

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA BCMA**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos contra
5 BCMA, su manufactura y uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El antígeno de maduración de células B humanas, también conocido como BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), es un
10 miembro de la superfamilia de receptores de necrosis de tumor que se expresa preferentemente en células de plasma diferenciadas (Laabi et al., 1992; Madry et al., 1998). BCMA es una proteína de transmembrana tipo III no glucosilada, que está implicada en la maduración, crecimiento y supervivencia de las células B. BCMA es un receptor
15 para dos ligandos de la superfamilia de TNF: APRIL (un ligando inductor de proliferación), el ligando de alta afinidad para BCMA y el factor de activación de células B BAFF, el ligando de baja afinidad para BCMA (THANK, BlyS, estimulador de linfocitos B, TALL-1 y zTNF4). APRIL y BAFF muestran similitud estructural y especificidad
20 de unión al receptor solapante aún distinta. El regulador negativo TACI también se une tanto a BAFF como APRIL. La unión coordinada de APRIL y BAFF a BCMA y/o TACI activa el factor de transcripción NF- κ B y aumenta la expresión de los miembros de la familia de Bcl-2 pro-supervivencia (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y la
25 bajorregulación de factores pro-apoptóticos (por ejemplo, Bid, Bad, Bik, Bim, etc.), inhibiendo así la apoptosis y promoviendo la supervivencia. La acción combinada promueve la diferenciación de células B, proliferación, supervivencia y producción de anticuerpo (como se revisa en Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244(1): 115-
30 133).

Los anticuerpos contra BCMA se describen, por ejemplo, en Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, WO200124811,

WO200124812, WO2010104949 y WO2012163805. Los anticuerpos contra BCMA y uso para el tratamiento de linfomas y mieloma múltiple se mencionan, por ejemplo, en WO2002066516 y WO2010104949. WO2013154760 y WO2015052538 se refieren a receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden una porción de reconocimiento de BCMA y una porción de activación de células T. Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018 se relacionan con anticuerpos anti-BCMA con actividad bloqueadora de ligandos que podrían promover la citotoxicidad de líneas celulares de mieloma múltiple (MM) como anticuerpos desnudos o como conjugados de anticuerpo-fármaco. Ryan mostró que SG1, un anticuerpo de BCMA inhibidor, bloquea la activación dependiente de APRIL del factor nuclear κ B de una manera dependiente de la dosis in vitro. Ryan también mencionó el anticuerpo SG2 que inhibía la unión de APRIL a BCMA de manera no significativa.

Se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes en el pasado reciente, por ejemplo por fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo de IgG y dominios de cadena única (ver, por ejemplo, Kontermann RE, mAbs 4: 2, (2012) 1-16). Los anticuerpos biespecíficos en donde los dominios variables de VL y VH o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí se describen en WO2009080251 y WO2009080252.

Un procedimiento para eludir el problema de subproductos erróneos, que se conoce como "perillas en agujeros", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes introduciendo mutaciones en los dominios de CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos fueron reemplazados por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un 'agujero'. Por el contrario, los aminoácidos con cadenas laterales grandes se introdujeron en el otro dominio de CH3, para crear una 'perilla'. Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observaron altos

rendimientos de formación de heterodímeros ('perilla-agujero') versus formación de homodímeros ('agujero-agujero' o 'perilla-perilla') (Ridgway JB, Presta LG, Carter P. Protein Eng. 9, 617-621 (1996); y WO1996027011). El porcentaje de heterodímero podría aumentarse
 5 adicionalmente por remodelación de las superficies de interacción de los dos dominios de CH3 utilizando un procedimiento de expresión en fagos y la introducción de un puente de disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant A.M., et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol. Biol 270
 10 (1997) 26-35). Nuevos procedimientos para la tecnología de perillas en agujeros se describen, por ejemplo, en EP 1870459A1. Aunque este formato parece muy atractivo, actualmente no hay datos que describan la progresión hacia la clínica. Una limitación importante de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos
 15 originales deben ser idénticas para evitar el mal emparejamiento y la formación de moléculas inactivas. Por lo tanto, esta técnica no es apropiada para desarrollar fácilmente anticuerpos biespecíficos recombinantes contra dos objetivos a partir de dos anticuerpos contra el primero y el segundo objetivo, ya que las cadenas pesadas de estos
 20 anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas deben optimizarse. Xie, Z., et al., J Immunol. Methods 286 (2005) 95-101 se refiere a un formato de anticuerpo biespecífico que usa scFv en combinación con la tecnología de perillas en agujeros para la parte de Fc.

El complejo TCR/CD3 de los células T consiste ya sea de un
 25 heteterodímero TCR (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) coexpresado en la superficie celular con las subunidades invariables de CD3 marcadas con gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), zeta (ζ) y eta (η). El CD3 ϵ humano se describe bajo UniProt P07766 (CD3E_HUMAN).

Un anticuerpo anti-CD3 ϵ descrito en el estado de la técnica
 30 es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 reacciona con CD3 tanto primate como humano. SP34 está disponible de Pharmingen. Un anticuerpo anti-CD3 adicional descrito

en el estado de la técnica es UCHT-1 (ver WO2000041474). Un anticuerpo anti-CD3 adicional descrito en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; usado en los ensayos de Fase I/II de GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1 y BC-3 porque SP-34 reconoce un epítipo presente únicamente en la cadena ϵ de CD3 (ver Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítipo aportado por las cadenas ϵ y γ . Se describen anticuerpos anti-CD3 adicionales en WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837, WO2010037838 y US8236308 (WO2007042261). Las secuencias de CDR, VH y VL de un anticuerpo anti-CD3 adicional se muestran en SEQ ID NO: 7 y 8.

Los anticuerpos biespecíficos contra CD3 y BCMA se mencionan en WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058 y WO2012143498. Los compuestos CAR de anticuerpos contra BCMA se mencionan en WO2013154760, WO2013154760 y WO2014140248.

Las funciones efectoras mediadas por células de anticuerpos monoclonales (como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) se pueden mejorar diseñando su composición de oligosacáridos en Asn297 como se describe en Umaña, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; y US6602684. WO1999054342, WO2004065540, WO2007031875 y WO2007039818, Hristodorov D, Fischer R, Linden L., Mol Biotechnol. 2012 Oct 25. (Epub) también se refieren a la ingeniería de glucosilación de anticuerpos para mejorar la citotoxicidad celular mediada por Fc.

También varios residuos de aminoácidos en la región de bisagra y el dominio de CH2 influyen en las funciones efectoras mediadas por células de anticuerpos monoclonales (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]. Por lo tanto, la modificación de tales aminoácidos puede mejorar las funciones efectoras mediadas por células. Tales modificaciones de anticuerpos

para aumentar las funciones efectoras mediadas por células se mencionan en EP1931709, WO200042072 y comprenden en la parte de Fc sustituciones en las posiciones de aminoácidos 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 y 332. Las modificaciones de anticuerpo adicionales para aumentar las funciones efectoras mediadas por células se mencionan en EP1697415 y comprenden el remplazo de aminoácidos de posiciones de aminoácidos de EU 277, 289, 306, 344 o 378 con un aminoácido cargado, un aminoácido polar, o un aminoácido no polar.

Formatos de anticuerpos y formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos son también pepcuerpos (WO200244215), Nuevo Receptor de Antígeno ("NAR") (WO2003014161), dímeros de diacuerpo-diacuerpo "TandAbs" (WO2003048209), scFv modificado por óxido de polialquileno (US7150872), anticuerpos de conejo humanizados (WO2005016950), dominios de inmunoglobulina sintéticos (WO2006072620), diacuerpos covalentes (WO2006113665), flexicuerpos (WO 2003025018), anticuerpos de dominio, dAb (WO2004058822), vaccicuerpo (WO2004076489), anticuerpos con nuevo armazón de primate mundial (WO2007019620), un conjugado de anticuerpo-fármaco con enlazantes escindibles (WO2009117531), anticuerpos de IgG4 con región de bisagra removida (WO2010063785), anticuerpos biespecíficos con dominios de CH3 similares a IgG4 (WO2008119353), anticuerpos camélidos (US6838254), nanocuerpos (US7655759), diacuerpos de CAT (US5837242), (scFv)₂ biespecífico dirigido contra el antígeno objetivo y CD3 (US7235641),) plAnticuerpos de sIgA (US6303341), minicuerpos (US5837821), IgNAR (US2009148438), anticuerpos con regiones Fc y bisagra modificadas (US2008227958, US20080181890), anticuerpos trifuncional (US5273743), triomabs (US6551592), troycuerpos (US6294654).

WO2014122143 describe anticuerpos anti-BCMA humanos caracterizados porque la unión del anticuerpo no se reduce en 100 ng/ml de APRIL por más de 20% medido en un ensayo ELISA como OD a 405

nm en comparación con la unión del anticuerpo a BCMA humano sin APRIL, el anticuerpo no altera la activación de NF- κ B dependiente de APRIL por más de 20%, en comparación con APRIL solo, y el anticuerpo no altera la activación de NF- κ B sin APRIL por más de 20%, en comparación con el anticuerpo. WO2014122144 describe anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a los dos objetivos humanos CD3 ϵ y BCMA humano, que comprenden anticuerpos anti-BCMA humanos de WO2014122143. Un anticuerpo anti-BCMA humano con propiedades únicas, especialmente con respecto a uso terapéutico como enlazante de células T biespecífico, es el anticuerpo 83A10, caracterizado porque comprende como regiones CDR CDR1H de la SEQ ID NO: 15, CDR2H de la SEQ ID NO: 16, CDR3H de la SEQ ID NO: 17, CDR1L de la SEQ ID NO: 18, CDR3L de la SEQ ID NO: 19, y CDR3L de la SEQ ID NO: 20, descrito también en WO2014122143 y WO2014122144.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención comprende anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al antígeno de maduración de células B humano (BCMA). Los anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden como regiones CDR3H y CDR3L las mismas regiones CDR que el anticuerpo 83A10.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden en una modalidad como Regiones CDR3H y CDR3L las mismas regiones CDR que el anticuerpo 83A10, pero muestran ventajas especialmente potentes y eficientes en comparación con el anticuerpo 83A10 para matar células de MM en aspirados de médula ósea del paciente.

La invención comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1H, CDR2H, CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ

ID NO: 24,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

5 c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

La invención comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una Región de VL que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

25 b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o

c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

La invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14 en donde el aminoácido 49 se selecciona del grupo de

aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H). En una modalidad, el aminoácido 49 es E dentro de la SEQ ID NO: 12, S dentro de la SEQ ID NO: 13 o H dentro de la SEQ ID NO: 14.

5 La invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14 en donde el aminoácido 74 es treonina (T) o alanina (A). En una modalidad, el aminoácido 74 es A dentro de la SEQ ID NO: 10 14.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden en una modalidad como regiones CDR3H, CDR1L, CDR2L y CDR3L las mismas regiones CDR que el anticuerpo 83A10. La invención comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, 15 caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, una región CDR2L de la SEQ ID NO: 32 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

20 a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30,

 b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, o

25 c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37.

La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL de la SEQ ID NO: 12 y una región de VH seleccionada del grupo que comprende las regiones de VH de la SEQ ID NO: 38, 39, y 40. La 30 invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL de la SEQ ID NO: 12, en donde el aminoácido 49 se selecciona del grupo de aminoácidos

tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H). En una modalidad, el aminoácido 49 es E.

La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VL una región de VL seleccionado del grupo que consiste de las regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13, y 14. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 13. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 14.

La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 38, 39, y 40. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 38 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 39 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 40 y

como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza además porque también se une específicamente a BCMA cynomolgus. En una modalidad, un anticuerpo de la invención muestra con respecto a la unión a BCMA una abertura de afinidad cyno/humana entre 1.5 y 5 o 1.5 y 10 o 1.5 y 16 (tabla 5).

El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, por lo tanto, en una modalidad se caracteriza porque también se une específicamente a CD3 cynomolgus. En una modalidad, el anticuerpo anti-BCMA/anti-CD3 biespecífico de la invención muestra una abertura cyno/humana de Mab CD3 entre 1.25 y 5 o entre 0.8 y 1.0.

En una modalidad adicional de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo con una parte de Fc o sin una parte de Fc que incluye un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento variable de cadena única (scFv) tal como un acoplador de células T biespecífico, diacuerpo, o scFv en tándem, un mimético de anticuerpo tal como DARPIn, un anticuerpo monoespecífico desnudo, o un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo multiespecífico, anticuerpo biespecífico, un acoplador de células T biespecífico, diacuerpo, o scFv en tándem se une específicamente a BCMA y CD3.

Con base un anticuerpo de acuerdo con la invención es posible generar conjugados de anticuerpo-fármaco contra BCMA y anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos contra BCMA y uno o más objetivos adicionales en diferentes formatos con o sin una parte de Fc conocida en el estado de la técnica (ver, por ejemplo anteriormente en "antecedentes de la invención"), fragmentos variables de cadena única (scFv), tales como acopladores de células T biespecíficos, diacuerpos, scFv en tándem, y miméticos de anticuerpos tales como DARPins, todos también son modalidades de la invención. Los formatos de anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en el estado de la técnica y, por ejemplo también se describen en

Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136 y Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) y Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362.

5 Una modalidad adicional de la invención es un anticuerpo biespecífico contra los dos objetivos CD3e humano (nombrado adicionalmente también como "CD3") y el dominio extracelular de BCMA humano (nombrado adicionalmente también como "BCMA"), caracterizado porque comprende como porción de unión a BCMA un anticuerpo anti-BCMA
10 de acuerdo con la invención.

 La invención se refiere, en una modalidad, a un anticuerpo biespecífico contra BCMA y CD3, caracterizado porque comprende dentro de la porción de unión a BCMA una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región
15 CDR1H, CDR2H, CDR1L, y CDR2L seleccionada del grupo de

 a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

 b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ
20 ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

 c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28,

25 d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

 e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ
30 ID NO: 32, y

 f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ

ID NO: 32,

La invención se refiere, en una modalidad, a un anticuerpo biespecífico contra BCMA y CD3, caracterizado porque comprende una región de VH de un anticuerpo de acuerdo con la invención (llamada
5 adicionalmente "VH de BCMA") que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL (llamada adicionalmente "VL de BCMA") que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

10 a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o

15 c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10.

La invención se refiere, en una modalidad, a un anticuerpo
20 biespecífico contra BCMA y CD3, caracterizado porque la VL de BCMA se selecciona del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como región de VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12. La invención proporciona, en una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 13. La invención proporciona, en una modalidad, un
25 anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 14.

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14 en donde el aminoácido 49 se selecciona del grupo de aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H). En una modalidad, el aminoácido 49 es E (SEQ ID NO: 12), S (SEQ ID NO: 13) o H (SEQ ID NO: 14). La invención proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14 en donde el aminoácido 74 es treonina (T) o alanina (A). En una modalidad, el aminoácido 74 es A dentro de la SEQ ID NO: 14.

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico contra BCMA y CD3, caracterizado porque comprende una VH de BCMA que comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una VL de BCMA que comprende una región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, una región CDR2L de la SEQ ID NO: 32 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, o

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37.

El anticuerpo biespecífico contra BCMA y CD3 se caracteriza porque, en una modalidad, comprende un anticuerpo anti-BCMA de acuerdo con la invención y un anticuerpo anti-CD3, en donde

a) la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a uno de los objetivos CD3 y BCMA; y

b) la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al otro de los objetivos, en

donde los dominios variables de VL y VH o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En una modalidad, un dominio de VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza a un dominio de CH1 o CL de la porción de anticuerpo anti-BCMA. En una modalidad, un dominio de VL de la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza a un dominio de CH1 o CL de la porción de anticuerpo anti-BCMA.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende no más de un fragmento Fab de una porción de anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de una porción de anticuerpo anti-BCMA y no más de una parte de Fc, en una modalidad una parte de Fc humana. En una modalidad, no más de un fragmento Fab de la porción de anticuerpo anti-CD3 y no más de un fragmento Fab de la porción de anticuerpo anti-BCMA se enlazan a la parte de Fc y el enlace se realiza por unión al extremo C terminal de los fragmentos Fab a la región de bisagra. En una modalidad el segundo fragmento Fab de la porción de anticuerpo anti-BCMA se enlaza a través de su extremo C terminal ya sea al extremo N terminal del fragmento Fab de la porción de anticuerpo anti-CD3 o a la región de bisagra de la parte de Fc y por lo tanto entre la parte de Fc y la porción de anticuerpo anti-CD3. Los anticuerpos biespecíficos preferidos se muestran en las Figuras 1 a 3.

Especialmente preferidos son los anticuerpos biespecíficos que comprenden solamente los fragmentos Fab y la parte de Fc como se especifica, con o sin "sustitución aa":

Fab BCMA-Fc-Fab CD3 (formato biespecífico, fig. 1A o 1B),
Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA (formato biespecífico, fig. 2A o 2B),
Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (formato biespecífico, fig. 2C o 2D),
Fc-Fab CD3-Fab BCMA (formato biespecífico, fig. 3A o 3B),
Fc-Fab BCMA-Fab CD3 (formato biespecífico, fig. 3C o 3D).

Como se muestra en las figuras 1 a 3 "Fab BCMA-Fc", "Fab BCMA-Fc-Fab CD3" y "Fab BCMA-Fc-Fab CD3" significa que los fragmentos

Fab está unidos a través de su extremo C terminal al extremo N terminal del fragmento Fc. "Fab CD3-Fab BCMA" significa que el fragmento Fab CD3 está unido con su extremo N terminal al extremo C terminal del fragmento Fab BCMA. "Fab BCMA-Fab CD3" significa que el
5 fragmento Fab BCMA está unido con su extremo N terminal al extremo C terminal del fragmento Fab CD3.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA enlazado con su extremo C terminal al extremo N terminal de la porción de anticuerpo CD3 del
10 anticuerpo biespecífico. En una modalidad, un dominio de VL de la primera porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza a un dominio de CH1 o CL del segundo anticuerpo anti-BCMA.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA enlazado con su extremo
15 C terminal a la parte de Fc (como el primer fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA) y enlazado con su extremo N terminal al extremo C terminal de la porción de anticuerpo CD3. En una modalidad, un dominio de CH1 de la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza al dominio de VH de la segunda porción de anticuerpo anti-BCMA.

20 En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende una parte de Fc enlazada con su extremo N terminal al extremo C terminal del fragmento Fab de anticuerpo CD3. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende una parte de Fc enlazada con su primer extremo N terminal al extremo C terminal del fragmento Fab de anticuerpo CD3
25 y un segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA enlazado con su extremo C terminal al segundo extremo N terminal de la parte de Fc. En una modalidad, el dominio de CL del fragmento Fab de anticuerpo CD3 se enlaza a la región de bisagra de la parte de Fc. En una modalidad, el dominio de CH1 del fragmento Fab de anticuerpo de BCMA
30 se enlaza a la región de bisagra de la parte de Fc.

Los fragmentos Fab se enlazan químicamente entre sí por el uso de un enlazante apropiado de acuerdo con el estado de la técnica.

En una modalidad, se usa un enlazante (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug; 7 (8): 1027-33 y Mack M. et al., PNAS, July 18, 1995, vol. 92). no. 15 7021-7025). "Enlazado químicamente" (o "enlazado") significa de acuerdo con la invención que los
5 fragmentos se enlazan por unión covalente. Como el enlazante es un enlazante de péptido, tal unión covalente se realiza normalmente por medios bioquímicos recombinantes, usando un ácido nucleico que codifica los dominios de VL y/o VH de los respectivos fragmentos Fab, el enlazante y, si es apropiado, la cadena de parte de Fc.

10 La invención se refiere, en una modalidad, a un anticuerpo biespecífico contra BCMA y CD3 de acuerdo con la invención, caracterizado porque el dominio variable de VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado además como "VH de CD3") comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente
15 CDR1H, CDR2H y CDR3H de cadena pesada y el dominio variable de VL de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado además como "VL de CD3") comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1L, CDR2L y CDR3L de cadena ligera.

En una modalidad, tal anticuerpo biespecífico de acuerdo con
20 la invención se caracteriza porque los dominios variables de la porción de anticuerpo anti-CD3e son de la SEQ ID NO: 7 y 8.

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza en su extremo N terminal al extremo C
25 terminal de una porción de anticuerpo anti-BCMA y los dominios variables de VL y VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En una modalidad, el dominio de VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza a un dominio de CH1 o CL de la porción
30 de anticuerpo anti-BCMA. En una modalidad, un dominio de VL de la porción de anticuerpo anti-CD3 se enlaza a un dominio de CH1 o CL de la porción de anticuerpo anti-BCMA.

Una porción de anticuerpo de acuerdo con la invención, en una modalidad, es un fragmento Fab del anticuerpo respectivo.

En una modalidad adicional de la invención, el anticuerpo biespecífico en donde los dominios variables de VL y VH en la cadena ligera y la cadena pesada respectiva de la porción de anticuerpo anti-CD3 o la porción de anticuerpo anti-BCMA se reemplazan entre sí, se caracteriza porque comprende un dominio constante de CL de la porción de anticuerpo anti-CD3 o la porción de anticuerpo anti-BCMA en donde el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante respectivo CH1, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D). En una modalidad, el anticuerpo es monovalente para la unión a CD3. En una modalidad además del remplazo de aminoácidos en la posición 124 en el dominio constante de CL, el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (llamado además "intercambio de variante de carga"). En una modalidad, el anticuerpo es monovalente para la unión a CD3 y el aminoácido 124 es K, el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E y el aminoácido 123 es R. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende además la misma porción de unión de anti-BCMA una vez más (en una modalidad un fragmento Fab). Esto significa también, que si la primera porción de unión de anti-BCMA comprende el intercambio de variante de carga, entonces la segunda porción de unión de anti-BCMA comprende el mismo intercambio de variante de carga. (Toda la numeración de aminoácidos es de acuerdo con Kabat).

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende

a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a BCMA; y

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

5 c) en donde en el dominio constante de CL de la primera cadena ligera bajo a) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde el dominio constante de CH1 de la primera cadena pesada bajo a) el
10 aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver, por ejemplo, Figuras 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico descrito en el
15 último párrafo precedente se caracteriza además porque el anticuerpo biespecífico comprende además un fragmento Fab del primer anticuerpo (nombrado adicionalmente también como "BCMA-Fab") y en el dominio constante de CL del BCMA-Fab, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o
20 histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante de CH1 del BCMA-Fab, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver, por ejemplo, Figuras 2A, 2C).

25 La invención se refiere además a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende

a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a BCMA; y

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un
30 segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí;

y en donde

c) en el dominio constante de CL de la segunda cadena ligera bajo b) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante de CH1 de la segunda cadena pesada bajo b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).

En una modalidad además del reemplazo de aminoácidos en la posición 124 en el dominio constante de CL de la primera o segunda cadena ligera, el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

En una modalidad en el dominio constante de CL, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K), en el dominio constante de CH1, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos por ácido glutámico (E). En una modalidad además en el dominio constante de CL, el aminoácido en la posición 123 está sustituido con arginina (R).

En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención consiste de un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a CD3 (también llamado además "CD3-Fab"), y un fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA de acuerdo con la invención (también llamado además "BCMA-Fab(s)") y una parte de Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab se enlazan a través de sus extremos C terminales a la región de bisagra de la parte de Fc. Ya sea el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprende una sustitución y el CD3-Fab comprende el cruce (Figuras 1A y 1B).

