558	34.200	502.700	62	60		56
Raji	249.023 (24%)	29.200	394.100	37	34		57

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la materia y se incluirán dentro del alcance de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencia informal

SEQ ID NO:1, hMEM102 HA - Región variable de la cadena pesada

QVQLVQSGSELKKGASVKVCSKASGYFTDFGMNWRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPYGNVFKGR
FVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:2, hMEM102 LA - Región variable de la cadena ligera

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNHWHYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVPSRFSGSGSDFTLTINSLEA
EDAATYYCQQNSWPLTFGGGKVEIKR

SEQ ID NO:3, cadena pesada CDR1
DFGMN

SEQ ID NO:4, cadena pesada CDR2
WINTFTGEPYGNVFKG

SEQ ID NO:5, cadena pesada CDR3
RHGNGNVFDS

SEQ ID NO:6, cadena ligera CDR1
RASQSIGSNH

SEQ ID NO:7, cadena ligera CDR2
YTSEIS

SEQ ID NO:8, cadena ligera CDR3
QQNSWPLT

SEQ ID NO:9, hMEM102 HA cadena-H G1

QVQLVQSGSELKKGASVKVCSKASGYFTDFGMNWRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPYGNVFKGRFVFLDTS
VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO:10, hMEM102 LA cadena-L

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNHWHYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVPSRFSGSGSDFTLTINSLEA
EDAATYYCQQNSWPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

SEQ ID NO:11, región constante de cadena pesada de origen natural

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFP

ES 2 795 818 T3

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 SEQ ID NO:12, Región constante de la cadena ligera

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

ES 2 795 818 T3

Listado de secuencia

<110> SEATTLE GENETICS, INC.

5 <120> ANTICUERPOS CD48 Y CONJUGADOS DE LOS MISMOS

<130> 4000-00111PC

10 <150> EE.UU., 62/134,981
<151> 2015-03-18

<160> 12

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> hMEM102 HA – Región variable de la cadena pesada

25 <400> 1

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Phe
30				20					25					30		
	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35			35					40					45			
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Ser	Tyr	Gly	Asn	Val	Phe
40		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
45						70					75					80
	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
50					85					90					95	
	Ala	Arg	Arg	His	Gly	Asn	Gly	Asn	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
55				100					105					110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
60			115													

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> hMEM102 LA – Región variable de la cadena ligera

65 <400> 2

ES 2 795 818 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 5 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 10 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 15 Lys Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 25 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada
 <400> 3
 35 Asp Phe Gly Met Asn
 1 5
 40 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada
 45 <400> 4
 Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe Lys
 1 5 10 15
 50 Gly
 <210> 5
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada
 60 <400> 5
 Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser
 1 5 10
 65 <210> 6

ES 2 795 818 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> CDR1 de la cadena ligera
 <400> 6
 10 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Ile His
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la cadena ligera
 20 <400> 7
 Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> CDR3 de la cadena ligera
 <400> 8
 35 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5
 40 <210> 9
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> cadena-P del hMEM102 HA de G1
 <400> 9
 50 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 55 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 60 Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe
 50 55 60
 65 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 795 818 T3

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 5
 Ala Arg Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 10
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 15
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 20
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 25
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 30
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 35
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 40
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 45
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 50
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 55
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 60
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 65
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

ES 2 795 818 T3

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

5

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

10

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

15

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

20

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

25

Lys
 <210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

35

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

40

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

45

Lys Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

50

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

55

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

60

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

65

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

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

ES 2 795 818 T3

5 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 10 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 15 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 11
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región constante de la cadena pesada que se produce naturalmente
 <400> 11
 30 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 35 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 45 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 50 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 55 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 60 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

65

ES 2 795 818 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 5
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 10
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 15
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 20
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 25
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 30
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 35
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 40
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 45
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 50
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325
 <210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región constante de la cadena ligera
 <400> 12
 55
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 60
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 65
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

ES 2 795 818 T3

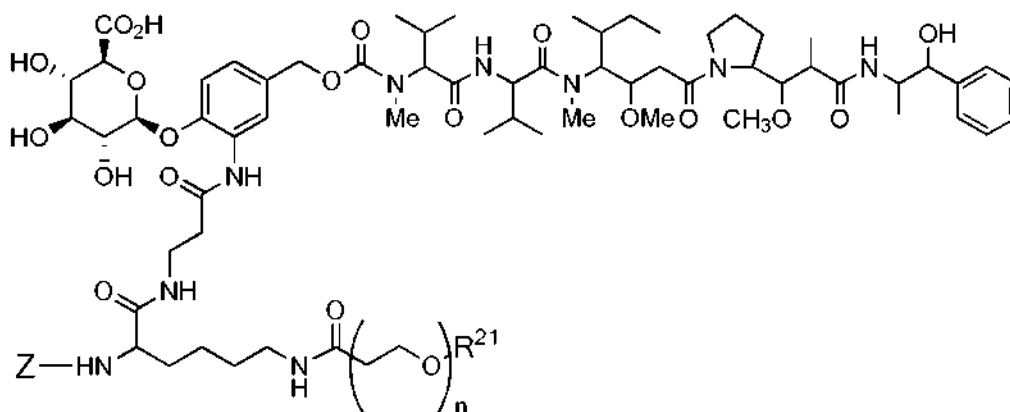
5 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

10 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

15 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

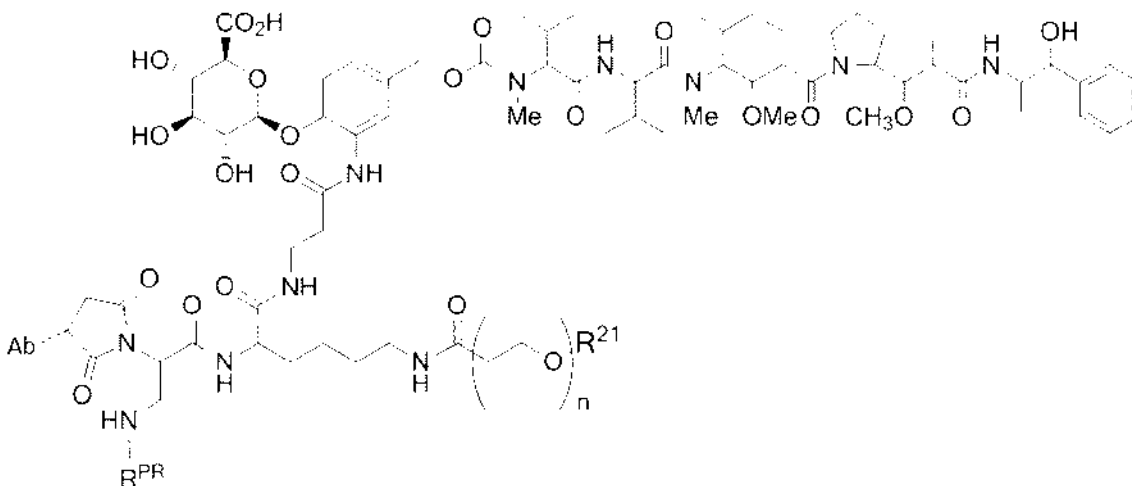
REIVINDICACIONES

- Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la proteína CD48 humana,
en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y
en donde la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se conjuga con un fármaco citotóxico unido a un enlazador, preferentemente el enlazador de fármacos tiene la fórmula:



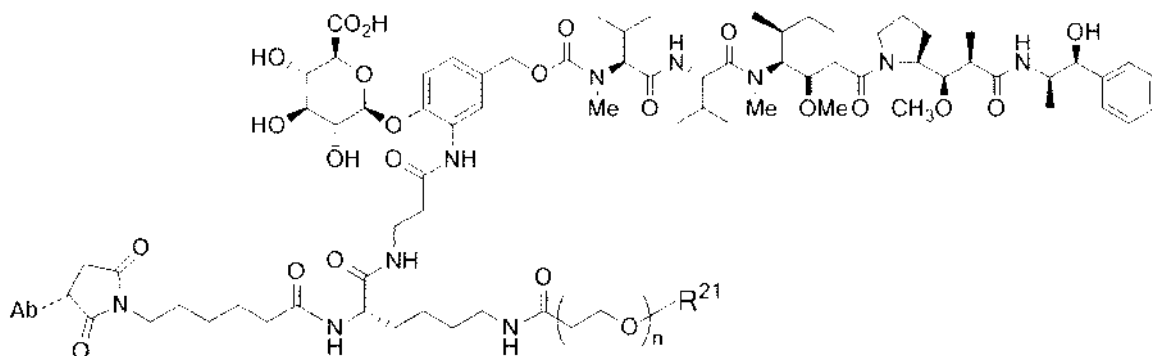
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde Z representa una porción orgánica que tiene un sitio reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo para formar un enlace covalente con el mismo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol.

- El anticuerpo de la reivindicación 2 en donde el enlazador de fármacos tiene la fórmula



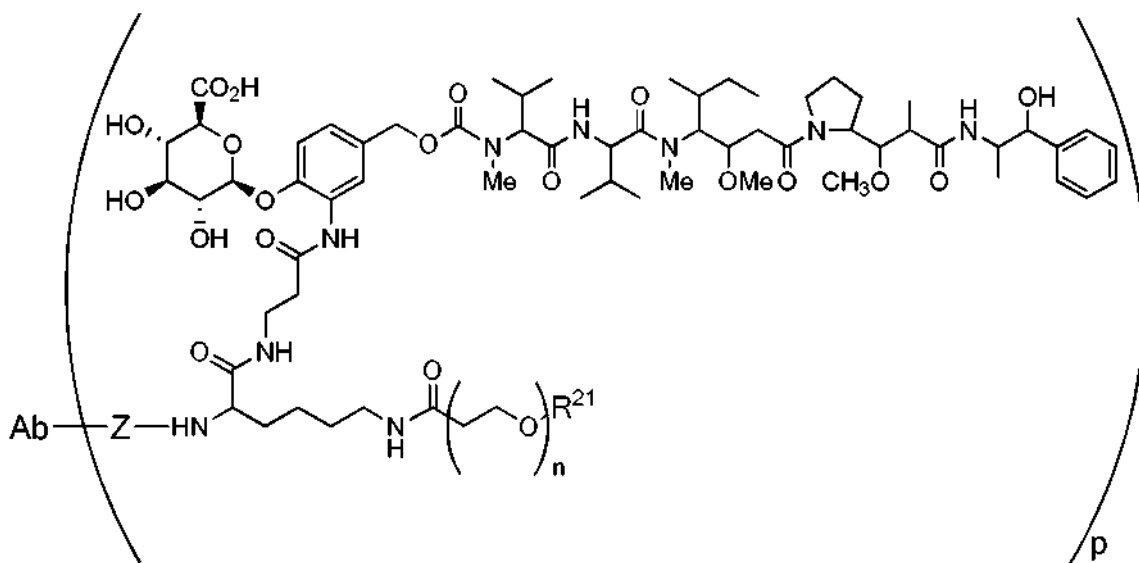
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde Ab es un anticuerpo anti-CD48 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, la línea discontinua representa el sitio de unión al anticuerpo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol.

- El anticuerpo de la reivindicación 2 en donde el enlazador de fármacos tiene la fórmula



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde Ab es un anticuerpo anti-CD48 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, la línea discontinua representa el sitio de unión al anticuerpo, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción polietilenglicol.