En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención consiste de un CD3-Fab, y un BCMA-Fab y una parte de Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab se enlazan a través de sus extremos C terminales al región de bisagra de

la parte de Fc y un segundo BCMA-Fab, que se enlaza con su extremo C terminal al extremo N terminal de CD3-Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y ya sea el CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden una sustitución (Figuras 2A y 2B). Es especialmente preferido un anticuerpo
5 biespecífico que comprende BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, en donde ambos BCMA-Fabs comprenden una sustitución aa y el CD3-Fab comprende el cruce de VL/VH (Figuras 2A). Especialmente preferido es un anticuerpo biespecífico que consiste de BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab, en donde ambos BCMA-Fab comprenden una sustitución Q124K, E123R,
10 K147E y K213E y el CD3-Fab comprende el cruce de VL/VH. Especialmente preferido es que ambos BCMA-Fab comprendan como CDR las CDR del anticuerpo 21, 22 o 42, o como VH/VL la VH/VL del anticuerpo 21, 22 o 42.

En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo
15 biespecífico de acuerdo con la invención consiste de dos BCMA-Fab y una parte de Fc, en donde un BCMA-Fab y el CD3 Fab se enlazan a través de su extremo C terminal a la región de bisagra de la parte de Fc y el segundo BCMA-Fab se enlaza con su extremo C terminal al extremo N terminal del CD3-Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y el
20 CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden una sustitución (Figuras 2A y 2B).

En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención consiste de dos BCMA-Fab y una parte de Fc, en donde los BCMA-Fab se enlazan a través de sus
25 extremos C terminales a la región de bisagra de la parte de Fc y un CD3-Fab, que se enlaza con su extremo C terminal al extremo N terminal de un BCMA-Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y ya sea el CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden una sustitución aa (Figuras 2C y 2D).

30 En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste de un CD3-Fab, que se enlazaa través de sus extremos C terminales a la región de bisagra de la

parte de Fc y un BCMA-Fab, que se enlaza con su extremo C terminal al extremo N terminal del CD3-Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y ya sea el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprenden una sustitución aa (Figuras 1A y 1B).

5 En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste de un CD3-Fab, que se enlaza a través de su extremo C terminal a la región de bisagra de la parte de Fc y un BCMA-Fab, que se enlaza con su extremo C terminal al extremo N terminal del CD3- Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y ya sea el
10 CD3-Fab o el BCMA-Fab comprenden una sustitución aa (Figuras 3A y 3B).

 En una modalidad preferida de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste de un BCMA-Fab, que se enlaza a través de su extremo C terminal a la región de bisagra de la parte de
15 Fc y un CD3-Fab, que se enlaza con su extremo C terminal al extremo N-terminal del BCMA-Fab. El CD3-Fab comprende el cruce y ya sea el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprenden una sustitución aa (Figuras 3C y 3D).

 Los fragmentos Fab se enlazan químicamente entre sí por el
20 uso de un enlazante apropiado de acuerdo con el estado de la técnica. En una modalidad, se usa un enlazante (Gly4-Ser1)₃ (Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug; 7(8): 1027-33 y Mack M. et al., PNAS, July 18, 1995, vol. 92, no. 15 7021-7025). El enlace entre dos fragmentos Fab se realiza entre las cadenas pesadas. Por lo tanto, el
25 extremo C terminal de CH1 de un primer fragmento Fab se enlaza al extremo N terminal de VH del segundo fragmento Fab (sin cruce) o a VL (cruce). El enlace entre un fragmento Fab y la parte de Fc se realiza de acuerdo con la invención como enlace entre CH1 y CH2.

 El primero y segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se
30 une específicamente a BCMA son, en una modalidad, derivados del mismo anticuerpo y en una modalidad idéntica en las secuencias de CDR, las secuencias de dominio variable de VH y VL y/o la secuencias de

dominio constante de CH1 y CL. En una modalidad, las secuencias de aminoácidos del primero y segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a BCMA son idénticas. En una modalidad, el anticuerpo de BCMA es un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR del anticuerpo 21, 22 o 42, un anticuerpo que comprende las secuencias de VH y VL del anticuerpo 21, 22 o 42, o un anticuerpo que comprende las secuencias de VH, VL, CH1 y CL del anticuerpo 21, 22 o 42.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico comprende como fragmentos Fab y parte de Fc, no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de un anticuerpo anti-BCMA y no más de una parte de Fc, en una modalidad una parte de Fc humana. En una modalidad, el segundo fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA se enlaza a través de su extremo C terminal al extremo N terminal del fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 o a la región de bisagra de la parte de Fc. En una modalidad, el enlace se realiza entre CH1 de BCMA-Fab y VL de CD3-Fab (cruce de VL/VH).

En una modalidad la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano, en una modalidad del fragmento Fab, se caracteriza porque comprende un dominio variable de VH que comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un dominio variable de VL que comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3ε (CDR MAB CD3). En una modalidad, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de la SEQ ID NO: 7 y 8 (VHVL MAB CD3).

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al dominio extracelular de BCMA humano y a CD3ε humano, caracterizado porque comprende un conjunto de cadena pesada y ligera seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos.

i) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 (2x); (conjunto 1 TCB de anticuerpo 21),

ii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, y SEQ ID NO: 54 (2x) (conjunto 2 TCB de anticuerpo 22), y

5 iii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, y SEQ ID NO: 57 (2x) (conjunto 3 TCB de anticuerpo 42).

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza porque el dominio de CH3 de una cadena pesada y el dominio de CH3 de la otra cadena pesada se encuentran
10 cada uno en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios de CH3 de anticuerpo; en donde la interfaz está alterada para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en donde la alteración se caracteriza porque:

15 a) el dominio de CH3 de una cadena pesada está alterado, de modo que dentro de la interfaz original, el dominio de CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfaz original del dominio de CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido
20 que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando así una protuberancia dentro de la interfaz del dominio de CH3 de una cadena pesada que se puede posicionar en una cavidad dentro de la interfaz del dominio de CH3 de la otra cadena pesada y

25 b) el dominio de CH3 de la otra cadena pesada está alterado, de modo que dentro de la interfaz original del segundo dominio de CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio de CH3 dentro del anticuerpo biespecífico se reemplaza un residuo de
30 aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, generando así una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio de

CH3 dentro de la cual se puede posicionar una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio de CH3.

En una modalidad, tal anticuerpo biespecífico se caracteriza porque el residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor se selecciona del grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

En una modalidad, tal anticuerpo biespecífico se caracteriza porque el residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor se selecciona del grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En una modalidad, tal anticuerpo biespecífico se caracteriza porque ambos dominios de CH3 se alteran adicionalmente por la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio de CH3.

En una modalidad, tal anticuerpo biespecífico se caracteriza porque uno de los dominios de cadena pesada constante de CH3 de ambas cadenas pesadas se reemplaza por un dominio de cadena pesada constante de CH1; y el otro dominio de cadena pesada constante de CH3 se reemplaza por un dominio de cadena ligera constante de CL.

La invención se refiere además a un anticuerpo de acuerdo con la invención, que comprende una parte de Fc modificada que induce la muerte celular de 20% o más células de una preparación de células que expresan BCMA después de 24 horas a una concentración del anticuerpo de 100 nM por ADCC con respecto a un control bajo condiciones idénticas usando el mismo anticuerpo con la parte de Fc de origen como control. Tal anticuerpo, en una modalidad, es un anticuerpo desnudo.

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo con una cantidad de fucosa de 60% o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 (ver, por ejemplo, US20120315268).

En una modalidad, la parte de Fc comprende las sustituciones de aminoácidos que se introducen en una parte de Fc humana y se describen en la SEQ ID NO: 55 y 56.

Una modalidad adicional de la invención es un receptor de
5 antígeno quimérico (CAR) de un anticuerpo anti-BCMA de acuerdo con la invención. En tal modalidad, el anticuerpo anti-BCMA consiste de un dominio de VH y VL de cadena única de un anticuerpo de acuerdo con la invención y una transmembrana de CD3-zeta y endodominio. Preferiblemente, el dominio de CD3 zeta se enlaza a través de un
10 espaciador con el extremo C terminal del dominio de VL y el extremo N terminal del dominio de VL se enlaza a través de un espaciador al extremo C terminal del dominio de VH. Los receptores de antígenos quiméricos de anticuerpos de BCMA, endodominios y dominios de transmembrana útiles, y métodos para la producción se describen, por
15 ejemplo, en Ramadoss NS. et al., J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015), Carpenter RO et al., Clin. Cancer. Res. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013), WO2015052538 y WO2013154760.

Las modalidades adicionales de la invención son los
20 anticuerpos Mab21, Mab22, Mab42, Mab27, Mab33 y Mab39 como se describe en la presente por sus secuencias de CDR, y/o secuencias de VH/VL junto con las secuencias de CL y CH1 descritas, como fragmentos de unión al antígeno, especialmente Fragmentos Fab, como anticuerpos biespecíficos que se unen a BCMA y CD3, con y sin parte de Fc, como
25 anticuerpos biespecíficos en los formatos descritos, especialmente el formato 2+1, y los anticuerpos biespecíficos con las cadenas pesada y ligera como se describe en la presente, especialmente como se describe en la tabla 1A.

Una modalidad adicional de la invención es un método de
30 generación de un anticuerpo anti-BCMA que agota, en el formato biespecífico de acuerdo con la invención, células de plasma malignas humanas en aspirados de médula ósea de mieloma múltiple MM a al menos

80% después de un tratamiento de 48 horas en una concentración de entre 10 nM y 1 fM inclusivamente, caracterizado por la selección de una biblioteca de expresión en fagos de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL) del anticuerpo 83A10 (biblioteca de VH, biblioteca de VL) con cyno BCMA 1-50 nM en 1-3 rondas y seleccionando una cadena ligera variable y una cadena pesada variable que tienen tales propiedades como tal enlazante de células T biespecífico. Preferiblemente, la selección se realiza en 3 rondas, usando cynoBCMA 50 nM para la ronda 1, cyBCMA 25 nM para la ronda 2 y cyBCMA 10 nM para la ronda 3. Preferiblemente, las bibliotecas se aleatorizan ya sea en la CDR1 y CDR2 de cadena ligera o la CDR1 y CDR2 de cadena pesada. Preferiblemente, se identifican una cadena ligera y pesada que se unen como fragmento Fab, que comprenden además la VH o VL correspondiente del anticuerpo 83A10, a huBCMA con una Kd de 50 pM a 5 nM y cyno BCMA con una Kd de 0.1 nM a 20 nM. Preferiblemente, el formato biespecífico es el formato de la fig. 2A, que comprende los respectivos dominios constantes de VL y VH del reemplazo de CD3 Fab entre sí y dentro de los intercambios de aminoácidos de BCMA Fab K213E y K147E en el dominio de CH1 y los intercambios de aminoácidos E123R y Q124K en el dominio de CL.

Una modalidad adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende las etapas de

- a) transformar una célula huésped con
- b) vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención,
- c) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de la molécula de anticuerpo; y
- d) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo.

Una modalidad adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención

que comprende las etapas de

- e) transformar una célula huésped con
- f) vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al primer objetivo
- g) vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al segundo objetivo, en donde los dominios variables de VL y VH o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí;
- h) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de la molécula de anticuerpo; y
- i) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo.

Una modalidad adicional de la invención es una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de acuerdo con la invención. Una modalidad adicional de la invención es una célula huésped que comprende vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al primer objetivo y vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al segundo objetivo, en donde los dominios variables de VL y VH o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células de plasma.

5 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de mieloma múltiple.

10 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

15 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, incluyendo un anticuerpo monoespecífico y, un anticuerpo desnudo mejorado de ADCC y, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo biespecífico para uso como un medicamento en el tratamiento del rechazo mediado por anticuerpos.

20 En una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar para el tratamiento de trastornos de células de plasma como mieloma múltiple MM u otros trastornos de células de plasma que expresan BCMA como se describe a continuación. MM es una malignidad de células de plasma caracterizada por una expansión monoclonal y acumulación de células de plasma anormales en el compartimento de la médula ósea. El MM también involucra células de plasma clonales
25 circulantes con el mismo rearrreglo del gen de IgG e hipermutación somática. MM surge de una afección premaligna asintomática llamada gammopatía monoclonal de significado desconocido (MGUS), que se caracteriza por niveles bajos de células de plasma de médula ósea y una proteína monoclonal. Las células de MM proliferan a baja
30 velocidad. El MM resulta de una aparición progresiva de múltiples cambios cromosómicos estructurales (por ejemplo, translocaciones desequilibradas). El MM implica la interacción mutua de células de

plasma malignas y microambiente de médula ósea (por ejemplo, células estromales de médula ósea normales). Los signos clínicos del MM activo incluyen pico de anticuerpo monoclonal, células de plasma que superpueblan la médula ósea, lesiones óseas líticas y destrucción ósea como resultado de la sobreestimulación de los osteoclastos (Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Otro trastorno de células de plasma que involucra células de plasma, es decir, que expresa BCMA, es el lupus eritematoso sistémico (SLE), también conocido como lupus. El SLE es una enfermedad sistémica y autoinmune que puede afectar cualquier parte del cuerpo y se representa con el sistema inmune atacando las propias células y tejidos del cuerpo, lo que resulta en inflamación crónica y daño del tejido. Es una reacción de hipersensibilidad de Tipo III en la cual los complejos inmunes de anticuerpos precipitan y causan una respuesta inmune adicional (Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337). Los trastornos de células de plasma adicionales son leucemia de células de plasma y AL-amiloidosis (ver también los Ejemplos 19 y 20). En todos estos trastornos de células de plasma se espera que la depleción de células de plasma/células de plasma malignas por anticuerpos de acuerdo con esta invención sea beneficiosa para los pacientes que sufren de tal enfermedad.

Una modalidad adicional de esta invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento del rechazo de aloinjerto mediado por anticuerpos que implica células de plasma y aloanticuerpos que incluyen rechazo mediado por anticuerpos (AMR) agudo y crónico. El AMR agudo se caracteriza por una disfunción del injerto que se produce a lo largo de los días y es el resultado de anticuerpos específicos de donantes preformados o de novo desarrollados después del trasplante. Ocurre en aproximadamente 5-7% de todos los trasplantes renales y causa 20-48% de los episodios de rechazo agudo entre los pacientes con compatibilidad cruzada positiva pre-sensibilizados (Colvin and Smith, Nature Rev Immunol 2005; 5

(10): 807-817). La histopatología en pacientes con AMR agudo a menudo revela hinchazón de células endoteliales, infiltración neutrofílica de capilares peritubulares y glomerulos, trombos de fibrina, edema intersticial y hemorragia (Trpkov et al., Transplantation 1996; 61 (11): 1586-1592). El AMR se puede identificar con tinción de C4d u otros métodos mejorados de detección de anticuerpos en biopsias de aloinjerto. Otra forma de AMR también se conoce como lesión de aloinjerto crónica, que también involucra anticuerpos específicos del donante pero se manifiesta en meses e incluso años después del trasplante. Se ve como la glomerulopatía de trasplante (también conocida como glomerulopatía de aloinjerto crónica) en biopsias de riñón y se caracteriza por expansión mesangial glomerular y duplicado de membrana basal capilar (Regele et al., J Am Soc Nephrol 2002; 13 (9): 2371-2380). Las manifestaciones clínicas varían desde pacientes que son asintomáticos en las etapas tempranas hasta tener proteinuria de rango nefrótico, hipertensión y disfunción de aloinjerto en las etapas avanzadas. La progresión de la enfermedad puede ser bastante rápida, especialmente con el AMR agudo en curso, que da como resultado una falla del injerto en unos meses (Fotheringham et al. Nephron-Clin Pract 2009; 113 (1): c1-c7). La prevalencia de la glomerulopatía de trasplante en biopsias de pacientes varía entre 5% en 1 año a 20% en 5 años (Cosio et al. Am J Transplant 2008; 8: 292-296).

Una modalidad adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo desnudo o un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para uso como un medicamento.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención con una función efectora aumentada para uso como un medicamento.

5 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención con una función efectora disminuida para uso como un medicamento.

Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención como anticuerpo biespecífico para uso como un medicamento.

10 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención como anticuerpo multiespecífico para uso como un medicamento.

15 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención como conjugado con un agente terapéutico (conjugado de fármaco), por ejemplo, con un agente citotóxico o marca radioactiva para uso como un medicamento.

20 Una modalidad adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención como un diacuerpo para uso como un medicamento.

25 En una modalidad el anticuerpo de acuerdo con la invención, en especial al tratarse de un anticuerpo biespecífico contra CD3 y BCMA, se administra una vez o dos veces a la semana en una modalidad a través de la administración subcutánea (por ejemplo, en una modalidad en el rango de dosis de 0.1 a 2.5, preferiblemente a 25 mg/m²/semana, preferiblemente a 25 0 mg/m²/semana). Debido a las actividades de citotoxicidad superiores del anticuerpo de acuerdo con la invención, puede administrarse al menos a la misma magnitud del rango de dosis clínica (o incluso menor) en comparación con
30 anticuerpos monoespecíficos convencionales o anticuerpos biespecíficos convencionales que no son biespecíficos de células T (es decir, no se unen a CD3 en un grupo). Se prevé que para un

anticuerpo de acuerdo con la invención, es preferida la administración subcutánea en entornos clínicos (por ejemplo, en el rango de dosis de 0.1 - 250 mg/m²/semana). Además, en pacientes con niveles elevados de APRIL y BAFF en suero (por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple) puede no ser necesario aumentar la dosis de un anticuerpo de acuerdo con esta invención ya que puede no verse afectada por la competición de ligandos. Por el contrario, las dosis de otros anticuerpos anti-BCMA bloqueadores/competidores de ligandos pueden necesitar aumentarse en esos pacientes. Otra ventaja del anticuerpo de acuerdo con la invención es una vida media de eliminación de aproximadamente 4 a 12 días que permite la administración al menos una o dos veces por semana.

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención, en el caso de anticuerpos monoespecíficos mejorados de ADCC desnudos/no conjugados es un anticuerpo con propiedades que permiten el tratamiento una vez/dos veces por semana por ruta intravenosa pero preferiblemente a través de la administración subcutánea (por ejemplo, una dosificación en el rango de 200-2000 mg/m/semana durante 4 semanas). Se prevé que para un anticuerpo de acuerdo con la invención, la administración subcutánea es posible y preferida en los entornos clínicos (por ejemplo, en el rango de dosis de 200-2000 mg/m²/semana, dependiendo de las indicaciones de la enfermedad). Además, en pacientes con niveles elevados de APRIL y BAFF en suero (por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple) puede no ser necesario aumentar la dosis de un anticuerpo de acuerdo con esta invención (por ejemplo anticuerpo bloqueador/competidor no de ligandos) ya que puede no ser afectada por la competición de ligandos. Por el contrario, las dosis de otros anticuerpos anti-BCMA bloqueadores/competidores de ligandos pueden necesitar aumentarse en esos pacientes, haciendo a la administración subcutánea técnicamente más desafiante (por ejemplo, farmacéutica). Otra ventaja del anticuerpo de acuerdo con la invención se basa en la inclusión de una porción de Fc, que está

asociada con una vida media de eliminación de 4 a 12 días y permite la administración al menos una o dos veces por semana.

Una modalidad preferida adicional de la invención es una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Anticuerpos bivalentes biespecíficos que comprenden solamente los fragmentos Fab (específicos para CD3 y BCMA) y la parte de Fc como se especifica: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE). sustituciones aa de RK/EE introducidas en CL-CH1 para reducir el mal emparejamiento de LC/productos secundarios en la producción. El Fab CD3 incluye un cruce de VL-VH para reducir el mal emparejamiento de LC y productos secundarios.

Figura 2. Anticuerpos trivalentes biespecíficos preferidos que comprenden solamente los fragmentos Fab (específicos para CD3 y BCMA) y la parte de Fc como se especifica: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3 (RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). sustituciones aa de RK/EE introducidas en CL-CH1 para reducir el mal emparejamiento de LC/productos secundarios en la producción. Preferiblemente, el Fab CD3 incluye un cruce de VL-VH para reducir el mal emparejamiento de LC y productos secundarios. Preferiblemente, Fab CD3 y Fab BCMA se enlazan entre sí con enlazantes flexibles.

Figura 3. Anticuerpos bivalentes biespecíficos que comprenden solamente los fragmentos Fab (específicos para CD3 y BCMA) y la parte de Fc como se especifica: (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). Preferiblemente, el Fab CD3 incluye un cruce de VL-VH para reducir el mal emparejamiento de LC y productos

secundarios. Fab CD3 y Fab BCMA se enlazan entre sí con enlaces flexibles.

Figura 4. Lisis de células T redirigidas de células H929 de MM inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por liberación de LDH. Curvas de respuesta de concentración de lisis de células H929 de MM inducida por 21-TCBcv (círculo cerrado), 22-TCBcv (triángulo cerrado), 42-TCBcv (cuadrado cerrado) en comparación con 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Hubo una matanza dependiente de la concentración de células H929 para todos los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 mientras que no se observó matanza con TCB de control. Los experimentos se realizaron con donante 1 (A), donante 3 (B), donante 4 (C), donante 5 (D) de PBMC utilizando una relación de célula efectora a célula objetivo de tumor (E:T) de 10 PBMC a 1 célula de MM (ver el ejemplo 8).

Figura 5. Lisis de células T redirigidas de células L363 de MM inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, medida por liberación de LDH. Curvas de respuesta de concentración de lisis de células L363 de MM inducida por 21-TCBcv (círculo cerrado), 22-TCBcv (triángulo cerrado), 42-TCBcv (cuadrado cerrado) en comparación con 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Se observó una matanza dependiente de la concentración de células L363 de todos los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 mientras que no se observó matanza con TCB de control. Los experimentos se realizaron con Donante 1 (A), donante 2 (B), donante 3 (C), donante 4 (D), donante 5 (E) de PMBC utilizando una relación E:T de 10 PBMC a 1 célula de MM (ver ejemplo 9).

Figura 6. Lisis de células T redirigidas de células RPMI-8226 de MM inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de acuerdo medida por liberación de LDH. Curvas de respuesta de concentración de lisis de células RPMI-8226 de MM inducida por 21-TCBcv (círculo cerrado), 22-TCBcv (triángulo

cerrado), 42-TCBcv (cuadrado cerrado) en comparación con 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Se observó una matanza dependiente de la concentración de células RPMI-8226 de todos los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 mientras
 5 que no se observó matanza con TCB de control. Los experimentos se realizaron con donante 2 (A), donante 3 (B), donante 4 (C), donante 5 (D) de PBMC usando una relación E:T de 10 PBMC a 1 célula de MM (ver ejemplo 10).

Figura 7. Lisis de células T redirigidas de células JJN-3 de
 10 MM inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, medida por citometría de flujo. Matanza dependiente de la concentración de células JJN-3 de MM por 22-TCBcv (triángulo cerrado), 42-TCBcv (cuadrado cerrado) en comparación con 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos).
 15 Se determinaron y graficaron el porcentaje de células JJN-3 positivas a anexina-V (A, C) y lisis de células de tumor (B, D). El porcentaje de lisis de células JJN-3 inducida por una concentración específica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 se determinó de la siguiente manera: el
 20 recuento absoluto de células JJN-3 negativas a anexina-V a una concentración de TCB dada y restándolo del recuento absoluto de células JJN-3 anexina-V sin TCB; dividido por el recuento absoluto de células JJN-3 negativas a anexina-V sin TCB. Se desarrollaron experimentos con donantes 2PBMC; donante 1 (A,B) y
 25 donante 2 (C,D) usando un radio E:T de 10 PBMC a una célula de 1 MM (ver ejemplo 11).

Figura 8. Lisis de células T redirigidas de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple en la presencia de células T infiltrantes de médula ósea autólogas
 30 (aspirados de médula ósea entera del paciente) inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, medida por citometría de flujo de multiparámetros. El porcentaje de células de

plasma de mieloma positivas a anexina-V se determinó y graficó contra las concentraciones de TCB. Se observó lisis específica y dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma de pacientes, mientras que la lisis de células T, células B y células NK no se observó con base en un panel de multiparámetros de 8 colores. No hay inducción de muerte celular de células de plasma de mieloma con TCB de control a la concentración más alta de anticuerpos TCB probados. En comparación con 83A10-TCBcv (A), 42-TCBcv (B) y 22-TCBcv (C) fueron más potentes para inducir la matanza de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes (ver ejemplo 13).