- 20 5. El anticuerpo de la reivindicación 3 o 4 en donde n se encuentra en el intervalo de 8 a 14, preferentemente n se encuentra en el intervalo de 10 a 12, con mayor preferencia n es 12.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde R²¹ es -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H.
- 25 7. Un compuesto conjugado de anticuerpo anti-CD48-fármaco que tiene la fórmula

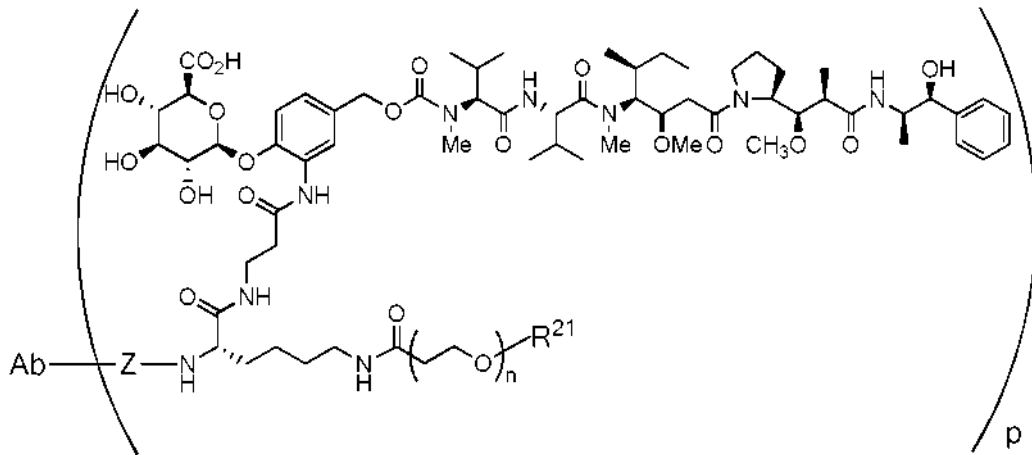


50 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde Ab es un anticuerpo anti-CD48 de la reivindicación 1, Z representa una porción orgánica que une el anticuerpo y la porción del enlazador de fármacos a través de enlaces covalentes, n se encuentra en el intervalo de 8 a 36, R²¹ es una unidad de encapsulación para la porción de polietilenglicol, y p es de 1 a 16, preferentemente tiene la fórmula:

55

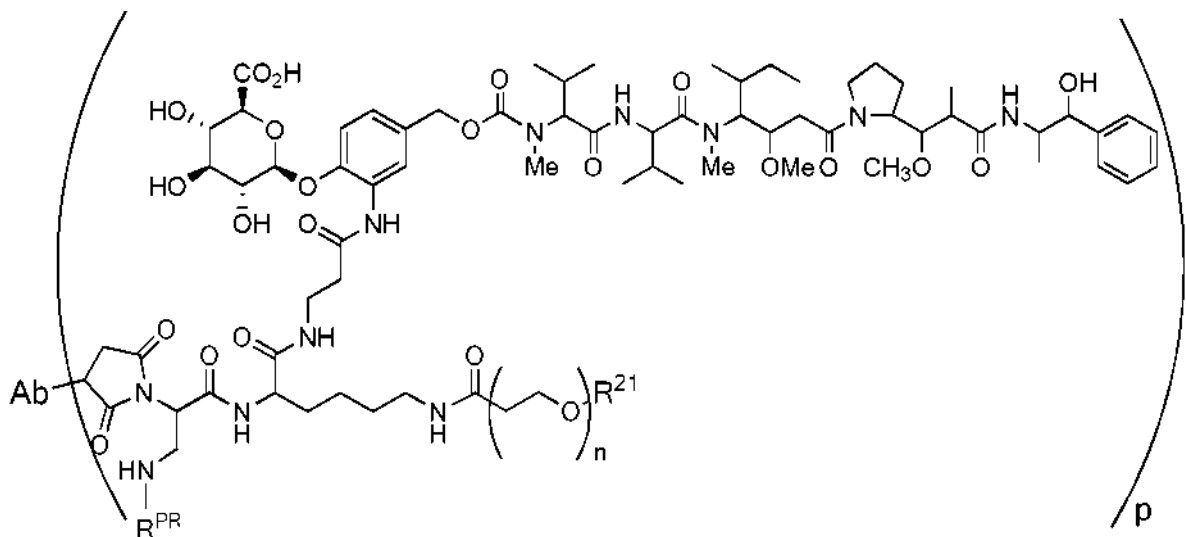
60

65



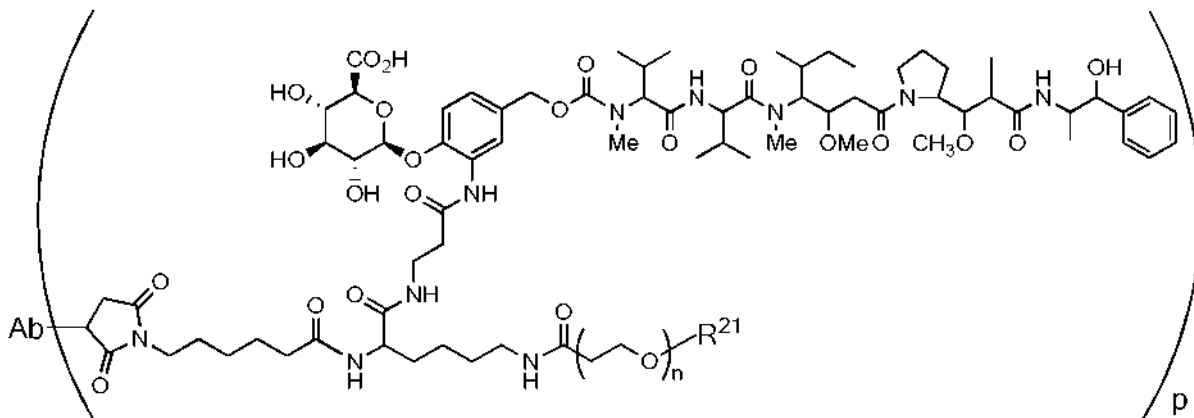
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

tiene la fórmula:



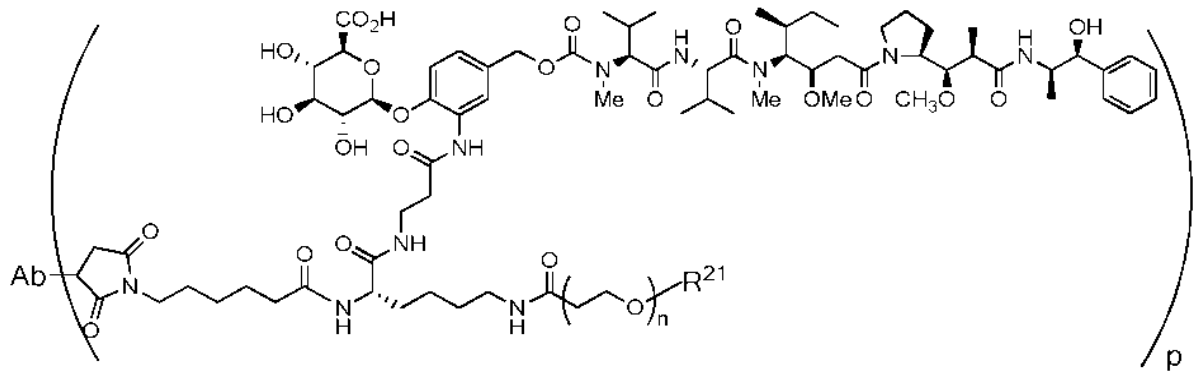
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector,

tiene la fórmula

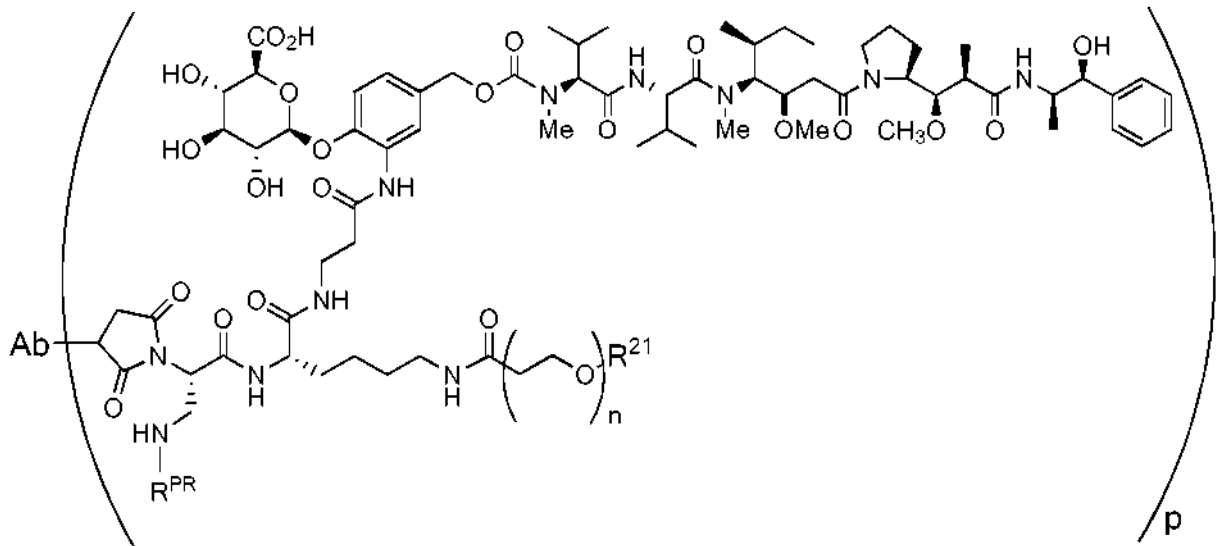


una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

tiene la fórmula



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
tiene la fórmula



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que R^{PR} es hidrógeno o un grupo protector.

8. El compuesto conjugado de anticuerpo anti-CD48-fármaco de la reivindicación 7 en donde n se encuentra en el intervalo de 8 a 14, preferentemente n se encuentra en el intervalo de 10 a 12, con mayor preferencia n es 12.
9. El compuesto conjugado de anticuerpo anti-CD48-fármaco de la reivindicación 8 en donde R^{21} es $-CH_3$ o $-CH_2CH_2CO_2H$.
10. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 2-9 en donde la unión al Ab se realiza a través de los residuos de cisteína de los enlaces disulfuro intercadena del anticuerpo.
11. Una composición de conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una población de moléculas de conjugado anticuerpo anti-CD48-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 2-10 en donde la carga de fármaco promedio de la composición es de 8 y la carga de fármaco predominante en la composición es de 8.
12. Una composición de la reivindicación 11 para usar en un método para tratar a un paciente con un cáncer que expresa CD48, el método comprende la etapa de administrar la composición al paciente,
preferentemente el cáncer que expresa CD48 es mieloma múltiple,
con mayor preferencia, el cáncer que expresa CD48 se selecciona del grupo que consiste en tumores malignos de células B y leucemia mielógena aguda.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

FIGURA 1

		10	20	30	40	50	60
mMEM102 vHI						
hIGVH7-4-1/JH5P.....ET.....I.....						
hMEM102 vHA	QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFTSYAMHWVRQAPOQGLEMMGWINTWNGNPTTVAQGFTGRFVP						
hMEM102 vHBI.....						
hMEM102 vHCI.....						
mMEM102 vR		70	80	90	100	110	
hIGVH7-4-1/JH5						
hMEM102 vHA	..E..AT.....NN..S.....T..F...RHGNG.V.....						
hMEM102 vHB	SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR-----NWFDSWGQGTLLVTVSS						
hMEM102 vHC						

FIGURA 2

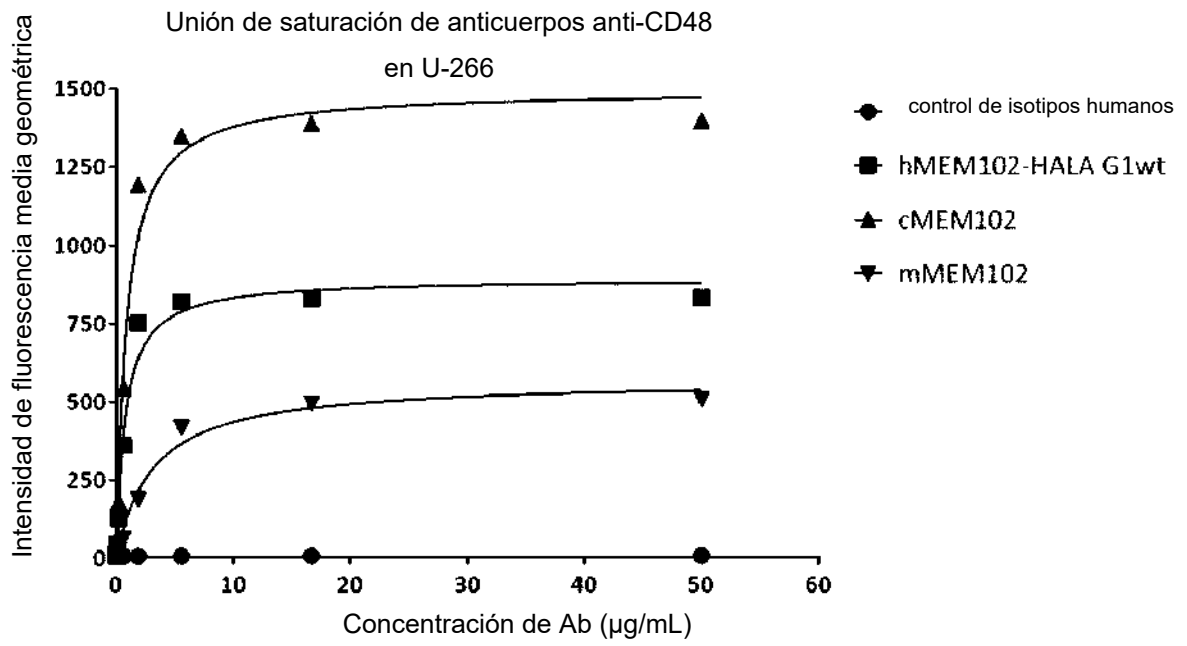


FIGURA 3

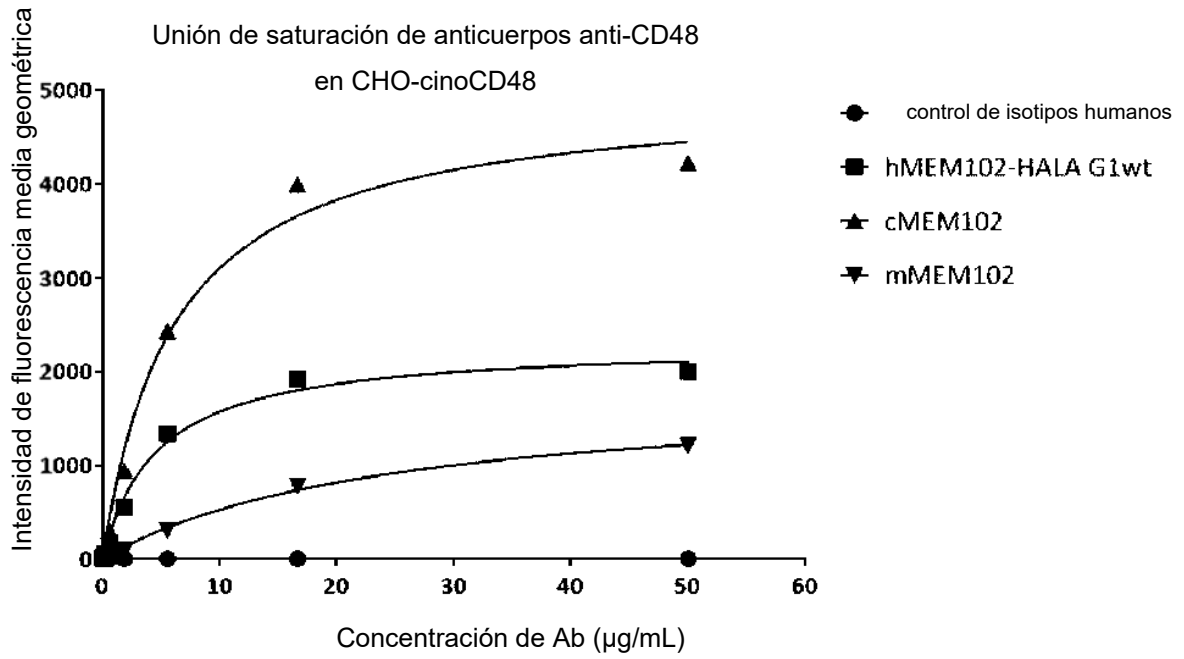


FIGURA 4

NCI-H929

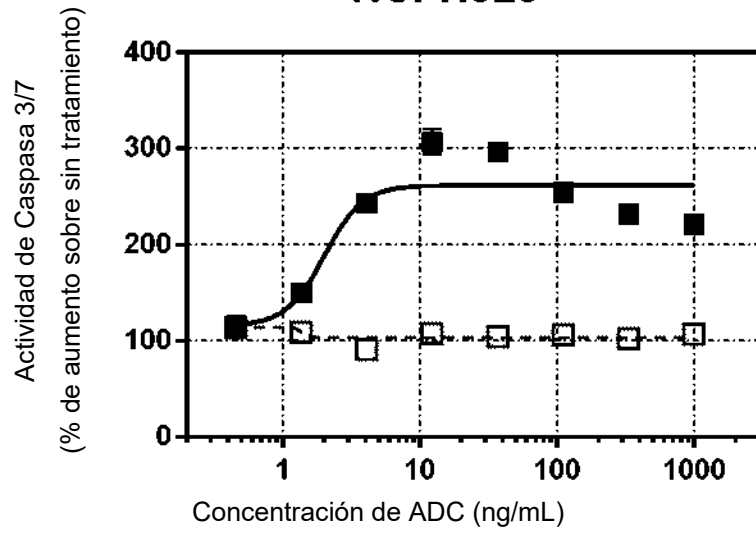


FIGURA 5

U-266

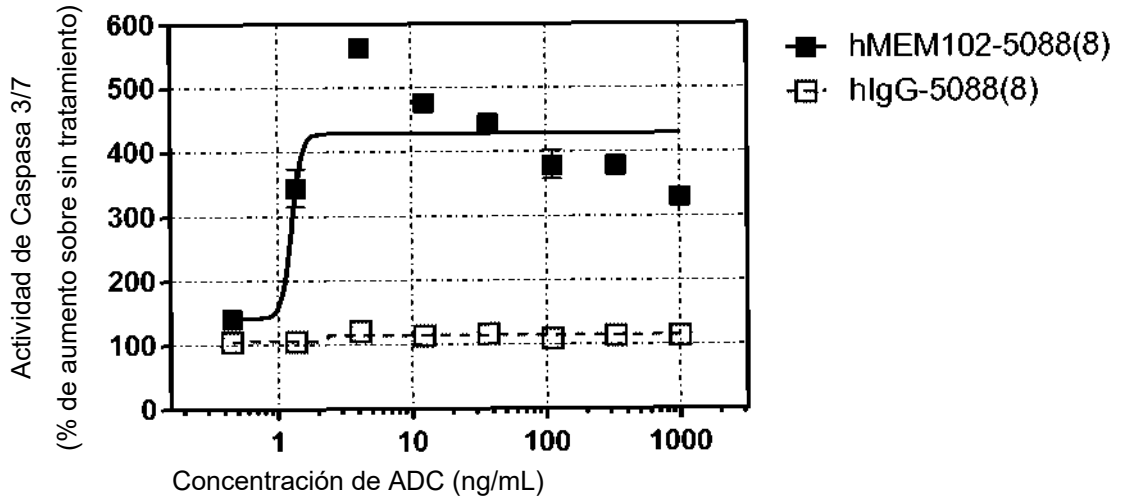
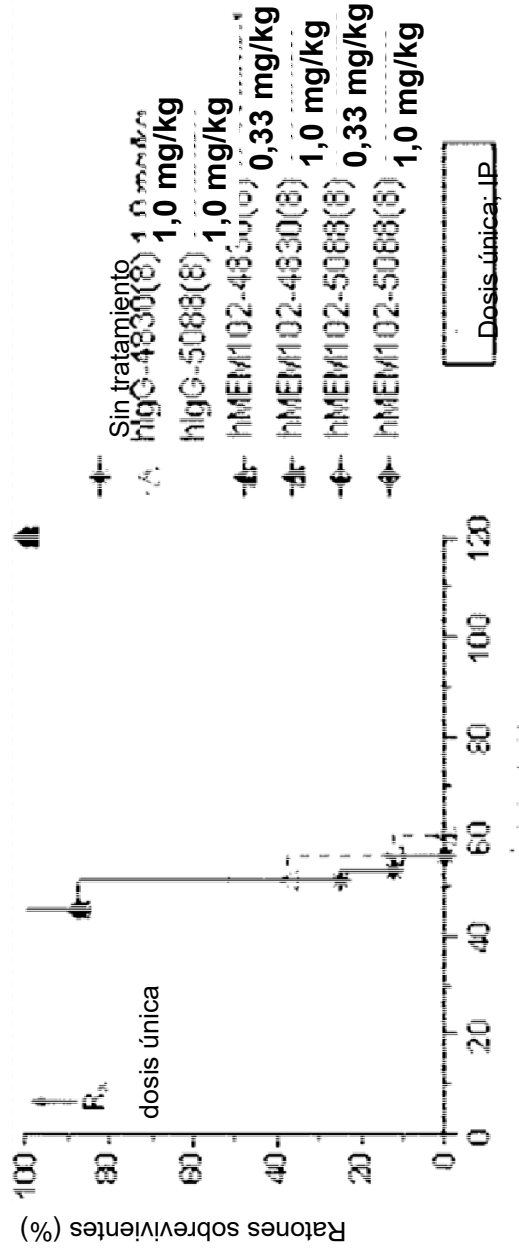


FIGURA 6

Los ADC anti-CD48 Auristatina (~483 000 receptores CD48/célula NCI-H929) en ratones NSG



Días después del implante tumoral

FIGURA 7

Los ADC anti-CD48 Auristatina (~483 000 receptores CD48/célula NCI-H929) en ratones NSG