Figura 9. Lisis de células T redirigidas de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple en la presencia de células T infiltrantes de médula ósea autólogas (aspirados de médula ósea completa del paciente) inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo. El porcentaje de células de plasma de mieloma negativas anexina-V se determinó y se graficó contra las concentraciones de TCB. Se observó lisis específica y dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma de pacientes, mientras que no se observó lisis de células de médula ósea no malignas (datos no mostrados). No se observó inducción de muerte celular de células de plasma de mieloma con TCB de control a la concentración más alta de anticuerpos TCB probados (datos no mostrados). En comparación con 83A10-TCBcv, 42-TCBcv y 22-TCBcv fueron más potentes para inducir la muerte de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes como se refleja por la reducción dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma viables (negativas a anexina-V). Experimentos representativos en el paciente 001 (A) y paciente 007 (B) (ver ejemplo 13).

Figura 10. Lisis de células T redirigidas de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple en la presencia de células T infiltrantes de médula ósea autólogas

inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, medida por citometría de flujo. El porcentaje de células de plasma de mieloma negativas a yoduro de propidio se determinó y el porcentaje de células de plasma de médula ósea viables en relación con respecto al control de medio (MC) se graficó contra las concentraciones de TCB. Se observó lisis específica y dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma de pacientes (A-G), mientras que no se observó lisis del microambiente de médula ósea (BMME) (H). No se observó inducción de la muerte celular de células de plasma de mieloma con TCB de control a la concentración más alta de anticuerpos TCB probados. En comparación con 83A10-TCBcv, 42-TCBcv y 22-TCBcv fueron más potentes para inducir la matanza de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes como se refleja por la reducción dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma viables (negativas a yoduro de propidio). Un efecto se consideró estadísticamente significativo si el valor P de su prueba estadística correspondiente fue $< 5\%$ (*), $< 1\%$ (**) o $< 0.1\%$ (***). Experimentos realizados usando muestras de aspirado de médula ósea recolectadas del paciente 1 (A), paciente 2 (B), paciente 3 (C), paciente 4 (D), paciente 5 (E), paciente 6 (F) y paciente 7 (G, H) (ver ejemplo 13).

Figura 11. Activación de células T de médula ósea de pacientes con mieloma en la presencia de células de plasma de médula ósea (aspirados de médula ósea completa de pacientes) inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, medida por citometría de flujo de multiparámetros (panel de tinción de 8 colores). La magnitud de la activación de células T se comparó entre 83A10-TCBcv (A), 42-TCBcv (B) y 22-TCBcv (C) (ver ejemplo 14).

Figura 12. Concentraciones de 83A10-TCBcv medidas de muestras de suero (símbolos cerrados con líneas completas) y muestras de médula ósea (símbolos abiertos con líneas de puntos) después de inyección intravenosa única (IV) en monos cynomolgus con 0.003, 0.03

y 0.1 mg/kg de 83A10-TCBcv. La recolección de muestras de suero se realizó antes de la dosis y 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de médula ósea se recolectaron antes de la dosis, y 96 y 336 h después de la dosificación (ver ejemplo 16).

Figura 13. Redistribución de células T periféricas observada en monos cynomolgus después de una inyección IV única de 83A10-TCBcv (0.003, 0.03 y 0.3 mg/kg). Los animales A y B, C y D, y E y F respectivamente recibieron una inyección IV de 0.003, 0.03 y 0.3 mg/kg de 83A10-TCBcv. Los recuentos de células T de sangre absolutos (células CD2+ por μ l de sangre) se graficaron contra al tiempo posterior al tratamiento (ver ejemplo 16).

Figura 14. Reducción de células de plasma de sangre observada en monos cynomolgus después de una inyección IV única de 83A10-TCBcv (0.3 mg/kg), medida por citometría de flujo de multiparámetros. Las células de plasma (PC) se identificaron con base en un panel de tinción de 6 colores y los porcentajes de PC sobre linfocitos se midieron y se graficaron en gráficas de contorno (A). La cinética de depleción de células de plasma de sangre después del tratamiento con 0.3 mg/kg de 83A10-TCBcv en monos cynomolgus se graficó (B) (ver ejemplo 16).

Figura 15. Actividad antitumoral inducida por anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv en el modelo de xenoinjerto de mieloma humano H929 usando ratones NOG humanizados con PBMC. NOD/Shi-scid IL2rgamma(nulo) (NOG) inmunodeficientes recibieron en el día 0 (d0) células H929 de mieloma múltiple humano como una inyección subcutánea (SC) en el flanco dorsal derecho. El día 15 (d15), los ratones NOG recibieron una inyección intraperitoneal (IP) única de PBMC humanas. Los ratones luego se aleatorizaron cuidadosamente en los diferentes grupos de tratamiento y control (n = 9/grupo) y se realizó una prueba estadística para evaluar la homogeneidad entre los grupos. Los grupos experimentales

fueron el grupo no tratado con control, grupo tratado con TCB de control, grupo tratado con 2.6 nM/kg de 83A10-TCBcv y grupo tratado con 2.6 nM/kg de BCMA50-BiTE® (BCMAxCD3 (scFv)₂). El tratamiento con anticuerpo administrado por inyección en la vena de la cola comenzó el día 19 (d19), es decir, 19 días después de la inyección SC de células de tumor H929. El programa de tratamiento con anticuerpo de TCB consistió en una administración IV una vez a la semana por hasta 3 semanas (es decir, un total de 3 inyecciones de anticuerpo de TCB). El volumen de tumor (TV) se midió por calibrador durante el estudio y el progreso se evaluó por comparación intergrupala de TV. TV (mm³) se graficó contra el día posterior a la inyección del tumor. En d19, primer día de tratamiento, el volumen de tumor medio había alcanzado 300 ± 161 mm³ para el grupo de control tratado con vehículo (A), 315 ± 148 mm³ para el grupo (A) tratado con 2.6 nM/kg de TCB de control, 293 ± 135 mm³ para el grupo (B) con 2.6 nM/kg de 83A10-TCBcv y 307 ± 138 mm³ para el grupo (C) con 2.6 nM/kg de BCMA50-BiTE®. El TV de cada ratón individual por grupo experimental se graficó contra el día después de la inyección de tumor: (A) grupos de control que incluyen control de vehículo (línea completa) y TCB de control (línea de puntos), (B) grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) y (C) BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg). Las flechas negras muestran el tratamiento con TCB administrado por inyección IV. En el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg), 6 de 9 ratones (67%) experimentaron una regresión de tumor incluso por debajo del TV registrado en d19, es decir, el primer tratamiento de TCB y la regresión de tumor se mantuvo hasta la finalización del estudio. Los 3 ratones en el grupo tratado con 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) que no mostraron regresión de tumor tuvieron su TV igual a 376, 402 y 522 mm³ respectivamente en d19. Por el contrario, ninguno de los 9 ratones (0%) tratados con una dosis equimolar de BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg) en un programa de una vez a la semana durante 3 semanas tuvo regresión de tumor en cualquier punto de tiempo (ver ejemplo 17).

Figura 16. Porcentaje de crecimiento de tumor (TG) calculado para d19 a d43 y comparado entre el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) y BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg). El porcentaje de crecimiento de tumor definido como TG (%) se determinó calculando $TG (\%) = 100 \times (TV \text{ mediana del grupo analizado}) / (TV \text{ mediana de grupo tratado con vehículo de control})$. Por razones éticas, los ratones fueron sacrificados cuando el TV alcanzó al menos 2000 mm³. El TG (%) se redujo consistente y significativamente en el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) así como el TG (%) siempre fue menor en comparación con BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg) (ver ejemplo 17).

Figura 17. Resonancia de plasmón superficial (SPR) de 70 clones seleccionados de ELISA. Todos los experimentos se realizaron a 25°C utilizando PBST como amortiguador de corrida (PBS 10 mM, pH 7.4 y 0.005% (v/v) Tween®20) con un biosensor ProteOn XPR36 equipado con chips de sensores de GLC y GLM y reactivos de acoplamiento. Las inmovilizaciones se realizaron a 30 µl/min en un chip de GLM. pAB (cabra) IgG anti hu, Ab específico de F(ab)2 (Jackson) se acopló en dirección vertical usando un procedimiento de acoplamiento de amina estándar: todos los seis canales de ligando se activaron durante 5 min con una mezcla de EDC (200 mM) y sulfo-NHS (50 mM). Inmediatamente después de que se activaron las superficies, se inyectó pAb (cabra) IgG anti hu, anticuerpo específico de F(ab)2 (50 µg/ml, acetato de sodio 10 mM, pH 5) a través de todos los seis canales durante 5 minutos. Finalmente, los canales se bloquearon con una inyección de 5 min de etanolamina-HCl 1 M (pH 8.5). Los niveles de inmovilización finales fueron similares en todos los canales, variando desde 11000 a 11500 RU. Las variantes de Fab se capturaron de sobrenadantes de e. coli por inyección simultánea a lo largo de cinco de los canales horizontales completos separados (30 µl/min) durante 5 min y dieron como resultado niveles, que variaron desde 200 a 900 RU, dependiendo de la concentración de Fab en el sobrenadante; se inyectó medio acondicionado a lo largo del sexto canal para

proporcionar un blanco 'en línea' para propósitos de doble referencia. Las mediciones cinéticas de un solamente disparo se realizaron por inyección de una serie de diluciones de BCMA humanos y cyno (50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0 nM, 50 µl/min) durante 3 minutos a lo largo de los canales verticales. La disociación se monitoreó durante 5 min. Los datos cinéticos se analizaron en ProteOn Manager v. 2.1. El procesamiento de los datos de punto de reacción implicó la aplicación de una referencia de interpuntos y una etapa de doble referencia utilizando una solución testigo amortiguadora en línea (Myszka, 1999). Los datos procesados de las inyecciones de un disparo repetidas se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 simple sin transporte de masas (O'Shannessy et al., 1993).

Figura 18. Afinidad de unión de los anticuerpos de BCMA en células HEK-huBCMA como se mide por citometría de flujo. Los anticuerpos anti-BCMA se usaron como primer anticuerpo y luego se utilizó un Fc anti-humano marcado con PE secundario como anticuerpo de detección. Se descubrió que la unión de anticuerpos Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 y Mab 42 a huBCMA en células HEK no fue significativamente mejor que la unión de Mab 83A10 a células huBCMA-HEK.

Figura 19. Concentraciones de 42-TCBcv medidas en suero y médula ósea después de una inyección IV o SC única en monos cynomolgus. Los animales recibieron una inyección IV o SC única de 42-TCBcv) y las muestras de sangre por punto de tiempo se recolectaron a través de la vena periférica para evaluaciones PK antes de la dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se dejaron coagular en tubos para la separación de suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó. El suero resultante se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis posterior. Las muestras de médula ósea para evaluaciones PK también se recolectaron en el fémur bajo anestesia/tratamiento analgésico antes de la dosis,

96 y 336 h después de la dosificación. Las muestras de médula ósea se dejaron coagular en tubos para separación de suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó. La médula ósea resultante se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis posterior. El análisis y evaluación de los datos PK se realizaron. El análisis estándar no compartimental se realizó utilizando el paquete Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, EUA) o el sistema Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, EUA). Rango de concentración efectiva de 42-TCBcv en aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple correspondiente de 10 pm a 10 nM (área gris). Las concentraciones entre paréntesis están en nM.

Figura 20. Lisis de células T redirigidas de células de leucemia de médula ósea de pacientes con leucemia de células de plasma en la presencia de células T autólogas o células T infiltrantes de médula ósea inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo. El porcentaje de células de plasma de mieloma negativas a yoduro de propidio se determinó y el porcentaje de células leucémicas de células de plasma de médula ósea viables en relación con el control de medio (MC) se graficó contra las concentraciones de TCB. Se observó lisis específica y dependiente de la concentración de las células leucémicas de células de plasma de pacientes (A, B), mientras que no se observó lisis del microambiente de médula ósea (BMME) (datos no mostrados). No se observó inducción de la muerte celular de células de plasma de mieloma con TCB de control a la concentración más alta de anticuerpos TCB probados. 42-TCBcv fue muy potente para inducir la matanza de células leucémicas de células de plasma de médula ósea de pacientes como se refleja en la reducción dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma viables (yoduro de propidio). Un efecto se consideró estadísticamente significativo si el valor P de su prueba estadística correspondiente fue $< 5\%$ (*), $< 1\%$ (**) o $< 0.1\%$ (***). La figura muestra los resultados obtenidos

de las muestras de médula ósea del paciente 1(A) y paciente 2(B) (ver también ejemplo 20).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 El término "BCMA, el BCMA objetivo, BCMA humano" como se usa en la presente se refiere al antígeno de maduración de células B humanas, también conocido como BCMA; TR17_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), que es un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis de tumor que se expresa preferentemente en células de plasma
10 diferenciadas. El dominio extracelular de BCMA consiste de acuerdo con UniProt de aminoácidos 1-54 (o 5-51). El término "anticuerpo contra BCMA, anticuerpo anti-BCMA" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo específicamente unido al dominio extracelular de BCMA.

15 "Que se une específicamente a BCMA o se une a BCMA" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al BCMA objetivo con afinidad suficiente de manera que el anticuerpo es útil como agente terapéutico en BCMA objetivo. En algunas modalidades, el grado de unión de un anticuerpo anti-BCMA a una proteína no de BCMA no
20 relacionada es aproximadamente 10 veces preferiblemente > 100 veces menor que la unión del anticuerpo a BCMA medida, por ejemplo, por resonancia de plasmón superficial (SPR) por ejemplo, Biacore®, inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o citometría de flujo (FACS). En una modalidad, el anticuerpo que se une a BCMA tiene una
25 constante de disociación (Kd) de 10^{-8} M o menos, preferiblemente desde 10^{-8} M a 10^{-13} M, preferiblemente desde 10^{-9} M a 10^{-13} M. En una modalidad, el anticuerpo anti-BCMA se une a un epítipo de BCMA que se conserva entre BCMA de diferentes especies, preferiblemente entre humano y cynomolgus, y además preferiblemente también a BCMA de ratón
30 y rata. "Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 y BCMA, anticuerpo biespecífico contra CD3 y BCMA" se refiere a una definición respectiva para unirse a ambos objetivos. Un anticuerpo

que se une específicamente a BCMA (o BCMA y CD3) no se une a otros antígenos humanos. Por lo tanto, en un ELISA, los valores de OD para tales objetivos no relacionados serán iguales o menores a los del límite de detección del ensayo específico, preferiblemente > 0.3 ng/ml, o igual o menor a los valores de OD de muestras de control sin BCMA unido a la placa o con células HEK293 no transfectadas.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-BCMA se une específicamente a un grupo de BCMA, que consiste de BCMA humano y BCMA de origen no mamífero humano, preferiblemente BCMA de cynomolgus, ratón y/o rata. "Abertura cyno/humana" se refiere a la relación de afinidad KD de BCMA cynomolgus [M]/KD de BCMA humano [M] (detalles ver ejemplo 3). "Abertura cyno/humana de Mab CD3" como se usa en la presente se refiere a la relación de afinidad KD de CD3 cynomolgus [M]/KD de CD3 humano [M]. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/anti-CD3 de la invención muestra una abertura cyno/humana de Mab CD3 entre 1.25 y 5 o entre 0.8 y 1.0. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza, en una modalidad, porque también se une específicamente a CD3 cynomolgus. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/anti-CD3 de la invención muestra una abertura cyno/humana de Mab CD3 entre 1.25 y 5 o entre 0.8 y 1.0. Preferiblemente, la abertura cyno/humana está en el mismo rango para el anticuerpo anti-BCMA y anti-CD3.

El término "APRIL", como se usa en la presente, se refiere a APRIL murino recombinante truncado (aminoácidos 106-241; NP_076006). APRIL puede producirse como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18).

El término "BAFF" como se usa en la presente se refiere a BAFF humano truncado recombinante (UniProt Q9Y275 (TN13B_HUMAN) que se puede producir como se describe en Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Preferiblemente un BAFF marcado con His se usa de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el BAFF marcado con His se

produce clonando un fragmento de ADN que codifica residuos de BAFF 82-285 en un vector de expresión, creando una fusión con una marca de His de extremo N terminal seguido de un sitio de escisión de trombina, expresando el vector y escindiendo la proteína recuperada con trombina.

Los anticuerpos anti-BCMA se analizaron por ELISA para la unión a BCMA humano usando BCMA unido a la placa. Para este ensayo, una cantidad de BCMA unido a la placa preferiblemente 1.5 µg/ml y se utilizaron concentraciones que variaron desde 0.1 p M a 200 nM de anticuerpo anti-BCMA.

El término "NF-κB" como se usa en la presente se refiere a NF-κB p50 recombinante (número de acceso P19838). La actividad de NF-κB puede medirse por un ELISA de unión a ADN de un extracto de células NCI-H929 de MM (CRL-9068™). Las células NCI-H929 de MM, no tratadas o tratadas con 0.1 µg/ml de TNF-α, 1000 n g/mL de BAFF truncado con HT tratado con calor, 1000 ng/mL de BAFF truncado, control de isotipo 0.1 pM a 200 nM, y con o sin anticuerpos anti-BCMA 0.1 pM a 200 nM se incuban durante 20 min. La actividad de NF-κB se puede someter a ensayo usando un ELISA funcional que detecta la señal quimioluminiscente de p65 unido a la secuencia de consenso de NF-κB (US6150090).

El término "objetivo adicional" como se usa en la presente significa preferiblemente CD3ε. El término "primer objetivo y segundo objetivo" significa ya sea CD3 como primer objetivo y BCMA como segundo objetivo o significa BCMA como primer objetivo y CD3 como segundo objetivo.

El término "CD3ε o CD3" como se usa en la presente se refiere a CD3ε humano descrito bajo UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3ε, anticuerpo anti-CD3ε" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD3ε. En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio variable de VH que comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente

CDR1H, CDR2H y CDR3H de cadena pesada y un dominio variable de VL que comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1L, CDR2L y CDR3L de cadena ligera. En una modalidad, el anticuerpo comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 7 (VH) y SEQ ID NO: 8 (VL).

El término "anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo consiste de dos pares de una "cadena ligera" (LC) y una "cadena pesada" (HC) (tales pares de cadena ligera (LC)/cadena pesada se abrevian en la presente como LC/HC). Las cadenas ligeras y cadenas pesadas de tales anticuerpos son polipéptidos que consisten de varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpos IgA, IgD e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4 (clases de anticuerpos IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera de VL y un dominio constante de cadena ligera de CL. Los dominios variables de VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, arregladas desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un objetivo, pero exhiben diversas funciones efectoras. El término "anticuerpo" como se usa en la presente se refiere también a la porción de un anticuerpo que se necesita al menos para la unión específica al antígeno CD3 resp. de BCMA. Por lo tanto tal anticuerpo (o porción de anticuerpo) puede

ser, en una modalidad, un fragmento Fab, si la porción de anticuerpo está comprendida de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede ser un Fab', $F(ab')_2$, un scFv, un di-scFv, o un acoplador de células T bi-específico (BiTE).

El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente modificados (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que se retengan sus propiedades características. Son especialmente preferidos los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos humanos o humanizados recombinantes. Las modalidades adicionales son anticuerpos heteroespecíficos (biespecíficos, triespecíficos, etc.) y otros conjugados, por ejemplo, con moléculas pequeñas citotóxicas.

El término "anticuerpo biespecífico" como se usa en la presente, se refiere, en una modalidad, a un anticuerpo en donde uno de los dos pares de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC) se unen específicamente a CD3 y el otro se une específicamente a BCMA. El término también se refiere a otros formatos de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con el estado de la técnica, en una modalidad a anticuerpos de cadena única biespecíficos.

El término "TCB", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y CD3. El término "83A10-TCBcv" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y CD3 como se especifica por su combinación de cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 (2x), y SEQ ID NO: 48, y como se muestra en la figura 2A y se describe en EP14179705. Los términos "21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv" como se usan en la presente se refieren a los anticuerpos biespecíficos respectivos de Mab21, como se especifica por su combinación de cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 (2x), Mab 22

como se especifica por sus combinaciones de cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, y SEQ ID NO: 54 (2x), y Mab42 como se especifica por su combinación de cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 48 de la SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, y SEQ ID NO: 57-(2x).

El término "anticuerpo desnudo", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a BCMA, que comprende una parte de Fc y no está conjugado con un agente terapéutico, por ejemplo con un agente citotóxico o marca radioactiva. El término "anticuerpo conjugado, conjugado de fármaco", como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a BCMA, y está conjugado con un agente terapéutico, por ejemplo, con un agente citotóxico o marca radioactiva.

El término "anticuerpo de cadena única biespecífico" como se usa en la presente se refiere a una cadena de polipéptido única que comprende, en una modalidad, dos dominios de unión, uno que se une específicamente a BCMA y el otra, en una modalidad, que se une específicamente a CD3. Cada dominio de unión comprende una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región de VH"), donde la región de VH del primer dominio de unión se une específicamente a la molécula de CD3, y la región de VH del segundo dominio de unión se une específicamente a BCMA. Los dos dominios de unión se enlazan opcionalmente entre sí por un espaciador de polipéptido corto. Un ejemplo no limitante de un espaciador de polipéptido es Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) y repeticiones del mismo. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpo ("región de VL"), la región de VH y la región de VL dentro de cada uno de los primero y segundo dominios de unión se enlazan entre sí a través de un enlazante de polipéptido, suficientemente largo para permitir que la región de VH y región de VL del primer dominio de unión y la región de VH y región de VL del segundo dominio de unión se emparejan entre sí de manera que, juntas,

son capaces de unirse específicamente a los primero y segundo dominios de unión respectivos (ver, por ejemplo, EP0623679). Los anticuerpos de cadena única biespecíficos también se mencionan, por ejemplo, en Choi BD et al., Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul; 11 (7): 843-53 y Wolf E. et al., Drug Discov Today. 2005 Sep 15; 10 (18): 1237-44.

El término "diacuerpo" como se usa en la presente se refiere a un pequeño fragmento de anticuerpo bivalente y biespecífico que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL) conectada por un enlazante de péptido que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena (Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772). Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y promueve el montaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión al antígeno funcionales. Para construir diacuerpos biespecíficos de la invención, los dominios V de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-BCMA se fusionan para crear las dos cadenas VH(CD3)-VL (BCMA), VH(BCMA)-VL(CD3). Cada cadena por sí sola no puede unirse al antígeno respectivo, pero recrea los sitios de unión al antígeno funcionales del anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti-BCMA en el emparejamiento con la otra cadena. Las dos moléculas de scFv, con un enlazante entre el dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera que es demasiado corto para la dimerización intramolecular, se co-expresan y autoensamblan para formar moléculas biespecíficas con los dos sitios de unión en los extremos opuestos. A modo de ejemplo, las regiones variables que codifican los dominios de unión para BCMA y CD3, respectivamente, pueden amplificarse por PCR de constructos de ADN obtenidos como se describe, de manera que pueden clonarse en un vector como pHOG, como se describe en Kipriyanov et al., J. Immunol, Methods, 200, 69-77 (1997a). Los dos constructos de scFV luego se combinan en un vector

de expresión en la orientación deseada, por lo que el enlazante de VH-VL se acorta para evitar el retroplegamiento de las cadenas sobre sí mismas. Los segmentos de ADN están separados por un codón de DETENCIÓN y un sitio de unión al ribosoma (RBS). El RBS permite la transcripción del ARNm como un mensaje bicistrónico, que se traduce por ribosomas en dos proteínas que interactúan de forma no covalente para formar la molécula de diacuerpo. Los diacuerpos, como otros fragmentos de anticuerpo, tienen la ventaja que se pueden expresar en bacterias (*E. coli*) y levadura (*Pichia pastoris*) en forma funcional y con altos rendimientos (hasta Ig/1).

El término "scFv en tándem" como se usa en la presente, se refiere a una molécula de Fv de cadena única (es decir, una molécula formada por asociación de los dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, VH y VL, respectivamente) como se describe, por ejemplo, en WO 03/025018 y WO 03/048209. Tales moléculas de Fv, que se conocen como TandAbs® comprenden cuatro dominios variables de anticuerpo, en donde (i) cualquiera de los dos primeros o los dos últimos dominios variables se unen intramolecularmente entre sí dentro de la misma cadena formando un a scFv de unión al antígeno en la orientación VH/VL o VL/VH (ii), los otros dos dominios se unen intermolecularmente con los correspondientes dominios de VH o VL de otra cadena para formar pares de VH/VL de unión al antígeno. En una modalidad preferida, como se menciona en WO 03/025018, los monómeros de tal molécula de Fv comprenden al menos cuatro dominios variables de los cuales dos dominios cercanos de un monómero forman una unidad de scFv de VH-VL o VL-VH de unión al antígeno.

El término "DARPin" como se usa en la presente, se refiere a una molécula de repetición de anquirina biespecífica como se describe, por ejemplo, en US 2009082274. Estas moléculas se derivan de proteínas anquirina naturales, que se pueden encontrar en el genoma humano y son uno de los tipos más abundantes de proteínas de

unión. Un módulo de biblioteca DARPin se define por las secuencias de proteína de repetición de anquirina naturales, usando 229 repeticiones de anquirina para el diseño inicial y otras 2200 para el refinamiento posterior. Los módulos sirven como bloques de construcción para las bibliotecas DARPin. Los módulos de biblioteca se parecen a las secuencias del genoma humano. Una DARPin se compone de 4 a 6 módulos. Porque cada módulo es de aproximadamente 3.5 kDa, el tamaño de una DARPin promedio es 16-21 kDa. La selección de los enlazantes se realiza por expresión en ribosoma, que está completamente libre de células y se describe en He M and Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, Nov; 35 (Pt 5): 962-5.

El término "acoplador biespecífico de células T" son proteínas de fusión que consisten de dos fragmentos variables de cadena única (scFv) de diferentes anticuerpos, o secuencias de aminoácidos de cuatro genes diferentes, en una cadena de péptido única de aproximadamente 55 kilodaltons. Uno de los scFv se une a las células T a través del receptor CD3 y el otro a un BCMA.

Hay cinco tipos de cadenas pesadas de anticuerpos de mamíferos indicadas por las letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ (Janeway CA, Jr et al. (2001). Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing). El tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo; estas cadenas se encuentran en anticuerpos de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4th ed., Thomson Learning). Distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos.

Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de diferente isotipo. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en

una línea), y una región de bisagra para mayor flexibilidad (Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99); las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway CA, Jr et al. (2001). Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing). La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes células B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por una célula B única o clon de células B. La región variable de cada cadena pesada es aproximadamente 110 aminoácidos de largo y está compuesta de un dominio de anticuerpo único.

En los mamíferos solamente hay dos tipos de cadena ligera, que se llaman lambda (λ) y kappa (κ). Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante de CL y un dominio variable de VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es 211 a 217 aminoácidos. En una modalidad, la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante de CL es en una modalidad derivada de una cadena ligera kappa (K) (el dominio constante CK).

"Sustitución aa" como se usa en la presente se refiere a la sustitución de aminoácidos independientes en el dominio constante de CH1 en el aminoácido en las posiciones 147 y 213 por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) y en el dominio constante de CL el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K), arginina (R) o histidina (H). En una modalidad además del dominio constante de CL, el aminoácido en la posición 123 está independientemente sustituido con lisina (K), arginina (R) o histidina (H). En una modalidad, el aminoácido 124 es K, el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E, y el aminoácido 123 es R. Las sustituciones aa están ya sea en el Fab CD3 o en uno o dos BCMA Fab. Los anticuerpos biespecíficos contra BCMA y CD3 como variantes de carga se describen en EP14179705, descrito por referencia (llamado además "variantes de carga resp. de intercambio de variante de carga").

Toda la numeración de aminoácidos en la presente es de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242).

5 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única.

10 Los "anticuerpos" de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferiblemente IgG o IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferiblemente IgG1), donde ambos anticuerpos, de los cuales se deriva el anticuerpo biespecífico bivalente de acuerdo con la invención, tienen una parte de Fc de la misma subclase (por
15 ejemplo, IgG1, IgG4 y similares, preferiblemente IgG1), preferiblemente del mismo alotipo (por ejemplo, caucásico).

Una "parte de Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por los expertos en la técnica y se define con base en la escisión de papaína de anticuerpos. Los anticuerpos de acuerdo con la
20 invención contienen como parte de Fc, en una modalidad, una parte de Fc derivada de origen humano y preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes humanas. La parte de Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la activación del complemento, unión a Clq, activación de C3 y unión al receptor de Fc. Mientras que la
25 influencia de un anticuerpo en el sistema de complemento depende de ciertas condiciones, la unión a Clq es causada por sitios de unión definidos en la parte de Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Lukas, T.J., Et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., MoI. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature
30 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., MoI. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184;

Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434.

Tales sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 generalmente muestran activación del complemento, unión a Clq y activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se une a Clq y no activa a C3. En una modalidad, la parte de Fc es una parte de Fc humana.

En una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una variante Fc de una región de Fc de IgG humana de tipo salvaje, la variante de Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición Pro329 y al una sustitución de aminoácido adicional, en donde los residuos están numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, y en donde el anticuerpo exhibe una afinidad reducida para el FcγRIIIA humano y/o FcγRIIA y/o FcγRI en comparación con un anticuerpo que comprende la región de Fc de IgG tipo salvaje, y en donde la ADCC inducida por el anticuerpo se reduce a al menos 20% de la ADCC inducida por el anticuerpo que comprende una región de Fc de IgG humana tipo salvaje. En una modalidad específica, Pro329 de una región de Fc humana tipo salvaje en el anticuerpo de acuerdo con la invención se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir la intercalación de prolina dentro de la interfaz del receptor de Fc/Fcγ, que se forma entre la prolina329 de Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y Trp 110 de FcγRIII (Sondermann et al.; Nature 406, 267-273 (20 July 2000)). En un aspecto adicional de la invención, al menos una sustitución de aminoácidos adicional en la variante de Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y aún en otra modalidad al menos una sustitución de aminoácidos adicional es L234A y L235A de la región de Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región de Fc de IgG4 humana. Tales variantes de Fc se describen en

detalle en WO2012130831.

Por "función efectora" como se usa en la presente se entiende un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región de Fc del anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, ADCC, ADCP y CDC. Por "célula efectora", como se usa en la presente, se entiende una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T $\gamma\delta$, y pueden ser de cualquier organismo, incluyendo, pero no limitado a, humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Por "biblioteca" en la presente se entiende un conjunto de variantes de Fc en cualquier forma, incluyendo, pero no limitado a, una lista de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, una lista de sustituciones de ácidos nucleicos o aminoácidos en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes de Fc, ya sea en forma purificada o no purificada.

Por "receptor Fc gamma" o "Fc γ R" como se usa en la presente significa cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región de Fc del anticuerpo de IgG y están sustancialmente codificadas por los genes de Fc γ R. En los humanos esta familia incluye pero no se limita a Fc γ RI (CD64), incluyendo isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, y Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), incluyendo las isoformas Fc γ RIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), Fc γ RIIb (incluyendo Fc γ RIIb-1 y Fc γ RIIb-2) y Fc γ RIIc; y Fc γ RIII (CD16), incluyendo las isoformas Fc γ RIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y Fc γ RIIIb (incluyen los alotipos Fc γ RIIIb-NA1 y Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65), así como cualquier isoforma o

alotipo de FcγRs o FcγR humana no descubierta. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen, pero no se limitan a, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como también cualquier isoforma o alotipo de FcγRs o FcγR de ratón no descubierta.

“Variante de Fc con función efectora aumentada” como se usa en la presente significa una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc de origen en virtud de al menos una modificación de aminoácido o se relaciona con otras modificaciones como enmienda de la glucosilación en, por ejemplo, Asn279 que aumenta las funciones efectoras. Tales modificaciones se mencionan, por ejemplo, en Duncan et al., 1988, *Nature* 332: 563-564; Lund et al., 1991, *J Immunol* 147: 2657-2662; Lund et al., 1992, *Mol Immunol* 29: 53-59; Alegre et al., 1994, *Transplantation* 57: 1537-1543; Hutchins et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11980-11984; Jefferis et al., 1995, *Immunol Lett* 44: 111-117; Lund et al., 1995, *Faseb J* 9: 115-119; Jefferis et al., 1996, *Immunol Lett* 54: 101-104; Lund et al., 1996, *J Immunol* 157: 4963-4969; Armor et al., 1999, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Idusogie et al., 2000, *J Immunol* 164: 4178-4184; Reddy et al., 2000, *J Immunol* 164: 1925-1933; Xu et al., 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Idusogie et al., 2001, *J Immunol* 166: 2571-2575; Shields et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65; Presta et al., 2002, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490; US5624821; US5885573; US6194551; WO200042072; WO199958572. Tales modificaciones de Fc también incluyen, de acuerdo con la invención, glicoformas diseñadas de la parte de Fc. Por “glicoforma diseñada”, como se usa en la presente, se entiende una composición de carbohidratos que está unida covalentemente a un polipéptido de Fc, en donde la composición de carbohidrato difiere químicamente de la de un polipéptido de Fc de origen. Las glicoformas diseñadas se pueden generar por cualquier método, por ejemplo, usando cepas de expresión diseñadas o variantes,

por coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo, D1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), expresando un polipéptido de Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando carbohidratos después que se haya expresado el polipéptido de Fc. Los métodos para generar glicoformas diseñadas se conocen en la técnica y se mencionan en Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US6602684; WO200061739; WO200129246; WO200231140; WO200230954; tecnología Potelligent™ (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); tecnología de ingeniería de glucosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza)). La glicoforma diseñada típicamente se refiere a la composición diferente de carbohidratos u oligosacáridos del polipéptido de Fc de origen.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención que comprende una variante de Fc con una función efectora aumentada muestran alta afinidad de unión al receptor III de Fc gamma (FcγRIII, CD 16a). La alta afinidad de unión a FcγRIII denota que la unión se mejora para CD16a/F158 al menos 10 veces en relación con el anticuerpo de origen (95% de fucosilación) como referencia expresada en células huésped de CHO, tales como células CHO DG44 o CHO K1, o/y se mejora la unión para CD16a/V158 al menos 20 veces en relación con el anticuerpo de origen medida por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) usando CD 16a inmovilizado a una concentración de anticuerpo de 100 nM. La unión de FcγRIII puede aumentarse por métodos de acuerdo con el estado de la técnica, por ejemplo, modificando la secuencia de aminoácidos de la parte de Fc o la glucosilación de la parte de Fc del anticuerpo (ver, por ejemplo, EP2235061). Mori, K et al., Cytotechnology 55 (2007) 109 y Satoh M, et al., Expert Opin Biol Ther. 6 (2006) 1161-1173 se refieren a una línea CHO con genes inactivados de FUT8 (α -1,6-fucosiltransferasa) para la generación de

anticuerpos afucosilados.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparada por técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante ha sido modificada o cambiada de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a Clq y/o unión al receptor de Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también son referidos "anticuerpos de clase cambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección de genes son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; Patentes de Estados Unidos N° 5,202,238 y 5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el armazón o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina de origen. En una modalidad preferida, se injerta una CDR murina en la región de armazón de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región

constante ha sido modificada o cambiada adicionalmente de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a Clq y/o unión al receptor de Fc (FcR).

5 El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos (ver, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985), y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como ya se mencionó para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" como se usa en la presente también comprende anticuerpos que están modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a Clq y/o unión a FcR, por

ejemplo, por "cambio de clase", es decir cambio o mutación de partes de Fc (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 y/o mutación de IgG1/IgG4).

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NSO o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma rearrreglada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones de VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de líneas germinales de anticuerpo humanas in vivo.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) como se usa en la presente denota cada uno de los pares de cadenas ligeras y pesadas que participan directamente en la unión del anticuerpo de acuerdo con la invención. Los dominios de cadenas ligeras y pesadas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones de armazón (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones de armazón adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones de armazón y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión. Las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo

desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, proporcionan un objeto adicional de la invención.

5 Los términos "región hipervariable" o "porción de unión al objetivo de un anticuerpo" cuando se usan en la presente se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al objetivo. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o
10 "CDR". Las regiones de "armazón" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de región hipervariable como se define en la presente. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden desde el extremo N a C terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada
15 cadena están separadas por tales aminoácidos de armazón. Especialmente, CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al objetivo. Las regiones CDR y FR son determinadas de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public
20 Health Service. National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los términos "CDR1H, CDR2H y CDR3H", como se usan en la presente, se refieren a las respectivas CDR de la cadena pesada localizadas en el dominio variable de VH. Los términos "CDR1L, CDR2L y CDR3L", como se usan en la presente, se refieren a las respectivas CDR de la cadena
25 ligera localizadas en el dominio variable de VL.

El dominio de cadena pesada constante de CH1 por el cual se reemplaza el dominio de cadena pesada de CH3 puede ser de cualquier clase de Ig (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El dominio de cadena
30 ligera constante de CL por el cual se reemplaza el dominio de cadena pesada de CH3 puede ser del tipo lambda (λ) o kappa (κ), preferiblemente del tipo kappa (κ).

El término "objetivo" o "molécula objetivo" como se usa en la presente se usan intercambiables y se refieren a BCMA humano. Con respecto a los anticuerpos biespecíficos, el término se refiere a BCMA y al segundo objetivo. Preferiblemente con respecto a los anticuerpos biespecíficos, el término se refiere a BCMA y CD3.

El término "epítope" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas modalidades, el determinante del epítope incluye agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítope es una región de un objetivo que está unido por un anticuerpo.

En general, hay dos vectores que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención. Con respecto a un anticuerpo biespecífico, hay dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se unen específicamente al primer objetivo, y otros dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se unen específicamente al segundo objetivo. Uno de los dos vectores codifica la cadena ligera respectiva y el otro de los dos vectores codifica la cadena pesada respectiva. Sin embargo, en un método alternativo para la preparación de un anticuerpo de acuerdo con la invención, solamente un primer vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente al primer objetivo y solamente un segundo vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente al segundo objetivo puede usarse para transformar la célula huésped.

La expresión "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena

única o doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

Como se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las designaciones de este tipo incluyen progenie. De este modo, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye una progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la que se selecciona en la célula originalmente transformada. Cuando se proponen designaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

El término "transformación" como se usa en la presente se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula huésped. Si se usan células sin barreras de pared celular formidables como células huésped, la transfección se realiza, por ejemplo, por el método de precipitación con fosfato de calcio como se describe por Graham and Van der Eh, Virology 52 (1978) 546ff. Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en las células, tales como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de paredes celulares sustanciales, por ejemplo, un método de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como se describe por Cohen SN, et al., PNAS 1972, 69 (8): 2110-2114.

La producción recombinante de anticuerpos usando transformación es bien conocida en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S. C, Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, RJ., MoI. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, RG, et al., Arzneimittelforschung 48

(1998) 870-880, así como en US6331415 y US4816567.

Como se usa en la presente, "expresión" se refiere al proceso por el cual un ácido nucleico se transcribe en ARNm y/o al proceso por el cual el ARNm transcrito (también referido como
5 transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados son referidos colectivamente producto génico. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el corte y empalme del ARNm.

10 Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular auto-replicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de
15 vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se
20 introduce en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" normalmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

25 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con aislamiento posterior del polipéptido de anticuerpo y usualmente
30 purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la proteína, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de los mismos se insertan en vectores

de expresión por métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas como células CHO, células NSO, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura, o células de E. coli, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis) Los anticuerpos biespecíficos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de remover otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, cromatografía en columna y otros bien conocidos en la técnica. Ver Ausubel, F., et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

La expresión en células NSO se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; and Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión temporal se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión temporal preferido (HEK293) se describe por Schlaeger, E.- J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 and by Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, mejoradores y señales de poliadenilación.

Los anticuerpos se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas

convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN o ARN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente del ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped como células HEK293, células CHO o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes (o mutantes) de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de acuerdo con la invención se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o por síntesis de nucleótidos. Sin embargo, tales modificaciones se pueden realizar solamente en un rango muy limitado, por ejemplo, como se describió anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpos mencionadas anteriormente, tales como el isotipo de IgG y la unión al objetivo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

La invención proporciona, en una modalidad, una secuencia de ácido nucleico aislada o purificada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende una porción de reconocimiento de antígeno dirigida contra BCMA, una porción de transmembrana y una porción de activación de células T, caracterizado porque la porción de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo de acuerdo con la invención (aquí no es el anticuerpo biespecífico). El anticuerpo codificado puede ser también un fragmento de unión al antígeno del mismo como se especifica. Las estructuras y generación de tales "CAR de BCMA" se describen, por ejemplo, en WO2013154760, WO2015052538, WO2015090229 y WO2015092024.

En una modalidad, la invención comprende un receptor de

antígeno quimérico (CAR) que comprende:

(i) una porción de reconocimiento del antígeno de maduración de células B (BCMA);

(ii) un dominio de espaciador; y

5 (ii) un dominio de transmembrana; y

(iii) un dominio de señalización de células T intracelular,

caracterizado porque la porción de reconocimiento de BCMA es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA,

caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y

10 una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1H, CDR2H, CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

15 b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 20 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 25 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32.

30 La porción de activación de células T puede ser cualquier porción adecuada derivada u obtenida de cualquier molécula adecuada. En una modalidad, por ejemplo, la porción de activación de células T

comprende un dominio de transmembrana. El dominio de transmembrana puede ser cualquier dominio de transmembrana derivado u obtenido de cualquier molécula conocida en la técnica. Por ejemplo, el dominio de transmembrana se puede obtener o derivar de una molécula de CD8a o una molécula de CD28. CD8 es una glicoproteína de transmembrana que sirve como un co-receptor para el receptor de células T (TCR) y se expresa principalmente en la superficie de las células T citotóxicas. La forma más común de CD8 existe como un dímero compuesto de una cadena de CD8 alfa y CD8 beta. CD28 se expresa en células T y proporciona señales co-estimulantes requeridas para la activación de células T. CD28 es el receptor para CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). En una modalidad preferida, CD8 alfa y CD28 son humanas. Además del dominio de transmembrana, la porción de activación de células T comprende además un dominio de señalización de células T intracelular (es decir, citoplasmático). El dominio de señalización de células T intercelular puede obtenerse o derivarse de una molécula CD28, una molécula de CD3 zeta o versiones modificadas de la misma, una cadena gamma del receptor de Fc humana (FcR γ), una molécula de CD27, una molécula de OX40, una molécula de 4-1BB, u otras moléculas de señalización intracelular conocidas en la técnica. Como se discutió anteriormente, CD28 es un marcador de células T importante en la co-estimulación de células T. CD3 zeta, se asocia con TCR para producir una señal y contiene motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptor (ITAM). 4-1BB, también conocido como CD137, transmite una potente señal coestimulante a las células T, promoviendo la diferenciación y mejorando la supervivencia a largo plazo de los células T. En una modalidad, la CD28, CD3 zeta, 4-1BB, OX40 y CD27 son humanas.

La invención proporciona, en una modalidad, una secuencia de ácido nucleico aislada o purificada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se especifica anteriormente.

Los enlazantes biespecíficos de células T (TCB) tienen muy

alta concentración/potencia dependiente de la ocupación del receptor de células de tumor/concentración muy alta en la matanza celular (por ejemplo, EC_{50} en ensayos de matanza celular in vitro en el rango sub- o bajo picomolar; Dreier et al. Int J Cancer 2002), el enlazante

5 biespecífico de células T (TCB) se administra a dosis mucho más bajas que los anticuerpos monoespecíficos convencionales. Por ejemplo, blinatumomab (CD19xCD3) se administra a una dosis intravenosa continua de 5 a 15 μ g/m²/día (es decir, sólo 0.35 a 0.105 mg/m²/semana) para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda o 60

10 μ g/m²/día para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, y las concentraciones en suero en estas dosis están en el rango de 0.5 a 4 ng/ml (Klinger et al., Blood 2012; Topp et al., J Clin Oncol 2011; Goebeler et al. Ann Oncol 2011). Debido a que dosis bajas de TCB pueden ejercer una alta eficacia en pacientes, se prevé que para un

15 anticuerpo de acuerdo con la invención, la administración subcutánea es posible y preferida en el entorno clínico (preferiblemente en el rango de dosis de 0.1 a 2.5, preferiblemente 25 mg/m²/semana, preferiblemente 250 mg/m²/semana). Incluso en estas bajas concentraciones/dosis/ocupaciones de receptores, el TCB puede causar

20 considerables eventos adversos (Klinger et al., Blood 2012). Por lo tanto, es fundamental controlar la ocupación/cobertura de células de tumor. En pacientes con niveles altos y variables de APRIL y BAFF en suero (por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple, Moreaux et al., 2004; Blood 103 (8): 3148-3157), el número de TCB unido a las células

25 de tumor resp. a la ocupación de células de tumor puede verse considerablemente influenciado por APRIL/BAFF. Pero al usar el anticuerpo de esta invención, la ocupación de células de tumor y respectivamente eficacia/seguridad, puede no ser necesario aumentar la dosis de un anticuerpo de acuerdo con esta invención ya que el

30 anticuerpo puede no verse afectado por la competición de ligando de APRIL/BAFF. Otra ventaja del anticuerpo de acuerdo con la invención se basa en la inclusión de una parte de Fc, aproximadamente de 4 a 12

días y permite al menos una o dos administraciones/semana en comparación con los TCB sin una parte de Fc (por ejemplo, blinatumomab) que deben administrarse por vía intravenosa y continua con una bomba portada por los pacientes.

5 Las propiedades biológicas de los anticuerpos de acuerdo con la invención, respectivamente sus anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 se han investigado en varios estudios en comparación con 83A10-TCBcv. La potencia para inducir la citotoxicidad redirigida de células T de, por ejemplo, anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv en comparación con 83A10-TCBcv se midió en 10 línea celular H929 de MM (Ejemplo 8, Tabla 12, Figura 4). Los anticuerpos de esta invención se estudiaron y el análisis mostró que la matanza dependiente de la concentración de células H929 resp. a los valores de EC50 resultaron ser mayores que los valores de EC50 15 determinados para 83A10-TCBcv; sugiriendo que los anticuerpos anti-BCMA de acuerdo con la invención como TCB fueron menos potentes para inducir la matanza de células H929 de MM que el Mab 83A10 como TCB. Sorprendentemente se observó un vuelto cuando la citotoxicidad redirigida por células T fue medida en la línea celular de MM RPMI- 20 8226 y también la línea celular JJN-3 (respectivamente, ejemplos 10 y 11, Tablas 13, y 14 y 15, Figuras 6 y 7): los anticuerpos de acuerdo con la invención como TCB mostraron una menor EC50 y, por lo tanto, una potencia mayor que 83A10-TCBcv. Para sorpresa de los inventores, los anticuerpos de acuerdo con la invención como TCB mostraron varias 25 ventajas en una comparación directa con 83A10 TCBcv en aspirados de médula ósea recién tomados de pacientes con MM (nota: para obtener la mejor comparación posible, en todos los aspirados de médula ósea siempre se han analizado todos los anticuerpos biespecíficos de células T (TCB) a las mismas concentraciones);

30 - La mayor potencia de matanza de las células de mieloma, es decir, mismo% de matanza, se logró a concentraciones menores que con 83A10-TCBcv respectivamente, curvas de respuesta de concentración

para la matanza desplazadas hacia la izquierda (Ejemplo 13, Tablas 18, 19 y 20, Figuras 8, 9 y 10). A una concentración de 1 nM de anticuerpos como TCB de acuerdo con la invención en aspirados de médula ósea de siete pacientes diferentes, la reducción con relación al control de células de cáncer de mieloma múltiple viables negativas a yoduro de propidio estuvo entre 77.1 y 100%. Con 83A10-TCBcv 1 nM en los mismos siete aspirados de médula ósea, se lograron reducciones de solamente 37.1 a 98.3% (Tablas 20 y 21).