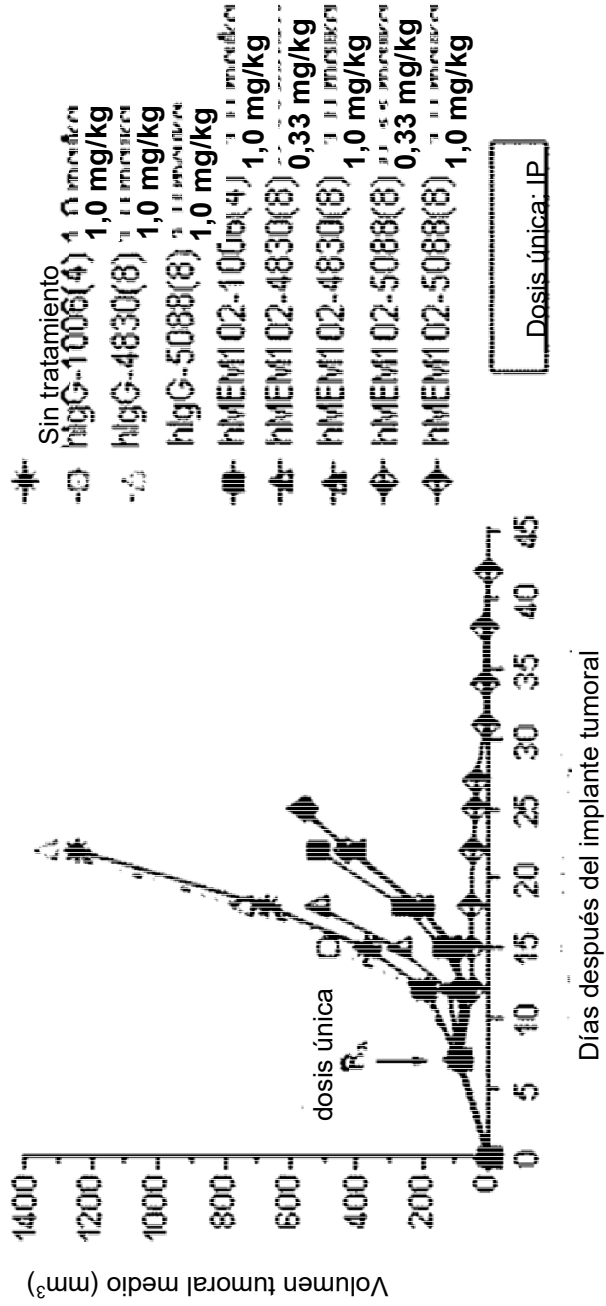


FIGURA 8

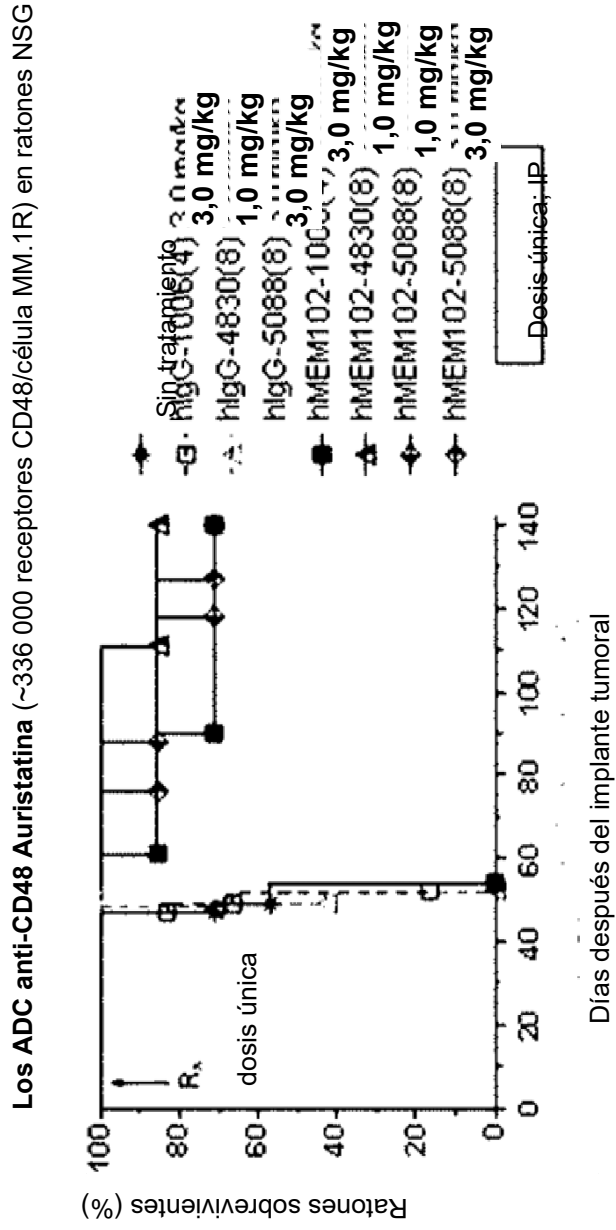


FIGURA 9

Los ADC anti-CD48 Auristatina (~336 000 receptores CD48/célula MM.1R) en ratones NSG

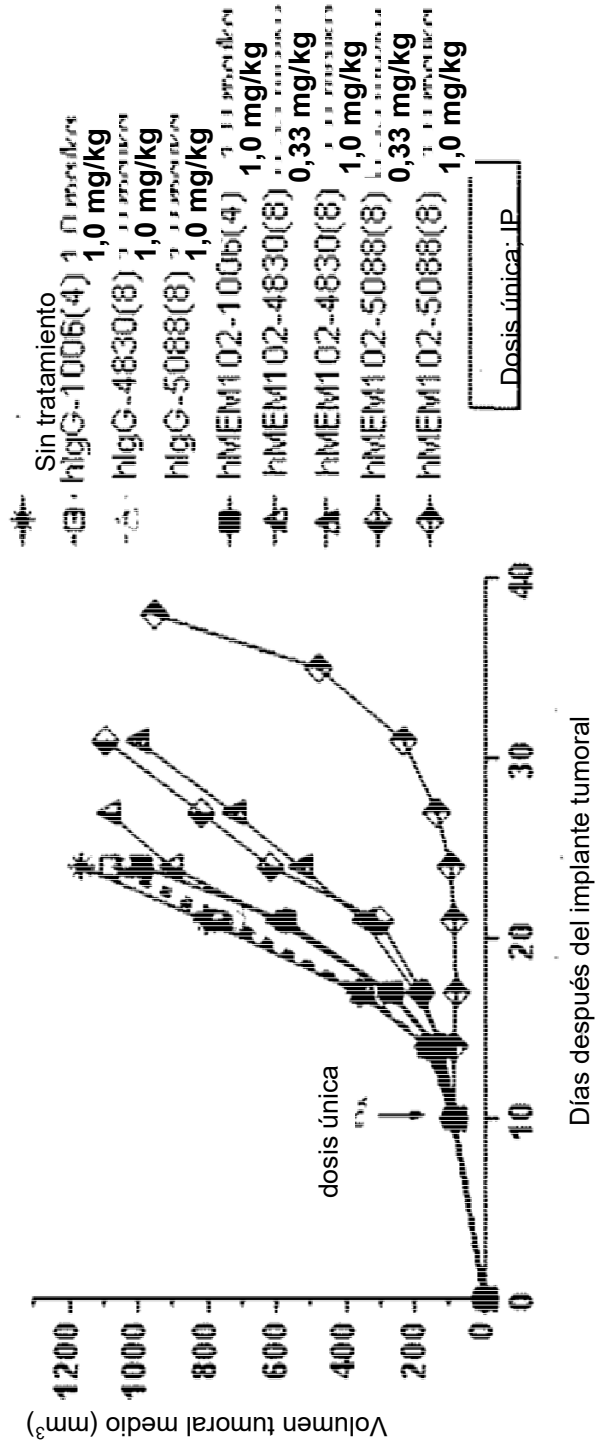


FIGURA 10

Los ADC anti-CD48 Auristatina (~ 135 000 receptores CD48/células EJM) en ratones NSG