- La mayor matanza máxima en comparación con 83A10-TCBcv se logró a la concentración más alta probada (10 nM) en el mismo experimento con los siete (7) aspirados de médula ósea para anticuerpos como TCB de acuerdo con la invención (Tablas 20 y 21).

- Los no respondedores a 83A10-TCBcv se pueden volver respondedores si se utilizan 22-TCBcv/42-TCBcv: En dos (2) muestras de pacientes con médula ósea en los que no se observó respuesta de matanza a 83A10-TCBcv, sorprendentemente se pudo encontrar la matanza con anticuerpos como TCB de acuerdo con la invención (Figuras 9A y 9B).

El TCB de BCMAxCD3 de esta invención se une a BCMA humano y de monos cynomolgus (cyno) y a BCMA de ratones y ratas, apropiados para el examen toxicológico en monos cynomolgus si el enlazante de CD3 también se une a CD3 cynomolgus o en ratón/rata si el enlazante de CD3 también se une a BCMA de ratón/rata. Sorprendentemente, la afinidad de unión a BCMA cyno es muy cercana a la afinidad de unión a BCMA humano. SPR se ha usado para medir afinidades de unión a BCMA humano y cyno (Ejemplo 2, Tabla 4). La abertura de Cyno/humana (relación de afinidad para BCMA cyno a humano, KD) se ha calculado de datos de afinidad medidos dividiendo la afinidad a BCMA cyno a través de la afinidad a BCMA humano (Ejemplo 3, Tabla 5). Para 83A10 se encontró una abertura cyno/humana de 15.3 (es decir, 15.3 veces menor afinidad de unión al BCMA cyno que humano). Para sorpresa de los inventores, los anticuerpos de acuerdo con la invención mostraron

aberturas cyno/humanas entre 15.4 y 1.7, que es similar o en una mayoría más favorable a la abertura cyno/humana que la de 83A10 (Tabla 5). Debido a que el enlazante de CD3 utilizado en el TCB de BCMAxCD3 de acuerdo con la invención reacciona cruzado con CD3 cynomolgus, las investigaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas pueden ser obtenidas de monos cynomolgus (ver Ejemplo 16). También las investigaciones toxicológicas en monos cynomolgus son predictivas de los efectos farmacológicos y toxicológicos en humanos y la característica de reactividad cruzada a monos cynomolgus es para el beneficio de los pacientes. Los anticuerpos de BCMA de esta invención también se unen a BCMA murino (por ejemplo, Kd de los clones 22 y 42 medida por SPR como 0.9 nM y 2.5 nM) ver tabla 2D en el Ejemplo 1.1.1A.4). El enlazante de CD3 del TCB de BCMAxCD3 no tiene reactividad cruzada con el CD3 murino.

En resumen, las ventajas de potencia y eficacia para la matanza de líneas celulares de MM que expresan bajo BCMA como RPMI-8226 y JJN-3 y especialmente para la matanza de células de MM en aspirados de médula ósea de pacientes y, además, la abertura cyno/humana muy favorable en afinidades de unión a BCMA hace a los anticuerpos de esta invención y los TCB respectivos agentes esencialmente prometedores para el tratamiento de pacientes con MM. Además, el TCBcv anti-BCMAxCD3 de esta invención tiene, como 83A10-TCBcv, propiedades favorables como vida media de eliminación prolongada, eficacia a administración una vez a la semana (por vía intravenosa, subcutánea), baja o nula tendencia a la agregación y puede manufacturarse con alta pureza y buen rendimiento.

Tabla 1A: Secuencias de anticuerpos

SEQ ID NO:	Nombres	secuencias aa
---------------	---------	---------------

1	CDR1H de CD3	TYAMN
2	CDR2H de CD3	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CDR3H de CD3	HGNFGNSYVSWFAY
4	CDR1L de CD3	GSSTGAVTTSNYAN
5	CDR2L de CD3	GTNKRAP
6	CDR3L de CD3	ALWYSNLWV
7	VH de CD3	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F STYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSS
8	VL de CD3	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAE YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
9	VH de 83A10	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSS
10	VH de Mab21 VH de Mab22 VH de Mab42	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSS
11	VL de 83A10	EIVLTQSPGTL S L S P G E R A T L S C R A S Q S V SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG

		IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
12	VL de Mab21 VL de Mab27 VL de Mab33 VL de Mab39	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SEYYLAWYQQKPGQAPRLLEHASTRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
13	VL de Mab22	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SSYYLAWYQQKPGQAPRLISGAGSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
14	VL de Mab42	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHASTRATG IPDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVY YCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
15	CDR1H de 83A10	SYAMS
16	CDR2H de 83A10	AISGSGGSTYYADSVKG
17	CDR3H de 83A10 CDR3H de Mab21 CDR3H de Mab22 CDR3H de Mab42 CDR3H de Mab27 CDR3H de Mab33 CDR3H de Mab39	VLGWFDY
18	CDR1L de 83A10	RASQSVSSSYLAW

19	CDR2L de 83A10	YGASSRAT
20	CDR3L de 83A10 CDR3L de Mab21 CDR3L de Mab22 CDR3L de Mab42	QQYGYPPDFT
21	CDR1H de Mab21 CDR1H de Mab22 CDR1H de Mab42	DNAMG
22	CDR2H de Mab21 CDR2H de Mab22 CDR2H de Mab42	AISGPGSSTYYADSVKG
23	CDR1L de Mab21	RASQSVSEYYLAW
24	CDR2L de Mab21	EHASTRAT
25	CDR1L de Mab22	RASQSVSSYYLAW
26	CDR2L de Mab22	SGAGSRAT
27	CDR1L de Mab42	RASQSVSDEYLSW
28	CDR2L de Mab42	HSASTRAT
29	CDR1H de Mab27	SAPMG
30	CDR2H de Mab27	AISYIGHTYYADSVKG
31	CDR1L de Mab27 CDR1L de Mab33 CDR1L de Mab39	RASQSVSEYYLA

32	CDR2L de Mab27 CDR2L de Mab33 CDR2L de Mab39	HASTRAT
33	CDR3L de Mab27 CDR3L de Mab33 CDR3L de Mab39	QQYGYPPDFT
34	CDR1H de Mab33	TNAMG
35	CDR2H de Mab33	AINREGGSTYYADSVKG
36	CDR1H de Mab39	QNAMG
37	CDR2H de Mab39	AISPTGFSTYYADSVKG
38	VH de Mab27	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F S S A P M G W V R Q A P G K G L E W V S A I S Y I G H T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V L G W F D Y W G Q G T L V T V S S
39	VH de Mab33	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F Y T N A M G W V R Q A P G K G L E W V S A I N R E G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V L G W F D Y W G Q G T L V T V S S
40	VH de Mab39	EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F T F T Q N A M G W V R Q A P G K G L E W V S A I S P T G F S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V L G W F D Y W G Q G T L V T V S S
41	CH1 de BCMA de 83A10 CH1 de BCMA de Mab21	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V E D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H

	CH1 de BCMA de Mab22 CH1 de BCMA de Mab42	KPSNTKVDEKVEPKSC
42	CL de BCMA de 83A10 CL de BCMA de Mab21 CL de BCMA de Mab22 CL de BCMA de Mab42	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	CH1 de CD3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
44	CL de CD3	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
45	HC de perilla de 83A10	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQA VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

		SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
46	HC de agujero de 83A10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFYWGQGTIVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
47	LC de 83A10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPS

		VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNIFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
48	LC de CD3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	HC de perilla de Mab21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTT SNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

		TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
50	HC de agujero de Mab21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
51	LC de Mab21	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SEYYLAWYQQKPGQAPRLIEHA STRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

52	HC de perilla de Mab22	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
53	HC de agujero de Mab22	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

		SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
54	LC de Mab22	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SSYYLAWYQQKPGQAPRLISGAGSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
55	HC de perilla de Mab42	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTT SNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS

		VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
56	HC de agujero de Mab42	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVLGWFQDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSV SDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATG IPDRFSGSGSGTDFTLAIISRLEPEDFAVY YCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DST YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
----	----------	---

Observación: la SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 33 son idénticas

Tabla 1B: Secuencias de anticuerpos (lista corta)

	SEQ ID NO:							
anticuerpo de CD3	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
	7	8	1	2	3	4	5	6
anticuerpo de BCMA	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33

5

Tabla 2A: Constructos adicionales

	SEQ ID NO:			
Fragmento/Constructo	83A10	Mab21	Mab22	Mab42

BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

Tabla 2B: construcciones adicionales

	SEQ ID NO:			
Constructo	83A1 0	Mab2 1	Mab2 2	Mab4 2
BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc perilla LALA PG (HC de perilla)	45	49	52	55
BCMAcv HC agujero LALA PG (HC de agujero)	46	50	53	56
BCMAcv hum IgG1 LC (BCMA LC)	47	51	54	57
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

Para obtener los siguientes (2 + 1) TCB anti-BCMA/anti-CD3
 5 que contienen Fc, se usaron los constructos/ID de secuencia
 respectivos como se menciona en la tabla 2B anterior:

83A10-TCBcv: 45, 46, 47 (x2), 48 (Figura 2A)

21-TCBcv: 48, 49, 50, 51 (x2) (Figura 2A)

22-TCBcv: 48, 52, 53, 54 (x2) (Figura 2A)

10 42-TCBcv: 48, 55, 56, 57 (x2) (Figura 2A)

A continuación se listan las modalidades específicas de la
 invención:

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a
 BCMA, caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID
 15 NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de

región CDR1H, CDR2H, CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

5 b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 10 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 15 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32.

20 2. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de 25 región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o

30 c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

3. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 1 o 2,

caracterizado porque comprende como región de VL una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13 y 14.

4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 3, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12.

5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 3, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 13.

6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 3, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 14.

7. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 1 o 2, caracterizado porque el aminoácido 49 de la región de VL se selecciona del grupo de aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H).

8. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 7, caracterizado porque el aminoácido 74 de la región de VL es treonina (T) o alanina (A).

9. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, una región CDR2L de la SEQ ID NO: 32 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, o

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37.

10. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 9, caracterizado porque comprende una región de VL de la SEQ ID NO: 12 y una región de VH seleccionada del grupo que comprende las regiones de VH de la SEQ ID NO: 38, 39 y 40.

11. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 9 o 10, caracterizado porque el aminoácido 49 de la región de VL se selecciona del grupo de aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H)

12. El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 9 o 10, caracterizado porque el aminoácido 74 de la región de VL es treonina (T) o alanina (A).

13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 12, caracterizado porque también se une específicamente a BCMA cynomolgus y comprende un fragmento Fab adicional que se une específicamente a CD3ε.

14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13, caracterizado porque es un anticuerpo con un Fc o sin una parte de Fc.

15. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y CD3ε, caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1H, CDR2H, CDR1L, y CDR2L selecciona del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO:

22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO:

5 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 10 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32.

16. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos objetivos que son el dominio extracelular de BCMA humano (nombrado adicionalmente también como "BCMA") y CD3ε humano (nombrado 15 adicionalmente también como "CD3"), caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o

25 c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

17. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la modalidad 15 o 16, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10.

30 18. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 16, caracterizado porque VL de BCMA se selecciona del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO:

12, 13 y 14.

19. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 14 a 18, caracterizado porque comprende como región de VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12, o como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 13, o como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 14.

20. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 o 19, caracterizado porque el aminoácido 49 de la región de VL se selecciona del grupo de aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H).

21. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 20, caracterizado porque el aminoácido 74) de la región de VL es treonina (T) o alanina (A).

22. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y CD3, caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, una región CDR2L de la SEQ ID NO: 32 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

- a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30,
- b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, o
- c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37.

23. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la modalidad 22, caracterizado porque comprende una región de VL de la SEQ ID NO: 12 y una región de VH seleccionada del grupo que comprende las regiones de VH de la SEQ ID NO: 38, 39 y 40.

24. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la modalidad

22 o 23, caracterizado porque el aminoácido 49 de la región de VL se selecciona del grupo de aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), serina (S), e histidina (H).

5 25. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 22 a 24, caracterizado porque el aminoácido 74 de la región de VL es treonina (T) o alanina (A).

10 26. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 25, caracterizado porque comprende un anticuerpo anti-BCMA de acuerdo con la invención y un anticuerpo anti-CD3, en donde

- a) la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7; y
- b) la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a CD3, en donde los dominios variables de VL y VH
15 o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí.

20 27. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 26, caracterizado comprende no más de un fragmento Fab de una porción de anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de una porción de anticuerpo anti-BCMA y no más de una parte de Fc.

25 28. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 27, caracterizado porque comprende una parte de Fc enlazada con su extremo N terminal al extremo C terminal del fragmento Fab de anticuerpo CD3 y al extremo C terminal de uno de los fragmentos Fab de BCMA de anticuerpo

30 29. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 28, caracterizado porque comprende un segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA (porción de anticuerpo de BCMA) enlazado con su extremo C terminal al extremo N terminal del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3 (porción de anticuerpo de CD3) del anticuerpo biespecífico.

30. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la modalidad

29, caracterizado porque el dominio de VL del fragmento Fab de anticuerpo anti-CD3 se enlaza al dominio de CH1 del segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA.

31. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 30, caracterizado porque el dominio variable de VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado adicionalmente como "VH de CD3") comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y el dominio variable de VL de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado adicionalmente como "VL de CD3") comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera.

32. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 31, caracterizado porque los dominios variables de la porción de anticuerpo anti-CD3e son de la SEQ ID NO: 7 y 8.

33. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos objetivos que son el dominio extracelular de BCMA humano y CD3e humano, caracterizado porque comprende

- a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
- b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y
- c) en donde en el dominio constante de CL de la primera cadena ligera bajo a) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde el dominio constante de CH1 de la primera cadena pesada bajo a) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 se sustituyen independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)

(numeración de acuerdo con Kabat) (ver, por ejemplo, Figuras 1A, 2A, 2C, 3A, 3C).

34. Un anticuerpo biespecífico específicamente de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque comprende además un fragmento Fab del primer anticuerpo (llamado adicionalmente también como "BCMA-Fab") y en el dominio constante de CL del BCMA-Fab, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante de CH1 del BCMA-Fab, el aminoácido en las posiciones 147 y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver, por ejemplo, Figuras 2A, 2C).

35. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos objetivos que son el dominio extracelular de BCMA humano y CD3ε humano, caracterizado porque comprende

- a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
- b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y en donde
- c) en el dominio constante de CL de la segunda cadena ligera bajo b) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante de CH1 de la segunda cadena pesada bajo b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).

36. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a

los dos objetivos que son el dominio extracelular de BCMA humano y CD3ε humano, caracterizado porque comprende un conjunto de cadena pesada y ligera seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos

i) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 (2x);

5 (conjunto 1 de TCB de anticuerpo 21),

ii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 (2x)

(conjunto 2 de TCB de anticuerpo 22), y

iii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 (2x)

(conjunto 3 de TCB de anticuerpo 42).

10 37. Un método para la preparación de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado porque comprende las etapas de

a) transformar una célula huésped con

15 b) vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36,

c) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de la molécula de anticuerpo; y

d) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo.

20 38. Una célula huésped, que comprende vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

25 39. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para uso como medicamento.

30 41. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para uso como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células de plasma.

42. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para uso como medicamento en el tratamiento de mieloma múltiple, leucemia de células de plasma y AL-amiloidosis.

5 43. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para uso como un medicamento en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

10 44. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, que incluye un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo desnudo mejorado con ADCC, un conjugado de anticuerpo-fármaco o un anticuerpo biespecífico para uso como medicamento en el tratamiento de rechazo mediado por anticuerpos.

15 45. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: una porción de reconocimiento de antígeno dirigida contra BCMA y una porción de activación de célula T, caracterizado porque la porción de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 14.

20 46. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) de acuerdo con la modalidad 45, caracterizado porque comprende:

- (i) una porción de reconocimiento de antígeno de maduración de células B (BCMA);
- (ii) un dominio de espaciador; y
- 25 (ii) un dominio de transmembrana; y
- (iii) un dominio de señalización de células T intracelular.

30 47. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) de acuerdo con la modalidad 45 o 46, caracterizado porque la porción de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1H, CDR2H, CDR1L y

CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y la región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

5 b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 10 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 15 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32.

20 48. Una secuencia de ácido nucleico aislada o purificada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), de acuerdo con cualquiera de las modalidades 45 a 47.

49. Un método de generación de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, que agota como anticuerpo biespecífico 25 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 36 células de plasma malignas humanas en aspirados de médula ósea de mieloma múltiple MM de una manera a al menos 80% después de 48 horas de tratamiento en una concentración de entre 10 nM y 1 fM de anticuerpo anti-BCMA, caracterizado por

30 a) cribar una biblioteca de expresión en fagos de cadena pesada (VH) variable de la SEQ ID NO: 9 con BCMA cynomolgus 1-50 nM en 1-3 rondas y seleccionar una cadena pesada variable, que cuando se combina con

la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 11 a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 36 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera,

c) cribar una biblioteca de expresión en fagos de cadena ligera variable (VL) de la SEQ ID NO: 11 con BCMA cynomolgus 1-50 nM en 1-3 rondas y b) seleccionar una cadena ligera variable, que cuando se combina con la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 9 a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 15 a 36 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera,

y combinar la cadena pesada variable seleccionada y la cadena ligera variable seleccionada con un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4 a 16 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera.

50. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y 45 a 47, para uso como un medicamento en el tratamiento de mieloma múltiple o lupus eritematoso sistémico o leucemia de células de plasma o AL-amiloidosis.

En una modalidad, la unión del anticuerpo de acuerdo con la invención no se reduce en 100 ng/ml de APRIL por más de 20% medido en un ensayo ELISA como OD a 405 nm en comparación con la unión del anticuerpo a BCMA humano sin APRIL, no altera la activación de NF- κ B dependiente de APRIL por más de 20%, en comparación con APRIL, y no altera la activación de NF- κ B sin APRIL por más de 20%, en comparación con el anticuerpo.

En una modalidad, la unión del anticuerpo en una concentración de 6.25 nM no se reduce en 140 ng/ml de APRIL murino por más de 10%, preferiblemente no se reduce en más de 1% medido en un ensayo ELISA como OD a 450 nm en comparación con la unión del anticuerpo a BCMA humano sin APRIL. La unión del anticuerpo en una concentración de 50 nM no se reduce en 140 ng/ml de APRIL murino por

más de 10%, medido en un ensayo ELISA como OD a 450 nm, en comparación con la unión del anticuerpo a BCMA humano sin APRIL.

En una modalidad, la unión del anticuerpo no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y no se reduce en 100 ng/ml de BAFF por más de 20% medido en un ensayo ELISA como DO a 405 nm en comparación con la unión del anticuerpo a BCMA humano sin APRIL o BAFF respectivamente, el anticuerpo no altera la activación de NF- κ B dependiente de APRIL por más de 20%, en comparación con APRIL solo, no altera la activación de NF- κ B dependiente de BAFF en más de 20%, en comparación con BAFF solo, y no altera la activación de NF- κ B sin BAFF y APRIL por más de 20%, en comparación con el anticuerpo.

En una modalidad, la unión del anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL por más de 15%, medido en el ELISA, no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL, por más de 20%, medido en el ELISA, y no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL por más de 15%, medido en el ELISA.

En una modalidad, la unión del anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y no se reduce en 100 ng/ml de BAFF durante más de 15%, medido en el ELISA, no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL y no se reduce en 1000 ng/ml de BAFF, por más de 20%, medido en el ELISA, no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL y no se reduce en 1000 ng/ml de BAFF por más de 15%, medido en el ELISA.

En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF- κ B dependiente de APRIL por más de 15%, no altera la activación de NF- κ B dependiente de BAFF por más de 15%, y no altera la activación de NF- κ B sin APRIL y BAFF por más de 15%.

En una modalidad, la unión del anticuerpo a BCMA no se reduce por APRIL, no se reduce por BAFF por más de 25%, no más de 20%, y no más de 10%, medida como unión del anticuerpo en una concentración de 5 nM, preferiblemente 50 nM y 140 nM a células NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) en la presencia o ausencia de APRIL o respectivamente BAFF en una concentración de 2.5 μ g/ml en comparación

con la unión del anticuerpo a células NCI-H929 sin APRIL o BAFF respectivamente.

En una modalidad, se proporcionan los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se dan en: Kabat, EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeraron y se mencionaron de acuerdo con Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Síntesis de genes

a) Los segmentos de genes deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos preparados por síntesis química. Los segmentos de genes de 600-1800 pb de largo, los cuales se flanquearon por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singular, se ensamblaron por hibridación y ligamiento de oligonucleótidos que incluyen amplificación por PCR y se clonaron posteriormente por los sitios

de restricción indicados, por ejemplo, KpnI/Sad o Ascl/PacI en pPCRScripT (Stratagene) basado en el vector de clonación pGA4. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron por secuenciación de ADN. Los fragmentos de síntesis génica se ordenaron de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

b) Se generaron segmentos de genes deseados cuando se requirieron por PCR utilizando plantillas apropiadas o fueron sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis genética automatizada. Los segmentos de genes flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singular se clonaron en vectores de expresión estándar o en vectores de secuenciación para análisis adicional. El ADN del plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas usando kits de purificación de plásmidos comercialmente disponibles. La concentración de plásmido se determinó por espectroscopia UV. La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó por secuenciación de ADN. Los segmentos de genes se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Si es requerido, los genes de codificación de proteína se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a las proteínas para la secreción en células eucariotas.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron por secuenciación de doble cadena.

Análisis de secuencia de ADN y proteína y manejo de datos de secuencia

El paquete de software Clone Manager (Scientific & Educational Software) versión 9.2 se utilizó para el mapeo de

secuencias, el análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

a) Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas como se describe a continuación se generaron por PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron con métodos y técnicas recombinantes conocidos por conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo usando sitios de restricción únicos en los respectivos vectores. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias, se prepararon cantidades mayores de los plásmidos por preparación de plásmido a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

b) Para la generación de vectores de expresión de anticuerpo anti-BCMA, las regiones variables de las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera se subclonaron en armazón ya sea con la cadena pesada constante de IgG1 humana o la cadena ligera constante de IgG1 humana previamente insertadas en el vector de expresión de receptor genérico respectivo optimizado para la expresión en líneas celulares de mamíferos. La expresión del anticuerpo es dirigida por un promotor de MPSV quimérico que comprende un mejorador de CMV y un promotor de MPSV seguido por un 5' UTR, un intrón y un elemento de MAR de Ig kappa. La transcripción se terminó por una secuencia de señal de políA sintética en el extremo 3' de CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para la secreción en células eucarióticas. Además, cada vector contiene una secuencia de EBV OriP para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBV EBNA.

c) Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos de dos porciones de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3

y BCMA. Las porciones de unión a antígeno son fragmentos Fab compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo cada una una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab fue un fragmento "Crossfab", en donde se intercambiaban VH y VL. El intercambio de VH y VL dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de especificidad diferente no tienen arreglos de dominio idénticos. El diseño de la molécula biespecífica fue monovalente para CD3 y bivalente para BCMA en donde un fragmento Fab se fusionó con el extremo N terminal del CrossFab interno (2 + 1). La molécula biespecífica contenía una parte de Fc para que la molécula tuviera una vida media larga. Una representación esquemática de los constructos se da en la Figura 2; las secuencias preferidas de los constructos se muestran en las SEQ ID NOs 39 a 52. Las moléculas se produjeron por cotransfección de células HEK293 EBNA que crecían en suspensión con los vectores de expresión de mamíferos usando una solución basada en polímeros. Para la preparación de constructos 2 + 1 CrossFab-IgG, las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1:2:1:1 ("vector Fc (perilla)": "cadena ligera de vector": "cadena ligera de vector CrossFab": "cadena pesada de vector-CrossFab").

Técnicas de cultivo celular

Las técnicas de cultivo celular estándar se usan como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, KM (eds.), John Wiley & Sons., Inc.

Expresión transitoria en células HEK293 (sistema HEK293-EBNA)

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron por cotransfección transitoria de los vectores de expresión de mamífero respectivos en células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión,

usando una solución basada en polímero. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1.5 células viables Mio/ml en medio Ex-Cell, suplementado con L-Glutamina 6 mM. Por cada ml de volumen de producción final se centrifugaron 2.0
5 células viables Mio (5 minutos a 210 xg). El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 100 µl de medio CD CHO. El ADN para cada ml de volumen de producción final se preparó mezclando 1 µg de ADN (relación cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena ligera: cadena ligera modificada = 1:1:2:1) en 100 µl de medio CD CHO.
10 Después de la adición de 0.27 µL de solución basada en polímeros (1 mg/mL) la mezcla se sometió a vórtice durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, las células resuspendidas y la mezcla de solución basada en ADN/polímero se juntaron y luego se transfirieron a un recipiente apropiado que se
15 colocó en un dispositivo de agitación (37°C, 5% de CO₂). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añadieron 800 µl de medio Ex-Cell, suplementado con L-Glutamina 6 mM, ácido valproico 1.25 mM y 12.5% Pepsoy (50 g/l) por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se añadieron 70 µL de solución de alimentación
20 para cada mL de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular fue igual o menor de 70%, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación y filtración estéril. Los anticuerpos se purificaron por una etapa de afinidad y una o dos etapas de pulido, siendo la cromatografía de intercambio catiónico y
25 la cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando sea necesario, se utilizó una etapa de pulido adicional. El anticuerpo humano recombinante anti-BCMA y los anticuerpos biespecíficos se produjeron en suspensión co-transfectando las células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero utilizando una solución basada en
30 polímeros. Para la IgG1 humana, un plásmido codificó la cadena pesada y el otro plásmido la cadena ligera. Para los anticuerpos biespecíficos se cotransfectaron cuatro plásmidos. Dos de ellos

codificaron las dos cadenas pesadas diferentes y las otras dos codificaron las dos cadenas ligeras diferentes. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1.5 células viables Mio/ml en medio F17, suplementado con L-Glutamina 6 mM.

5

Determinación de la proteína

La determinación de la concentración de anticuerpo se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de la absorbancia de una solución al 0.1% del anticuerpo. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó por el software GPMW (datos de Lighthouse).

SDS-PAGE

El sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizó 10% o 4-12% de geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6.4) y un amortiguador de corrida NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de amortiguador de corrida NuPAGE® Antioxidant) o MOPS (geles no reducidos).

20

Purificación de proteínas

Por cromatografía de afinidad de proteína A

Para la etapa de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna de proteína A (HiTrap Protein A FF, 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5. Después de una etapa de lavado con el mismo amortiguador, el anticuerpo se eluyó de la columna por elución por etapas con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3.0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizaron inmediatamente con fosfato de sodio 0.5 M, pH 8.0 (1:10), se reunieron y se concentraron por centrifugación. El concentrado se filtró bajo condiciones estériles y se procesó adicionalmente por

30

cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Por cromatografía de intercambio catiónico

5 Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la proteína concentrada se diluyó 1:10 con el amortiguador de elución utilizado para la etapa de afinidad y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Después de dos etapas de lavado con el amortiguador de equilibrio y un
10 amortiguador de lavado resp. de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, pH 5.0 y fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 5.0, la proteína se eluyó con un gradiente usando fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 8.5. Las
15 fracciones que contenían el anticuerpo deseado se agruparon, se concentraron por centrifugación, se filtraron estériles y se procesaron adicionalmente por una etapa de exclusión por tamaño.

Por cromatografía de exclusión por tamaño analítica

20 Para la etapa de exclusión por tamaño, la proteína concentrada se inyectó en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), e histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0 con o sin Tween20 como amortiguador de formulación. Las fracciones que contienen los monómeros se agruparon, se concentraron por centrifugación y se
25 esterilizaron en un vial estéril.

Medición de pureza y contenido de monómeros

La pureza y el contenido de monómeros de la preparación de proteína final se determinaron por CE-SDS (sistema Caliper LabChip
30 GXII (Caliper Life Sciences)) resp. de HPLC (columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh)) en un fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM,

0.02% (p/v) azida de sodio, amortiguador de pH 6.7.

Confirmación del peso molecular por análisis de LC-MS

Desglicosilación

5 Para confirmar la preparación homogénea de las moléculas, se analizó la solución de proteína final por análisis de LC-MS. Para remover la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, los constructos se trataron con PNGaseF (ProZyme). Por lo tanto, el pH de la solución de proteína se ajustó a pH 7.0 por la adición de 2 µl de
10 Tris 2 M a 20 µg de proteína con una concentración de 0.5 mg/ml. Se añadieron 0.8 µg de PNGaseF y se incubaron durante 12 h a 37°C.

Análisis LC-MS - Detección en línea

15 El método LC-MS se realizó en un Agilent HPLC 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realizó en una columna Macherey Nagel Polysterene; RP1000-8 (tamaño de partícula 8 µm, 4.6 x 250 mm; No. de catálogo 719510). El eluyente A fue 5% de acetonitrilo y 0.05% (v/v) de ácido fórmico en agua, el eluyente B fue 95% de acetonitrilo, 5% de agua y
20 0.05% de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue 1 ml/min, la separación se realizó a 40°C y 6 µg (15 µl) de una muestra de proteína obtenida con un tratamiento como se describió anteriormente.

Tiempo (min)	%B
0.5	15
10	60
12.5	100
14.5	100
14.6	15
16	15
16.1	100

Durante los primeros 4 minutos, el eluido se dirigió a los desechos para proteger el espectrómetro de masas de la contaminación por sal. La fuente de ESI funcionó con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350°C y una presión del nebulizador de 60 psi. Los espectros de MS se adquirieron usando un voltaje fragmentador de 380 V y se utilizó un rango de masa de 700 a 3200 m/z en modo de ión positivo. Los datos de MS fueron adquiridos por el software del instrumento desde 4 a 17 minutos.

Aislamiento de PBMC humanas de la sangre

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidas (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. Brevemente, la sangre se diluyó con PBS estéril y se superpusó cuidadosamente sobre un gradiente Histopaque (Sigma, H8889). Después de la centrifugación durante 30 minutos a 450 xg a temperatura ambiente (freno desconectado), se descartó parte del plasma por encima de la interfase que contenía PBMC. Las PBMC se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 50 ml y los tubos se rellenaron con PBS a un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 xg (freno encendido). El sobrenadante se descartó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 350 xg). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía 10% de FCS y 1% de L-alanil-L-glutamina (Biochrom, K0302) a 37°C, 5% de CO₂ en la incubadora hasta el inicio del ensayo.

Aislamiento de PBMC de cynomolgus primarias de sangre heparinizada

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación de densidad de sangre fresca de donantes cynomolgus sanos, como sigue: la sangre heparinizada se diluyó 1:3 con PBS estéril y el medio Lymphoprep (Axon Lab # 1114545) se diluyó a 90% con PBS estéril. Dos volúmenes de la sangre diluida se colocaron en capas sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y la fracción de PBMC se separó por centrifugación durante 30 minutos a 520 xg, sin freno, a temperatura ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml nuevo y se lavó con PBS estéril por centrifugación durante 10 minutos a 400 xg a 4°C. Se realizó una centrifugación a baja velocidad para remover las plaquetas (15 min a 150 x g, 4°C), y se contó automáticamente la población de PBMC resultante (ViCell) y se utilizó inmediatamente para ensayos adicionales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-BCMA

Ejemplo 1.1: producción de antígenos y reactivos de herramientas

Ejemplo 1.1.1: Dominio extracelular de BCMA recombinante, soluble y humano

Los dominios extracelulares de BCMA humano, cynomolgus y murino que se usaron como antígenos para las selecciones de expresión en fagos se expresaron transitoriamente como fusión de Fc monomérica N terminal en células HEK EBNA y sitio in vivo biotinilado específicamente a través de la coexpresión de BirA biotina ligasa en la secuencia de reconocimiento de la marca de avi localizada en el extremo C terminal de la parte de Fc que lleva la cadena del receptor (cadena de perilla de Fc). Los dominios extracelulares de BCMA humano y cynomolgus comprendían metionina 4 a asparagina 53 y metionina 4 a asparagina 52, respectivamente. Estos se fusionaron en el extremo N terminal a la bisagra de una IgG1 humana que permite la heterodimerización con una parte de Fc de IgG1 humana no fusionada

(cadena de agujero) por tecnología de perillas en agujeros.

Ejemplo 1.1.1A: Generación de anticuerpos anti-BCMA por maduración

1.1.1A.1 Bibliotecas y selecciones

5 Se construyeron dos bibliotecas con base en el anticuerpo 83A10. Estas bibliotecas se aleatorizaron en CDR1 y CDR2 de la cadena ligera (L1/L2 de 83A10) o CDR1 y CDR2 de la cadena pesada (H1/H2 de 83A10), respectivamente. Cada una de estas bibliotecas se construyó por 2 etapas posteriores de amplificación y montaje. Los productos de
10 montaje final se han digerido por NcoI/BsiWI para la biblioteca L1/L2 de 83A10, MunI y NheI para la biblioteca H1/H2 de 83A10, junto con vectores aceptores tratados similarmente basados en las preparaciones de plásmido del clon 83A10. Las siguientes cantidades de dominios V (parciales) aleatorizados digeridos y vectores aceptores digeridos se
15 ligaron para las bibliotecas respectivas (μg de dominio V/ μg de vector): biblioteca L1/L2 de 83A10 (3/10), biblioteca H1/H2 de a.m.83A10 (3/10), Ligaciones purificadas de L1/L2 de 83A10 y bibliotecas H1/H2 de 83A10 se agruparon, respectivamente, y se utilizaron para 15 transformaciones de células TG1 de E. coli para
20 cada una de las 2 bibliotecas, para obtener tamaños finales de biblioteca de 2.44×10^{10} para la biblioteca L1/L2 de 83A10, y 1.4×10^{10} para la biblioteca H1/H2 de a.m.83A10. Las partículas de fagémidos que muestran estas bibliotecas de Fab se rescataron y purificaron.

25 1.1.1A.2 Selecciones de clones

Las selecciones se realizaron contra el ectodominio del antígeno de maduración de células B humano o cyno (BCMA) al que se clonaron cadena arriba una Fc y una marca de avi. Antes de las selecciones, el agotador de Fc se revistió sobre placas de
30 neutravidina a una concentración de 500 nM. Las selecciones se realizaron de acuerdo con el siguiente patrón:

- 1) unión de $\sim 10^{12}$ partículas de fagémido de biblioteca L1/L2

de library.83A10 o biblioteca H1/H2 de 83A10 a agotador de Fc inmovilizado durante 1 h, 2) transferencia de partículas de fagémidos no unidas de la biblioteca L1/L2 de library.83A10 o biblioteca H1/H2 de 83A10 a BCMA humano o cyno 50 nM, 25 nM, 10 nM o 2 nM (dependiendo de la ronda de selección y biblioteca) durante 20 min, 3) adición de perlas de estreptavidina magnéticas durante 10 min, 4) lavado de perlas de estreptavidina magnéticas usando 10 × 1 ml de PBS/Tween® 20 y 10 × 1 ml de PBS, 5) elución de partículas de fago por la adición de 1 ml de TEA (triethylamina) 100 mM durante 10 min y neutralización por la adición de 500 µl de Tris ® 1M/HCl pH 7.4 y 6) re-infección de células TG1 de E. coli en fase logarítmica, infección con VCSM13 de fago auxiliar y posterior precipitación de PEG/NaCl de partículas de fagémidos para uso en rondas de selección posteriores.

Las selecciones se realizaron durante 3 rondas y las condiciones se ajustaron en 5 líneas de corriente para cada una de las 2 bibliotecas individualmente. En detalle, los parámetros de selección fueron:

Línea de corriente 1 (huBCMA 50 nM para la ronda 1, cynoBCMA 25 nM para la ronda 2, huBCMA 10 nM para la ronda 3), Línea de corriente 2 (huBCMA 50 nM para la ronda 1, huBCMA 10 nM para la ronda 2, huBCMA 2 nM para la ronda 3), Línea de corriente 3 (huBCMA 50 nM para la ronda 1, huBCMA 25 nM para la ronda 2, cynoBCMA 10 nM para la ronda 3), Línea de corriente 4 (huBCMA 50 nM para la ronda 1, cynoBCMA 25 nM para la ronda 2, cynoBCMA 10 nM para la ronda 3), Línea de corriente 5 (cynoBCMA 50 nM para la ronda 1, cynoBCMA 25 nM para la ronda 2, cynoBCMA 10 nM para la ronda 3).

Las cadenas pesadas de los anticuerpos de BCMA Mab 21, Mab 22, Mab 33 y Mab 42 se derivaron de la Línea de corriente 5 que utilizó solamente cynoBCMA.

1.1.1A.3 Método de detección

Los clones individuales se expresaron bacterianamente como

cultivos de 1 ml en un formato de 96 cavidades y los sobrenadantes se sometieron a una detección por ELISA. Los enlazantes específicos se definieron como señales mayores de 5x de fondo para BCMA humano y cyno y señales menores de 3x fondo para el agotador de Fc. Se
5 revistieron placas de retiro de 96 cavidades de neutravidina con huBCMA 10 nM, 10 nM cyBCMA o agotador de Fc 50 nM seguido de la adición de sobrenadantes bacterianos que contienen Fab y la detección de Fabs que se unen específicamente a través de sus marcas Flag utilizando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones
10 positivos a ELISA se expresaron bacterianamente como cultivos de 1 ml en formato de 96 cavidades y los sobrenadantes se sometieron a un experimento de detección cinética ProteOn. Se identificaron 500 clones positivos, la mayoría de ellos con afinidad similar.

15 1.1.1.A.4 Análisis de resonancia de plasmón superficial con Fab e IgG solubles

70 clones fueron probados posteriormente por SPR. Todos los experimentos se realizaron a 25°C utilizando PBST como amortiguador de corrida (PBS 10 mM, pH 7.4 y 0.005% (v/v) de Tween® 20). Un
20 biosensor ProteOn XPR36 equipado con chips de sensor GLC y GLM y reactivos de acoplamiento (acetato de sodio 10 mM, pH 4.5, sulfo-N-hidroxisuccinimida, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida [EDC] y etanolamina) fue comprado de BioRad Inc. (Hercules, CA). Las inmovilizaciones se realizaron a 30 µl/min en un
25 chip de GLM. IgG anti-hu de pAb (cabra), Ab específico de F(ab)2 (Jackson) se acopló en dirección vertical usando un procedimiento estándar de acoplamiento de amina: los seis canales de ligando se activaron durante 5 min con una mezcla de EDC (200 mM) y sulfo-NHS (50 mM). Inmediatamente después de que se activaron las superficies,
30 se inyectó IgG anti-hu de pAb (cabra), anticuerpo específico de F(ab)2 (50 µg/ml, acetato de sodio 10 mM, pH 5) a través de los seis canales durante 5 minutos. Finalmente, los canales se bloquearon con

una inyección de 5 min de etanolamina-HCl 1 M (pH 8.5). Los niveles de inmovilización finales fueron similares en todos los canales, variando desde 11000 a 11500 RU. Las variantes de Fab se capturaron de sobrenadantes de e. coli por inyección simultánea a lo largo de cinco de los canales horizontales completos separados (30 μ l/min) durante 5 min y dieron como resultado niveles que variaron desde 200 y 900 RU, dependiendo de la concentración de Fab en el sobrenadante; se inyectó medio acondicionado a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco en línea con fines de doble referencia. Las mediciones cinéticas de un disparo se realizaron por la inyección de una serie de diluciones de BCMA humano, cyno y de ratón (50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0 nM, 50 μ l/min) durante 3 min a lo largo de los canales verticales. La disociación se monitoreó durante 5 min. Los datos cinéticos se analizaron en ProteOn Manager v. 2.1. El procesamiento de los datos de punto de reacción implicó la aplicación de una referencia de interpuntos y una etapa de doble referencia utilizando una solución testigo amortiguadora en línea (Myszka, 1999). La información procesada desde inyecciones de replica de una sola toma era adaptada a un simple modelo de unión Langmuir sin transporte masivo (O'Shannessy et al., 1993).

Para las mediciones de IgG de sobrenadantes de producciones de HEK en formato de 6 cavidades, las variantes de IgG se capturaron de sobrenadantes de HEK293 por inyección simultánea a lo largo de cinco de los canales horizontales completos separados (30 μ l/min) durante 5 min y dieron como resultado niveles, desde 200 a 400 RU; se inyectó medio acondicionado a lo largo del sexto canal para proporcionar una solución testigo en línea con fines de doble referencia. Las mediciones cinéticas de un disparo se realizaron por la inyección de una serie de diluciones de BCMA humano, cyno y de ratón (25, 5, 1, 0.2, 0.04, 0 nM, 50 μ l/min) durante 3 minutos a lo largo de los canales verticales. La disociación se monitoreó durante 5 min. Los datos cinéticos se analizaron como se describió

anteriormente. Las medidas de OSK se resumieron en la Tabla 2D; i/m, medición no concluyente. Se encontró que la afinidad a huBCMA estuvo entre aproximadamente 50 pM a 5 nM. Se encontró que la afinidad a cynoBCMA estuvo entre aproximadamente 2 nM a 20 nM (pocos clones cayeron fuera del rango, ver Figura 17).

1.1.1A5. Selección adicional de clones de HC y LC

Debido a su experiencia los inventores seleccionaron de estos 70 clones adicionales 27 clones en base en sus propiedades de unión a huBCMA, cynoBCMA, murinoBCMA, y la relación, medidos en diferentes ensayos. De estos clones se seleccionaron clones 4VH y 9VL, lo que da como resultado 34 combinaciones de VH/VL. Se midió la afinidad de unión en células HEK-huBCMA (Figura 18 y Tabla 2E). Se descubrió que la unión de anticuerpos Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 y Mab 42 a huBCMA en células HEK no fue significativamente mejor que la unión de Mab 83A10 a células huBCMA-HEK. Sin embargo, se seleccionaron Mab21, Mab 22, Mab27, Mab33, Mab39 y Mab42 debido a sus propiedades generales, como afinidad por huBCMA, cynoBCMA, unión a líneas celulares de mieloma múltiple positivas a BCMA H929, L363 y RPMI-8226 por citometría de flujo, potencia de matanza de células de mieloma H929, L363 y RPMI-8226, de células de plasma de mieloma viables de aspirados de médula ósea de pacientes, y datos de farmacocinética (PK) y farmacodinamia (matanza de células positivas a BCMA) en monos cynomolgus.

Tabla 2C: Relación de anticuerpos con líneas de corriente

Mab No.	Derivado de biblioteca 2 (HC)	Clon HC	Derivado de biblioteca 1 (LC)	Clon LC
Mab 21	Línea de corriente 5	5F04	Línea de corriente 1	1D04
Mab 22	Línea de	5F04	Línea de	1C05

	corriente 5		corriente 1	
Mab 27	Línea de corriente 1	1A08	Línea de corriente 1	1D04
Mab 33	Línea de corriente 5	5D03	Línea de corriente 1	1D04
Mab 39	Línea de corriente 2	2E12	Línea de corriente 1	1D04
Mab 42	Línea de corriente 5	5F04	Línea de corriente 5	5A11

Tabla 2D: Mediciones de afinidad cinética de un disparo a BCMA humano, cynomolgus y de ratón

Mab No.	VH	VL	KD	KD	KD
			huBCMA	cyBCMA	muBCMA
83A10	pCON1532	pCON1080	1.5E-09	1.4E-08	i/m
Mab 21	pCON1531	pCON1522	2.8E-11	5.1E-11	7.3E-10
Mab 22	pCON1531	pCON1521	4.8E-11	i/m	9.0E-10
Mab 27	pCON1520	pCON1522	3.9E-13	1,0E-10	9.7E-10
Mab 33	pCON1530	pCON1522	1.7E-11	3.4E-11	4.9E-10
Mab 39	pCON1524	pCON1522	6.2E-11	2.7E-10	i/m
Mab 42	pCON1531	pCON1527	2.3E-10	3.9E-10	2.5E-09

5 **Tabla 2E:** Unión de variantes de IgG en células HEK-huBCMA

Mab No	VH	VL	EC50 de unión [nM]	EC50 de unión [µg/ml]
83A10	PCON1532	PCON1080	2.4	0.34
Mab 14	PCON1530	PCON1527	1.47	0.21

Mab 21	pCON1531	PCON1522	2.46	0.35
Mab 22	PCON1531	pCON1521	2.08	0.30
Mab 23	PCON1531	PCON1519	4.97	0.71
Mab 27	PCON1520	PCOM1522	10.57	1.52
Mab 28	PCON1520	PCOM1521	11.34	1.63
Mab 30	PCON1530	PCON1526	10.35	1.49
Mab 31	PCON1530	PCON1525	1.34	0.19
Mab 33	pCOM1530	PCON1522	1.18	0.17
Mab 34	PCON1530	PCON1521	1.24	0.18
Mab 35	PCON1530	PCON1519	1.63	0.23
Mab 39	PCON1524	PCON1522	1.73	0.25
Mab 42	PCON1531	pCON1527	2.10	0.30
Mab 44	PCON1520	PCON1527	1.55	0.22

Ejemplo 1.2: Células que expresan BCMA como herramientas

Ejemplo 1.2.1: Líneas celulares de mieloma humanas que expresan BCMA en su superficie y cuantificación del número de receptores de BCMA en la superficie celular

La expresión de BCMA se evaluó en cinco líneas celulares de mieloma humanas (NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 y JJN-3) por citometría de flujo. Se cultivaron células NCI-H929 ((H929) ATCC® CRL-9068™) en 80-90% de RPMI 1640 con 10-20% de FCS inactivado por calor y podrían contener L-Glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y mercaptoetanol 50 µM. Se cultivaron células RPMI-8226 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) en un medio que contenía 90% de RPMI 1640 y 10% de FCS inactivado por calor. Las células U266B1 ((U266) ATCC® TIB-196™) se cultivaron en medio RPMI-1640 modificado para contener L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 4500 mg/L de glucosa y 1500 mg/L de bicarbonato de sodio y 15% de FCS inactivado por calor. Se cultivó la línea celular L-363 (Leibniz Institute DSMZ - Colección

Alemana de microorganismos y cultivos celulares, DSMZ No. ACC 49) en 85% de RPMI 1640 y 15% de FCS inactivado por calor. La línea celular JJN-3 (DSMZ No. ACC 541) se cultivó en 40% de MEM de Dulbecco + 40% MDM de Iscove + 20% de FBS inactivado por calor. Brevemente, las
5 células se recolectaron, se lavaron, se contaron para su viabilidad, se resuspendieron a 50,000 células/cavidad de una placa de fondo redondo de 96 cavidades y se incubaron con anticuerpo anti-BCMA humano (Abcam, # ab54834, IgG1 de ratón) a 10 µg/ml durante 30 min a 4°C (para evitar la internalización). Se utilizó IgG1 de ratón como
10 control de isotipo (BD Biosciences, # 554121). Las células se centrifugaron luego (5 minutos a 350 xg), se lavaron dos veces y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC durante 30 minutos a 4°C. Al final del tiempo de incubación, las células se centrifugaron (5 minutos a 350 xg), se lavaron dos veces
15 con amortiguador FACS, se resuspendieron en 100 µl de amortiguador FACS y se analizaron en un dispositivo CantoII que ejecutaba el software FACS Diva. La cuantificación relativa del número de receptores de BCMA en la membrana de superficie de H929, RPMI-8226 y líneas celulares de mieloma U266B1 se evaluaron por análisis QIFIKIT
20 (Dako, n# K0078, siguiendo las instrucciones del fabricante). Las células H929 expresaron BCMA humano con la densidad más alta, hasta 5-6 veces más que otras líneas celulares de mieloma. H929 se considera como una línea celular de mieloma que expresa BCMA alto en comparación con U266 y L363 que son células de mieloma que expresan
25 BCMA media/baja, RPMI-8226 que son células de mieloma que expresan BCMA baja y JJN-3 que son células de mieloma que expresan BCMA muy bajo. La Tabla 3 resume el número relativo de receptores de BCMA en la superficie celular de líneas celulares de mieloma múltiple humanas por cada experimento (n = 5).