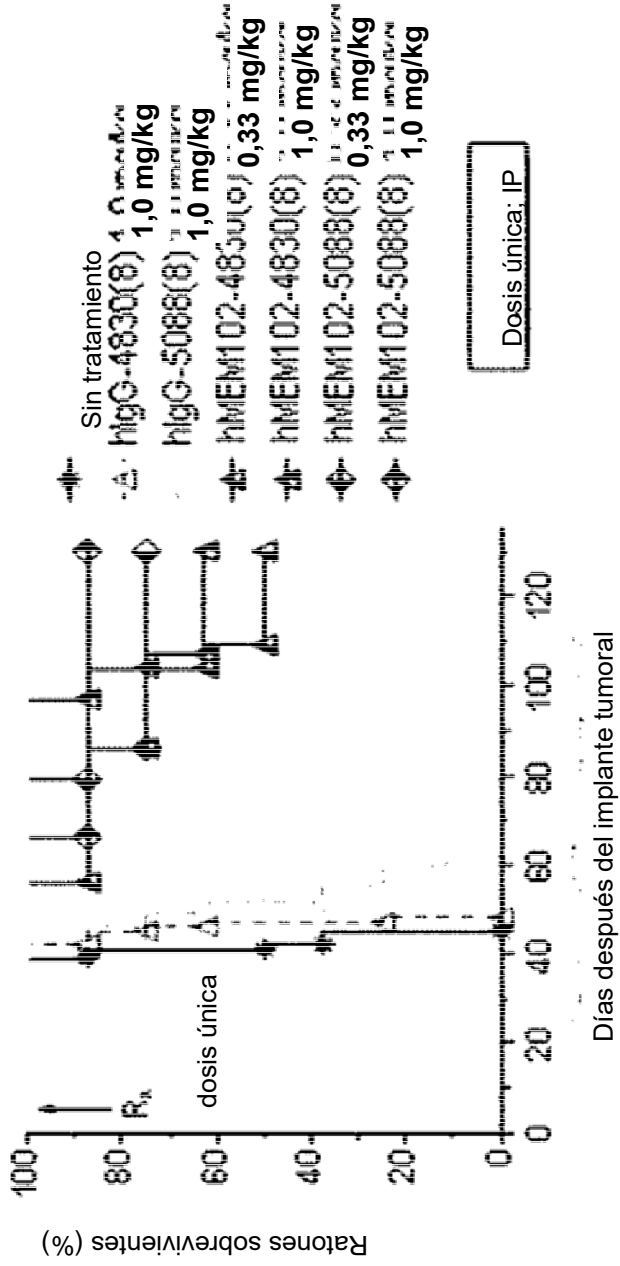
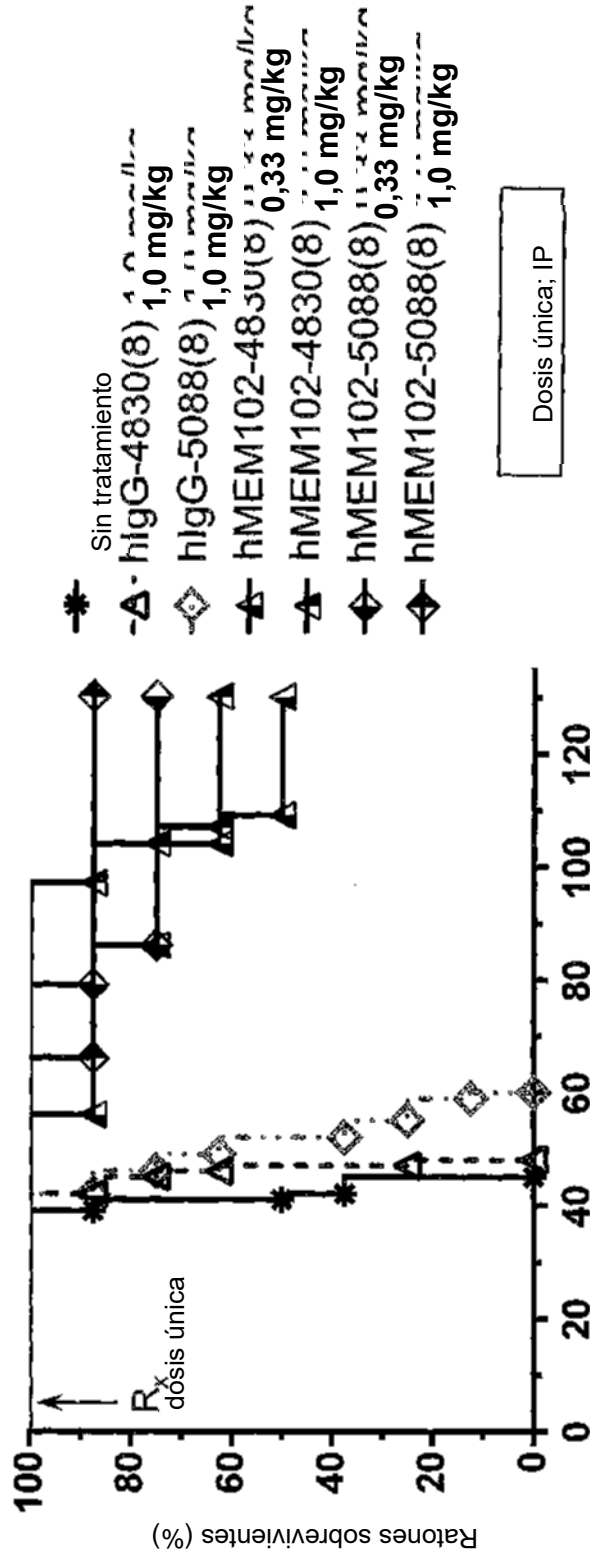


FIGURA 11

Los ADC anti-CD48 Auristatina (~ 135 000 receptores CD48/células EJM) en ratones NSG



Días después del implante tumoral