30

Tabla 3: Cuantificación del número de receptores de BCMA en la superficie de membrana de las líneas celulares de mieloma humanas

H929, L363, RPMI-8226, U266B1 y JJN-3

Líneas celulares de mieloma humanas	Capacidad específica de unión al antígeno (SABC)				
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16,970	/	11300	11228	/
U266 (B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072
JJN-3	/	/	/	/	650

Ejemplo 2: Ensayos de unión a BCMA: resonancia de plasmón superficial

Evaluación de la unión de anticuerpos anti-BCMA a BCMA recombinante por resonancia de plasmón superficial (SPR) de la siguiente manera. Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25°C con HBS-EP como amortiguador de corrida (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, 0.005% de Tensioactivo P20, Biacore, Freiburg/Alemania). Se determinó la avidéz de la interacción entre los anticuerpos anti-BCMA y Fc(kih) de BCMA recombinante (humano y cinomolgus). El Fc(kih) de BCMA humano y cynomolgus recombinante biotinilado se acopló directamente en un chip de SA después de las instrucciones (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización varió desde 200 a 700 RU. Los anticuerpos anti-BCMA se pasaron a un rango de concentración de 2 veces (1.95 a 500 nM) con un flujo de 30 µL/minuto a través de las células de flujo durante 120 segundos. La disociación se monitoreó durante 180 segundos. Las diferencias del índice de refracción masivo se corrigieron restando

la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, los anticuerpos anti-BCMA se hicieron fluir sobre una superficie vacía previamente activada y desactivada como se describe en el kit de acoplamiento de amina estándar. Las constantes cinéticas aparentes se derivaron utilizando el software de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica, a pesar de la bivalencia de la interacción para propósitos de comparación. La afinidad de la interacción entre anticuerpos anti-BCMA y Fc(kih) de BCMA humano recombinante también se determinó. El anticuerpo Fab antihumano (GE Healthcare) se acopló directamente en un chip de CM5 a pH 5.0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 6500 RU. El anticuerpo anti-BCMA fue capturado durante 90 segundos a 25 nM. El Fc(kih) de BCMA humano recombinante se pasó a un rango de concentración de 4 veces (1.95 a 500 nM) con un flujo de 30 μ L/minutos a través de las células de flujo durante 120 segundos. La disociación se monitoreó durante 120 segundos. Las diferencias del índice de refracción masivo se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, se hizo fluir BCMA recombinante sobre una superficie con anticuerpo Fab antihumano inmovilizado pero sobre el cual se había inyectado HBS-EP en lugar de anticuerpo anti-BCMA. Las constantes cinéticas se derivaron utilizando el software de evaluación Biacore T100 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica (Tabla 4).

Tabla 4. Constantes de afinidad determinadas por las ecuaciones de velocidad de ajuste para la unión de Langmuir 1:1

Ligando	Analito	Kon [1/Ms]	Koff [1/s]	KD [M]
---------	---------	------------	------------	--------

IgG de 83A10	Fc(kih) de huBCMA	5.07E + 05	2.92E-03	5.76E-09
	Fc(kih) de cynoBCMA	2.29E + 05	2.03E-02	8.86E-08
IgG de Mab 21	Fc(kih) de huBCMA	8.51 + 05	4.39E-05	5.16E-11
	Fc(kih) de cynoBCMA	4.91E + 05	2.35E-04	4.78E-10
IgG de Mab 22	Fc(kih) de huBCMA	8.14E + 05	5.15E-05	6.33E-11
	Fc(kih) de cynoBCMA	4.54E + 05	4.42E-04	9.74E-10
IgG de Mab 42	Fc(kih) de huBCMA	8.03E + 05	2.98E-04	3.71E-10
	Fc(kih) de cynoBCMA	7.07E + 05	4.53E-04	6,41-10
IgG de Mab 27	Fc(kih) de huBCMA	3.59E + 05	5.93E-05	1.65E-10
	Fc(kih) de cynoBCMA	2.16E + 05	4.55E-04	2.11E-09
IgG de Mab 33	Fc(kih) de huBCMA	2.00E + 05	3.55E-05	1.78E-10
	Fc(kih) de cynoBCMA	1.32E + 05	9.76E-05	7.39E-10
IgG de Mab 39	Fc(kih) de huBCMA	3.61E + 05	5.58E-05	1.55E-10
	Fc(kih) de	2.15E + 05	4.67E-04	2.17E-09

	cynoBCMA			
--	----------	--	--	--

Ejemplo 3: Abertura de afinidad humana/cynomolgus (hu/cyno)

Con base en los valores de afinidad descritos en el Ejemplo 2, se comparó la afinidad de los anticuerpos anti-BCMA con BCMA humano vs. BCMA cynomolgus y se calcularon los valores de relación de afinidad cyno/hu (abertura) (Tabla 5). La apertura de afinida cyno/hu se calculó como la afinidad del anticuerpo a BCMA cynomolgus dividida por la afinidad a BCMA humano y significa que el anticuerpo de BCMA se une a BCMA humano con x veces afinidad de unión que a BCMA cynomolgus, donde x = valor de apertura cyno/hu. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Afinidad de anticuerpos anti-BCMA a BCMA humano vs. BCMA cynomolgus y valores de apertura hu/cyno

IgG de α -BCMA	K_D de BCMA humano [M]	K_D de BCMA cynomolgus [M]	Abertura de afinidad cyno/hu
83A10	5.76E-09	8.86E-08	15.3
Mab 21	5.16E-11	4.78E-10	9.3
Mab 22	6.33E-11	9.74E-10	15.4
Mab 42	3.71E-10	6,41E-10	1.7
Mab 27	1.65E-10	2.11E-09	12.7
Mab 33	1.78E-10	7.39E-10	4.2
Mab 39	1.55E-10	2.17E-09	14

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3

Se generaron anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de acuerdo con WO2014/122144, que se incorpora como referencia.

5 **Ejemplo 4.1: Anticuerpos anti-CD3**

El término “CD3ε o CD3” como se usa en la presente se refiere a CD3ε humano descrito en UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). El término “anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3” se refiere a un anticuerpo que se une a CD3ε. Preferiblemente, el anticuerpo
10 comprende un dominio variable de VH que comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un dominio variable de VL que comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo
15 comprende los dominios variables de la SEQ ID NO: 7 (VH) y SEQ ID NO: 8 (VL). El anticuerpo anti-CD3 como se describió anteriormente se utilizó para generar los anticuerpos biespecíficos de células T que se usaron en los siguientes ejemplos.

20 **Ejemplo 4.2: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de formato 2 + 1 que contiene Fc**

Los ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras completas de los anticuerpos de IgG1 anti-BCMA correspondientes así como los ADNc de VH y VL de anti-CD3 se usaron como los materiales de
25 partida. Para cada anticuerpo biespecífico, se involucraron cuatro cadenas de proteínas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-BCMA correspondiente y las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, respectivamente. Con el fin de minimizar la formación de productos secundarios con cadenas
30 pesadas mal emparejadas, por ejemplo con dos cadenas pesadas del anticuerpo anti-CD3, se usa una región de Fc heterodimérica mutada que porta “mutaciones de perilla en agujero” y un enlace de disulfuro

diseñado, como se describe en WO2009080251 y en WO2009080252. Para minimizar la formación de productos secundarios con cadenas ligeras mal emparejadas, por ejemplo con dos cadenas ligeras del anticuerpo anti-BCMA, se aplicó un cruce de kappa constante de CH1 x a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 usando el metodología descrita en WO2009080251 y en WO2009080252.

a) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un formato 2 + 1 es decir (Fab)₂ biespecífico x anticuerpo (Fab) que es bivalente para BCMA y monovalente para CD3 tendría ventajas sobre la potencia, previsibilidad para la eficacia y seguridad porque se uniría preferentemente al BCMA de objetivo de tumor y evitaría el sumidero de anticuerpo CD3, por lo tanto, una mayor probabilidad de exposición al fármaco se centra en el tumor.

El anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 del formato 2 + 1 (es decir (Fab)₂ biespecífico x anticuerpo (Fab) bivalente para BCMA y monovalente para CD3 con Fc fueron producidos para los anticuerpos BCMA humanos seleccionados previamente. ADNc que codifican los Fab completos (dominios de VH y CH1 de cadena pesada más los dominios de VL y CL de cadena ligera) de los anticuerpos de IgG1 anti-BCMA correspondientes así como los ADNc de VH y VL anti-CD3 se usaron como los materiales de partida. Para cada anticuerpo biespecífico, las cuatro cadenas de proteína estuvieron implicadas comprendiendo las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-BCMA correspondiente y las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, respectivamente, con regiones de Fc.

Brevemente, cada anticuerpo biespecífico se produjo por co-transfección simultánea de cuatro vectores de expresión de mamífero que codifican, respectivamente: a) el ADNc de cadena ligera completa del anticuerpo BCMA correspondiente, b) un ADNc de fusión generado por métodos de biología molecular estándar, tal como PCR de empalme-superposición-extensión, que codifica una proteína de fusión hecha de

(en orden de extremo N a C terminal) secuencia líder secretora, Fab (CH seguida por dominios de CH1) del anticuerpo anti-BCMA correspondiente descrito anteriormente, un enlazante de glicerina(Gly)-serina(Ser) flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Fab (VH seguida por dominios de CH1) del anticuerpo anti-BCMA correspondiente descrito anteriormente, un enlazante de glicina(Gly)-serina(Ser) flexible con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, la VH del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente y el dominio kappa constante de un ADNc de cadena ligera humana, c) un ADNc de fusión generado por métodos de biología molecular estándar, tal como PC de empalme-superposición-extensión, que codifica una proteína de fusión hecha de (en orden de extremo N- a C- terminal) secuencia líder secretora, VL del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, dominio de CH1 constante de un ADNc de IgG1 humana. Co-transfección de células de mamíferos y producción y purificación de anticuerpos usando los métodos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos de IgG1 humanos o humanizados, con una modificación: para la purificación de anticuerpos, la primera etapa de captura no se realizó usando Proteína A, sino que se realizó usando una columna de cromatografía de afinidad empacada con una resina que se une a la región constante de cadena ligera kappa humana, tal como KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Además, se puede incluir un disulfuro para aumentar la estabilidad y los rendimientos, así como residuos adicionales que forman puentes iónicos y aumentar los rendimientos de heterodimerización (EP 1870459A1).

Para la generación de vectores de anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos de dos porciones de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y BCMA. Las porciones de unión al antígeno fueron fragmentos Fab compuestos de una cadena pesada y una cadena ligera, que comprendían cada una

una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab fue un fragmento "Crossfab", en donde se intercambiaron los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. El intercambio de dominios constantes de cadena pesada y ligera dentro del fragmento Fab asegura que los fragmentos Fab de especificidad diferente no tienen arreglos de dominio idénticos y, por consiguiente, no intercambian cadenas ligeras. El diseño de la molécula biespecífica fue monovalente para CD3 y bivalente para BCMA en donde un fragmento Fab se fusionó con el extremo N terminal del CrossFab interno (2 + 1). La molécula biespecífica contenía una parte de Fc para tener una vida media más larga. Una representación esquemática de los constructos se da en las Figuras 1-3; las secuencias de las construcciones preferidas se muestran en la Tabla 2A. Las moléculas se produjeron por co-transfección de células EBNA HEK293 que crecían en suspensión con los vectores de expresión de mamíferos usando solución basada en polímero. Para la preparación de constructos 2 + 1 CrossFab-IgG, las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una relación 1:2:1:1 ("Fc(perilla) de vector": "cadena ligera de vector": "cadena ligera de vector CrossFab": "cadena pesada de vector-CrossFab").

Ejemplo 4.3: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 para comparación

La generación de BCMA50-sc(Fv)₂ (también conocido como BCMA50-BiTE®), anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 y las secuencias de aminoácidos usadas fueron de acuerdo con WO2013072406 y WO2013072415.

Ejemplo 5: Producción y purificación de anticuerpos biespecíficos de células T que contienen Fc de anti-BCMA/anti-CD3 (2 + 1) con variantes de carga

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-

CD3 se produjeron y purificaron de acuerdo con WO2014/122144, que se incorpora como referencia.

Para la producción de los anticuerpos biespecíficos, se expresaron anticuerpos biespecíficos por cotransfección transitoria de los respectivos vectores de expresión de mamífero en células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión, usando una solución basada en polímero. Un día antes de la transfección, las células HEK293-EBNA se sembraron a 1.5 células viables Mio/ml en medio Ex-Cell, suplementado con L-Glutamina 6 mM. Por cada ml de volumen de producción final se centrifugaron 2.0 células viables Mio (5 minutos a 210 x g). El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 100 µl de medio CD CHO. El ADN para cada ml de volumen de producción final se preparó mezclando 1 µg de ADN (relación de cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena ligera: cadena ligera modificada = 1:1:2:1) en 100 µl de medio CD CHO. Después de la adición de 0.27 µL de solución basada en polímeros (1 mg/mL) la mezcla se sometió a vórtice durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, las células resuspendidas y mezcla de ADN/solución a base de polímero se pusieron juntas y luego se transfirieron en un recipiente adecuado que se colocó en un dispositivo de agitación (37°C, 5% de CO₂). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añadieron 800 µl de medio Ex-Cell, suplementado con L-Glutamina 6 mM, ácido valproico 1.25 mM y 12.5% de Pepsoy (50 g/l) por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se añadieron 70 µL de solución de alimentación por cada mL de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular fue igual o menor de 70%, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación y filtración estéril. Los anticuerpos se purificaron por una etapa de afinidad y una o dos etapas de pulido, siendo la cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando fue necesario, se utilizó una etapa de pulido adicional.

Para la etapa de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna de proteína A (HiTrap Protein A FF, 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5. Después de una etapa de lavado con el mismo amortiguador, el anticuerpo se eluyó de la columna por elución por paso con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3.0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizaron inmediatamente con fosfato de sodio 0.5 M, pH 8.0 (1:10), se agruparon y se concentraron por centrifugación. El concentrado se filtró bajo condiciones estériles y se procesó adicionalmente por cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la proteína concentrada se diluyó 1:10 con el amortiguador de elución utilizado para la etapa de afinidad y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Después de dos etapas de lavado con el amortiguador de equilibrio y un amortiguador de lavado resp. de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, pH 5.0 y fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 5.0, la proteína se eluyó con un gradiente usando fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM pH 8.5. Las fracciones que contenían el anticuerpo deseado se agruparon, se concentraron por centrifugación, se filtraron estériles y se procesaron adicionalmente por una etapa de exclusión por tamaño.

Para la etapa de exclusión por tamaño, la proteína concentrada se inyectó en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), e histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0 con o sin Tween20 como amortiguador de formulación. Las fracciones que contenían los monómeros se agruparon, se concentraron por centrifugación y se esterilizaron en un vial estéril.

La determinación de la concentración de anticuerpo se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de

la absorbancia de una solución al 0.1% del anticuerpo. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó por el software GPMW (datos de Lighthouse).

La pureza y contenido de monómero de la preparación final de proteína se determinó por CE-SDS (sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)) resp. de HPLC (columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh)) en un fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, 0.02% (p/v) de azida de sodio, amortiguador de pH 6.7.

Para verificar el peso molecular de las preparaciones de proteína finales y confirmar la preparación homogénea de las moléculas de la solución de proteína final, se utilizó cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Primero se realizó una etapa de desglucosilación. Para remover la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, los constructos se trataron con PNGaseF (ProZyme). Por lo tanto, el pH de la solución de proteína se ajustó a pH 7.0 añadiendo 2 μ l de Tris 2 M a 20 μ g de proteína con una concentración de 0.5 mg/ml. Se añadieron 0.8 μ g de PNGaseF y se incubaron durante 12 h a 37°C. La detección en línea de LC-MS luego se realizó. El método de LC-MS se realizó en un Agilent HPLC 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realizó en una columna Macherey Nagel Polysterene; RP1000-8 (tamaño de partícula de 8 μ m, 4.6 x 250 mm; No. de catálogo 719510). El eluyente A fue 5% de acetonitrilo y 0.05% (v/v) de ácido fórmico en agua, el eluyente B fue 95% de acetonitrilo, 5% de agua y 0.05% de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue 1 ml/min, la separación se realizó a 40°C y 6 μ g (15 μ l) de una muestra de proteína obtenida con un tratamiento como se describió anteriormente.

Durante los primeros 4 minutos, el eluido se dirigió a los desechos para proteger el espectrómetro de masas de la contaminación de sal. La fuente de ESI funcionó con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350°C y una presión del nebulizador de 60

psi. Los espectros de MS se adquirieron usando un voltaje fragmentador de 380 V y usando un rango de masa de 700 a 3200 m/z en modo de ión positivo. Los datos de MS fueron adquiridos por el software del instrumento desde 4 a 17 minutos.

5 La Figura 10 de EP14179705 (incorporado como referencia) representa las gráficas de CE-SDS (no reducidas) de las preparaciones de proteínas finales después de diferentes métodos de purificación para los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. La cromatografía de afinidad de proteína A (PA) y las etapas de purificación
10 cromatográfica de exclusión por tamaño (SEC) aplicadas al anticuerpo 83A10-TCB dieron como resultado una pureza de < 30% y 82.8% de contenido de monómero (A). Cuando se aplicaron etapas de purificación adicionales, incluyendo la cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y etapas cromatográficas de exclusión por tamaño final (re-
15 SEC) a las preparaciones de proteínas finales en (A), la pureza se aumentó a 93.4% pero el contenido de monómero permaneció igual y el rendimiento se redujo significativamente a 0.42 mg/L. Sin embargo, cuando se aplicaron modificaciones de carga específicas a CL-CH1 de Fab anti-BCMA de 83A10, principalmente el anticuerpo 83A10-TCBcv, un
20 perfil superior de producción/purificación de la molécula de TCB, demostrado por una pureza de 95.3%, contenido de monómero de 100% y un rendimiento de hasta 3.3 mg/L, ya se pudo observar incluso cuando se aplicaron etapas de purificación de PA + cIEX + SEC (C) en comparación con (B) con un perfil de producción/purificación que
25 muestra un rendimiento de 7.9 veces menor y 17.2% menor contenido de monómero a pesar de incluir una etapa de purificación de re-SEC adicional.

 Luego se realizó una corrida de producción comparativa para comparar el perfil de producción/purificación de los anticuerpos
30 83A10-TCB vs. 83A10-TCBcv para evaluar mejor las ventajas de las modificaciones de carga de CL-CH1 aplicadas a los anticuerpos. Las moléculas de 83A10-TCB y 83A10-TCBcv son ambas de formato molecular

como se describe en la Figura 2a. Como se representa en la Figura 11, las propiedades de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se midieron lado a lado y se compararon después de cada etapa de purificación 1) cromatografía de afinidad de PA solamente (A, B), 2) 5 cromatografía de afinidad de PA luego SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad de PA luego SEC, luego cIEX y re-SEC (E, F). Las gráficas de CE-SDS (no reducidas) de las soluciones de proteínas finales después de los respectivos métodos de purificación para los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se demuestran en la Figura 11 de 10 EP14179705 (incorporado como referencia). Como se muestra en las Figuras 11A y 11B de EP14179705 (incorporado como referencia), ya se observaron mejoras con la aplicación de las variantes de carga al anticuerpo de TCB después de la purificación por cromatografía de afinidad de PA solamente. En este estudio comparativo, la etapa de 15 purificación por cromatografía de afinidad de PA aplicada al anticuerpo 83A10-TCB dio como resultado una pureza de 61.3%, un rendimiento de 26.2 mg/l y 63.7% de contenido de monómero (11A). En comparación, cuando el anticuerpo 83A10-TCBcv se purificó por cromatografía de afinidad de PA, todas las propiedades se mejoraron 20 con una mejor pureza de 81.0%, un mejor rendimiento de 51.5 mg/l y 68.2% de contenido de monómero (11B). Cuando se aplicó una etapa adicional de purificación de SEC a las preparaciones de proteínas finales como se ve en las Figuras 12A y 12B de EP14179705 (incorporado como referencia), el 83A10-TCB obtuvo una pureza de 25 69.5%, un rendimiento de 14.1 mg/L y 74.7% de contenido de monómero (C) en comparación con 83A10-TCBcv con pureza mejorada y contenido de monómero de hasta 91.0% y 83.9% respectivamente, y un rendimiento de 10.3 mg/L (D). Aunque el rendimiento fue ligeramente menor (es decir, 27% menos) para 83A10-TCBcv que para 83A10-TCB en este experimento 30 particular, el porcentaje de molécula correcto fue mucho mejor para 83A10-TCBcv que para 83A10-TCB, respectivamente, 90% vs. 40-60%, de acuerdo con lo medido por LC-MS. En la tercera comparación directa,

las preparaciones de proteínas finales de 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de las Figuras 11C y 11D de EP14179705 (incorporado como referencia) se agruparon con aproximadamente 1 l (equivolumen) de preparaciones de proteínas finales respectivas de otro lote de purificación (misma producción) después de la etapa de purificación por cromatografía de afinidad de PA solamente. Las las preparaciones de proteínas agrupadas luego se purificaron adicionalmente por métodos de purificación de cIEX y SEC. Como se representa en las Figuras 11E y 11F de EP14179705 (incorporado como referencia), la mejora del perfil de producción/purificación del anticuerpo de TCB con las variantes de carga se observó consistentemente cuando se comparó con el anticuerpo de TCB sin variante de carga. Después de varias etapas de métodos de purificación (es decir, PA +/- SEC + cIEX + SEC) para purificar el anticuerpo 83A10-TCB, se alcanzó solamente el 43.1% de pureza y 98.3% del contenido de monómero pero en detrimento del rendimiento que se redujo a 0.43 mg/l. El porcentaje de molécula correcta medido por LC-MS todavía fue pobre con 60-70%. Al final, la calidad de la preparación de proteína final no fue aceptable para uso in vitro. En marcado contraste, cuando se aplicaron las mismas etapas de purificación múltiples con la misma cronología al anticuerpo 83A10-TCBcv, se alcanzaron 96.2% de pureza y 98.9% de contenido de monómero, así como 95% de molécula correcta, medido por LC-MS. Sin embargo, el rendimiento también se redujo en gran medida a 0.64 mg/l después de la etapa de purificación de cIEX. Los resultados muestran que se puede lograr una mejor pureza, mayor contenido de monómero, mayor porcentaje de molécula correcta y mejor rendimiento con el anticuerpo 83A10-TCBcv solamente después de dos etapas de purificación estándar, es decir cromatografía de afinidad de PA y SEC (Figura 11D de EP14179705) mientras que tales propiedades no podrían lograrse con 83A10-TCB incluso cuando se aplicaron etapas de purificación adicionales (Figura 11E de EP14179705).

La Tabla 12 de EP14179705 (incorporado como referencia)

resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv después de la etapa de purificación de PA. La Tabla 13 de EP14179705 (incorporado como referencia) resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv después de las etapas de purificación de PA y SEC. La Tabla 14 de EP14179705 (incorporado como referencia) resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv después de PA y SEC más PA solo, luego de las etapas de purificación de cIEX y re-SEC. Para las Tablas 12 a 14 de EP14179705 (incorporado como referencia), los valores en negrita resaltan la propiedad superior en comparación con 83A10-TCB vs. 83A10-TCVcv. Con una excepción (es decir, el rendimiento, respectivamente, la cantidad, ver Tabla 13 de EP14179705 (incorporado como referencia)) que puede no ser representativo, todos los parámetros y valores de producción/purificación resultantes de los 3 experimentos de comparación comparativos fueron superiores para 83A10-TCBcv en comparación con 83A10-TCB. Los resultados generales demuestran claramente que las ventajas en las características de producción/purificación podrían lograrse aplicando modificaciones de carga de CL-CH1 a los anticuerpos de TCB y que solamente se requieren dos etapas de purificación (es decir, cromatografía de afinidad de PA y SEC) para lograr preparaciones de proteína ya de alta calidad con muy buenas propiedades de revelado. Con base en las propiedades de producción/purificación mejoradas de 83A10-TCBcv, 21-TCBcv, 22-TCBcv, 27-TCBcv, 33-TCBcv, 39-TCBcv y 42-TCBcv se generaron con variantes de carga, de forma similar a 83A10-TCBcv.

Tabla 6: Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de la etapa de purificación por cromatografía de afinidad de proteína A.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	61.3	81.0

Rendimiento (mg/L)	26.2	51.5
Cantidad (mg)	24.3	50.2
Monómero (%)	63.7	68.2
Molécula correcta por LC-MS (%)	n.d.	n.d.

Tabla 7: Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de las etapas de purificación por cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	69.5	91.0
Rendimiento (mg/L)	14.1	10.3
Cantidad (mg)	13.1	10.0
Monómero (%)	74.7	83.9
Molécula correcta por LC-MS (%)	40-60	90

Tabla 8: Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 después de 1.a) cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño y 1.b) cromatografía de afinidad de proteína A agrupada solamente luego 2) cromatografía de intercambio catiónico y 3) etapas de purificación por cromatografía de exclusión por tamaño final

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
--	-----------	-------------

Pureza (%)	43.1	96.2
Rendimiento (mg/L)	0.43	0.64
Cantidad (mg)	0.73	1.27
Monómero (%)	98.3	98.9
Molécula correcta por LC-MS (%)	60-70%	> 95%

Ejemplo 6: Unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a líneas celulares de mieloma múltiple positivas a BCMA (citometría de flujo)

5 Los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv, 83A10-TCBcv) se analizaron por citometría de flujo para la unión a BCMA humano en células H929, L363 y RPMI-8226 que expresaban BCMA. Se utilizó MKN45 (línea celular de adenocarcinoma gástrico humano que no expresa BCMA) como control negativo.

10 Brevemente, las células cultivadas se recolectaron, se contaron y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables luego se ajustaron a 2×10^6 células por ml en amortiguador de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 100 μ l de esta suspensión celular se dividieron en alícuotas adicionalmente por cavidad en una placa de

15 96 cavidades de fondo redondo y se incubaron con 30 μ l de los anticuerpos anti-BCMA o el control de IgG correspondiente durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (y controles de TCB) se titularon y se analizaron en un rango de concentración final entre 1-300 nM. Las células se centrifugaron

20 luego (5 min, 350 xg), se lavaron con 120 μ l/cavidad de amortiguador de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado PE con fluorocromo, fragmento Fc específico de IgG anti-

humana de cabra (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Las células luego se lavaron dos veces con amortiguador de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 μ l de amortiguador de fijación BD por cavidad (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120 μ l de amortiguador FACS y se analizaron usando BD FACS CantoII. Cuando correspondió, se calculó la EC50 utilizando Prism GraphPad (LaJolla, CA, EUA) y los valores de EC50 que indican la concentración de anticuerpo necesaria para alcanzar el 50% de la unión máxima para la unión de anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 a células H929, células L363 y células RPMI-8226, se resumen en la Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10, respectivamente. El asterisco denota valores de EC50 estimados extrapolados y calculados por el software Prism. Los valores de EC50 para la unión de 21-TCBcv a las células L363 y la unión de 22-TCBcv a las células RPMI-8226 no pudieron estimarse.

Tabla 8: Valores de EC50 para la unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de mieloma múltiple H929

EC50 estimada	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	12.0	11.0	7.9	13.6
μ g/ml	1.725	1.589	1.142	1.956

Tabla 9: Valores de EC50 para la unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de mieloma múltiple L363

EC50 estimada	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	17.4	/	30.0	3.8
μ g/ml	2.507	/	4.328	0.5534

Tabla 10: Valores de EC50 para la unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de mieloma múltiple RPMI-8226

EC50 estimada	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	~ 188428*	6.8	/	13.2
µg/ml	~ 27151*	0.9817	/	1.907

5 Ejemplo 7: Producción de citocina de células T activadas tras la unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células T Positivas a CD3 y líneas celulares de mieloma múltiple positivas a BCMA (análisis de CBA de ensayo de liberación de citocina)

10 Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir de nuevo la producción de citocina mediada por células T en la presencia o ausencia de células de mieloma humano que expresan BCMA humano (RPMI-8226, JJN-3). Brevemente, se aislaron PBMC humanas de capas leucocitarias y se
 15 sembraron 0.3 millones de células por cavidad en una placa de 96 cavidades de fondo redondo. Alternativamente, 280 µl de sangre completa de un donante sano se colocaron en placas por cavidad de una placa de 96 cavidades de cavidades profundas. Se añadieron las células de objetivo de tumor positivas a BCMA para obtener una
 20 relación E:T final de 10:1. Se agregaron anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 y controles para obtener una concentración final de 0.1 pM - 10 nM. Después de una incubación de hasta 24 h a 37°C, 5% de CO₂, la placa de ensayo se centrifugó durante 5 min a 350 x g y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 cavidades de
 25 cavidad profunda para el análisis posterior. El análisis de CBA se realizó en FACS CantoII de acuerdo con las instrucciones del

fabricante, utilizando ya sea el Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD # 551809) o la combinación de los siguientes CBA Flex Set: granzima B humana (BD #560304), Flex Set de IFN- γ humano (BD # 558269), Flex Set de TNF- α humano (BD # 558273), Flex Set de IL-10 humana (BD # 558274), Flex Set de IL-6 humana (BD # 558276), Flex Set de IL-4 humana (BD # 558272), Flex Set de IL-2 humana (BD # 558270). La Tabla 13 muestra que 83A10-TCBcv indujo un aumento dependiente de la concentración en la producción de citocinas y granzima B de serina proteasa, un marcador de la función de las células T citotóxicas. La Tabla 11 muestra los valores de EC50 y la cantidad de citocinas/proteasas secretadas por concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

Tabla 11. Secreción de citocinas y proteasas inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en la presencia de células RPMI-8226

Citocinas /proteasas	EC50 (nM)	Concentración de 83A10-TCBcv (nM)						
		0.000 64	0.00 32	0.01 6	0.08	0.4	2	10
TNF- α (pg/mL)	0.52	-6.95	- 6.49	- 0.65	46.7 2	161. 24	315. 11	371. 47
IL-10 (pg/mL)	0.30	-9.21	1.95	25.1 7	125. 82	401. 42	602. 64	680. 05
Granzima B (pg/mL)	0.34	220.5 4	331. 55	889. 13	5855.0 2	15862. 84	21270. 43	27120. 52

Ejemplo 8: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de mieloma H929 que expresan alto BCMA inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación

de LDH colorimétrico)

Los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron en cuanto a su potencial para inducir la apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan alto BCMA tras la reticulación del constructo a través de la unión de las porciones de unión al antígeno a BCMA en las células. Brevemente, se recolectaron células objetivo de mieloma múltiple H929 que expresan alto BCMA humano con amortiguador de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30,000 células por cavidad se colocaron en placas en una placa de 96 cavidades de fondo redondo y se añadió la respectiva dilución del constructo para una concentración final deseada (por triplicado); concentraciones finales que variaron de 0.1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todos los constructos de TCB y controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron PBMC humanas (células efectoras) en los cavidades para obtener una relación E:T final de 10:1, que corresponde a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células T para 1 célula objetivo de tumor. Los grupos de control negativo se representaron solamente por células efectoras o de objetivo. Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células objetivo H929 de MM (= 100%) por la incubación de las células objetivo con una concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por células objetivo co-incubadas solamente con células efectoras, es decir, sin algún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 20-24h o 48h de incubación a 37°C, 5% de CO₂, la liberación de LDH de las células objetivo de MM apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió luego con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se graficó contra las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas de concentración-respuesta. Los valores de EC50 se midieron

usando el software Prism (GraphPad) y se determinó como la concentración de anticuerpo de TCB que da como resultado un 50% de la liberación máxima de LDH. Como se muestra en la Figura 4, todos los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (21-, 22-, 42- y 83A10-TCBcv) indujeron una muerte dependiente de la concentración de células de mieloma H929 positivas a BCMA, medida por la liberación de LDH. La lisis de las células H929 fue específica ya que el anticuerpo de TCB de control que no se une a las células objetivo positivas a BCMA pero solamente a CD3 en las células T no indujo la liberación de LDH, incluso a la concentración más alta probada. La Tabla 12 resume los valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células H929 que expresan alto BCMA inducida por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3.

Tabla 12: Valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células H929 inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos de TCB anti- BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)					
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6
21-TCBcv	97.1	/	42.1	53.9	38.7	/
22-TCBcv	53.2	/	42.2	23.2	28.9	/
42-TCBcv	9.7	/	11.7	7.2	6.8	/
83A10-TCBcv	3.9	/	8.5	5.0	4.3	1.5

Ejemplo 9: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de mieloma L363 que expresan medio/bajo BCMA inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de LDH)

Los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 también se analizaron por su capacidad de inducir apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan medio/bajo BCMA tras la reticulación del constructo a través de la unión de las porciones de unión al

antígeno a BCMA en las células. Brevemente, las células objetivo de mieloma múltiple L363 que expresan medio/bajo BCMA humano se recolectaron con amortiguador de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30,000 células por cavidad se sembraron en una placa de 96 cavidades de fondo redondo y la dilución respectiva de la construcción se añadió para una concentración final deseada (por triplicado); concentraciones finales que variaron desde 0.1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todos los constructos y controles de TCB se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron PBMC humanas (células efectoras) a las cavidades para obtener una relación E:T final de 10:1, que corresponde a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células T para 1 célula objetivo de tumoral. Los grupos de control negativos se representaron solamente por células efectoras o de objetivo. Para la normalización, la lisis máxima de las células objetivo de MM (= 100%) se determinó por la incubación de las células objetivo con una concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por células objetivo co-incubadas solamente con células efectoras, es decir, sin algún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 20-24 h de incubación a 37°C, 5% de CO₂, la liberación de LDH desde las células objetivo de MM apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió luego con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se graficó contra las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas de concentración-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el software Prism (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo de TCB que da como resultado un 50% de LDH máxima. Como se muestra en la Figura 5, todos los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (21-, 22-, 42- y 83A10-TCBcv) indujeron una matanza dependiente de la concentración de células de mieloma L363

positivas a BCMA, medida por la liberación de LDH. La lisis de las células L363 fue específica ya que el anticuerpo de TCB de control que no se une a las células objetivo positivas a BCMA sino solamente a CD3 en las células T no indujo la liberación de LDH, incluso a la concentración más alta probada. La Tabla 13 resume los valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células L363 que expresan medio/bajo BCMA inducida por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3.

Tabla 13: Valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células L363 inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5
21-TCBcv	83.6	38.4	18.9	19.1	46.4
22-TCBcv	97.5	27.7	16.5	14.6	56.0
42-TCBcv	15.5	16.7	5.2	2.2	10.6
83A10-TCBcv	16.8	47.8	28.4	12.6	39.0

Ejemplo 10: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de mieloma RPMI-8226 que expresan medio/bajo BCMA inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de LDH)

Los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron en cuanto a su capacidad para inducir la apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan medio/bajo BCMA tras la reticulación del constructo a través de la unión de las porciones de unión al antígeno a BCMA en las células. Brevemente, las células objetivo de mieloma múltiple L363 que expresan medio/bajo BCMA humano se recolectaron con amortiguador de disociación celular, se lavaron y se

resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30,000 células por cavidad se colocaron en placas en una placa de 96 cavidades de fondo redondo y la dilución respectiva del constructo se añadió para una
5 concentración final deseada (por triplicado); concentraciones finales que variaron desde 0.1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todos los constructos y controles de TCB se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron PBMC humanas (células efectoras) a las cavidades para obtener una relación E:T final de 10:1, que
10 corresponde a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células T para 1 célula objetivo de tumor. Los grupos de control negativos se representaron solamente por células efectoras o de objetivo. Para la normalización, la lisis máxima de las células objetivo de MM (=100%) se determinó por la incubación de las células objetivo con una
15 concentración final de 1% de Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por células objetivo co-incubadas solamente con células efectoras, es decir, sin algún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 20-24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂, la liberación de LDH de las células
20 objetivo de MM apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió luego con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se graficó contra las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas
25 de concentración-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el software Prism (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo de TCB que da como resultado un 50% de la liberación máxima de LDH. Como se muestra en la Figura 6, todos los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (21-, 22-, 42- y 83A10-TCBcv) indujeron una
30 muerte dependiente de la concentración de células de mieloma RPMI-8226 positivas a BCMA, medida por liberación de LDH. La lisis de las células RPMI-8226 fue específica ya que el anticuerpo de TCB de

control que no se une a células objetivo positivas a BCMA sino solamente a CD3 en células T no indujo la liberación de LDH, incluso a la concentración más alta probada. La Tabla 13 resume los valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células RPMI-8226 que expresan medio/bajo BCMA inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3.

Tabla 13: Valores de EC50 para la matanza de células T redirigidas de células RPMI-8226 inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5
21-TCBcv	/	41.3	8.8	4.0	8.4
22-TCBcv	/	47.6	7.6	3.2	5.5
42-TCBcv	/	382.8	18.7	3.5	1.5
83A10-TCBcv	/	620.5	229.3	35.0	64.9

Ejemplo 11: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de mieloma JJN-3 que expresan bajo BCMA inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo y liberación de LDH)

Los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron en cuanto a su capacidad para inducir la apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan bajo BCMA tras la reticulación del constructo a través de la unión de las porciones de unión al antígeno a BCMA en las células. Brevemente, las células objetivo de mieloma múltiple JJN-3 que expresan bajo BCMA humano se recolectaron con amortiguador de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30,000 células por cavidad se colocaron en placa en

una placa de 96 cavidades de fondo redondo y se añadió la dilución respectiva de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); concentraciones finales que variaron desde 0.1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todos los constructos y controles de TCB se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron PBMC humanas (células efectoras) a las cavidades para obtener una relación E:T final de 10:1, que corresponde a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células T para 1 célula objetivo de tumor. Los grupos de control negativos se representaron solamente por células efectoras o de objetivo. Para la normalización, la lisis máxima de las células objetivo de MM (= 100%) se determinó por la incubación de las células objetivo con una concentración final de 1% Triton X-100, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por células objetivo co-incubadas solamente con células efectoras, es decir, sin algún anticuerpo biespecífico de células T. i) Después de 48 h de incubación a 37°C, 5% de CO₂, las células de mieloma cultivadas se recolectaron, se lavaron y se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo y Anexina-V para la determinación de células de mieloma apoptóticas. El panel de tinción comprendía CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/Anexina-V-PerCP-Cy5.5. Los anticuerpos marcados con fluorocromo usados se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA). La adquisición se realizó usando un citómetro de flujo multicolor y un software instalado (por ejemplo, un dispositivo CantoII que ejecuta el software FACS Diva o el citómetro de flujo FACSCalibur que usa el software CellQUEST). El programa Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences) se utilizó para el análisis de datos. La anexina-V se midió en células JJN-3 y el porcentaje de células JJN-3 positivas a anexina se graficó contra la concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. El porcentaje de lisis de las células JJN-3 inducidas por una concentración específica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 también se

determinó midiendo el recuento absoluto de células JJN-3 negativas a anexina-V a una concentración dada de TCB y restándolo del recuento absoluto de células JJN-3 negativas a anexina-V sin TCB; dividido por el recuento absoluto de células JJN-3 negativas a anexina sin TCB. La

5 Figura 7 muestra que los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (22-, 42- y 83A10-TCBcv) indujeron una matanza dependiente de la concentración de células de mieloma JJN-3 que expresan bajo BCMA, medida por citometría de flujo. La lisis de las células JJN-3 fue específica ya que el anticuerpo de TCB de control que no se une a

10 células objetivo positivas a BCMA sino solamente a CD3 en células T no indujo el aumento de células JJN-3 positivas a anexina-V o lisis de células JJN-3, incluso a la concentración más alta probada. La Tabla 14 y Tabla 15 resumen respectivamente los porcentajes de células JJN-3 positivas a anexina-V y porcentajes de lisis de células

15 JJN-3 inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3.

La detección de LDH también se realizó después de 20-24 h o 48 h de incubación a 37°C, 5% de CO₂. La liberación de LDH desde las células objetivo de MM JJN-3 apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió luego con el kit de detección de LDH (Roche

20 Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se graficó contra las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas de concentración-respuesta. Los valores de EC50 se midieron utilizando el software Prism (GraphPad) y se determinaron como la

25 concentración de anticuerpo de TCB que da como resultado un 50% de liberación máxima de LDH.

Tabla 14. Matanza de células T redirigidas de células JJN-3 que expresan bajo BCMA inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-

30 CD3: porcentajes de células positivas a anexina-V

Experimento 1

Células JJN-3 positivas a anexina V (%)	Concentración de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	16.78	10.21	9.12	11.11	11.36	8.14	9.6
42-TCBcv	24.83	16.84	8.62	12.3	11.9	/	9.6
22-TCBcv	22.95	26.15	12.48	13.29	9.3	12.48	9.6
TCB de control	8.84	/	/	/	/	/	/
Experimento 2							
Células JJN-3 positivas a anexina V (%)	Concentración de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	22.86	17.53	16.5	15.94	14.32	13.07	10.74
42-TCBcv	26.88	21.68	14.42	13.6	13.47	12.75	10.74
22-TCBcv	29.72	26.97	18.35	15.94	15	14.8	10.74
TCB de control	12.82	/	/	/	/	/	/

Tabla 15. Matanza de células T redirigidas de células JJN-3 que expresan bajo BCMA inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3: porcentajes de lisis de células JJN-3

Experimento 1							
Lisis de células JJN-3 (%)	Concentración de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	70.30	26.66	18.43	41.88	24.42	- 14.45	0.00
42-TCBcv	92.92	84.02	41.87	38.96	40.29	/	0.00
22-TCBcv	88.02	90.54	56.26	73.56	-4.29	26.28	0.00
TCB de control	-6.55	/	/	/	/	/	/

Experimento 2							
Lisis de células JJN-3 (%)	Concentración de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	51.18	25.30	20.12	39.58	-1.88	22.28	0.00
42-TCBcv	90.37	81.12	55.32	39.44	34.94	17.62	0.00
22-TCBcv	91.21	94.12	53.03	41.66	24.36	36.47	0.00
TCB de control	4.18	/	/	/	/	/	/

Ejemplo 12: Expresión de BCMA en células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple

Las líneas celulares humanas que expresan el objetivo de tumor de interés son herramientas muy útiles y prácticas para la medición de la potencia del anticuerpo de TCB para inducir citotoxicidad de células de tumor en la presencia de células T y determinación de valores de EC50 y para la clasificación de moléculas de TCB. Sin embargo, a pesar de ser fácilmente accesibles y prácticas, las líneas celulares de mieloma humanas tienen la salvedad de no representar la heterogeneidad del mieloma múltiple, una enfermedad muy compleja que se caracteriza por una heterogeneidad significativa al nivel molecular. Además, las líneas celulares de mieloma no expresan el receptor de BCMA con la misma intensidad y densidad ya que algunas células expresan BCMA más fuertemente que otras (por ejemplo, las células H929 vs. las células RPMI-8226), y tal heterogeneidad a nivel celular también se puede observar entre diferentes pacientes. A lo largo de colaboraciones académicas con líderes de opinión clave en el mieloma múltiple, se están investigando la determinación de la expresión y densidad de BCMA en muestras de pacientes y la evaluación de los anticuerpos de TCB anti-

BCMA/anti-CD3 con muestras de pacientes clínicos. Los aspirados de médula ósea y de sangre se obtienen de pacientes con mieloma múltiple después de otorgar el consentimiento informado, de conformidad con las directrices del comité ético local y la Declaración de Helsinki.

5

a) Expresión de BCMA detectada por citometría de flujo de multiparámetros (intensidad de fluorescencia media)

Para determinar la expresión del receptor de BCMA en células de mieloma de médula ósea, se realizaron análisis inmunofenotípicos utilizando aspirados de médula ósea entera recién aislados. Para los análisis inmunofenotípicos se usaron muestras de médula ósea entera anticoagulada con K₃-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) lisada con eritrocitos. Un total de 2×10^6 células por tubo se tiñeron, se lisaron y luego se lavaron usando una técnica de inmunofluorescencia directa y tinción multicolor, que tenía como objetivo la identificación específica y caracterización inmunofenotípica de las células de plasma malignas identificadas como CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Las células se tiñeron luego usando un panel de anticuerpos conjugados con fluorocromo que incluía al menos CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC. Los anticuerpos marcados con fluorocromo usados se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA). El anticuerpo anti-BCMA humano conjugado con APC interno se utilizó en los análisis inmunofenotípicos. La adquisición se realizó usando un citómetro de flujo multicolor y software instalado (por ejemplo, un dispositivo CantoII que ejecuta el software FACS Diva o citómetro de flujo FACSCalibur usando el software CellQUEST). El programa Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences) se utilizó para el análisis de datos. La expresión de BCMA se midió cerrada en la población de células de plasma malignas y se determinaron los valores medios de intensidad de fluorescencia (MFI) y se compararon entre los pacientes con mieloma.

Tabla 16. Expresión de BCMA en células de plasma de mieloma de médula

ósea de pacientes detectada por citometría de flujo de multiparámetros (intensidad de fluorescencia media)

N° de paciente	IMF_{BCMA}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678
P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615
P23	159

b) Determinación de la capacidad de unión al antígeno específico de BCMA (análisis de citometría de flujo cuantitativo)

5

El método Qifikit (Dako) se utilizó para cuantificar la

capacidad de unión al antígeno específico de BCMA (SABC) en la superficie celular de las células de plasma del mieloma de médula ósea de pacientes. Las células de plasma de mieloma aisladas de aspirados de médula ósea entera se tiñeron con 50 μ l de IgG de BCMA anti-humana de ratón (BioLegend # 357502) o un control de isotipo de IgG2a de ratón (BioLegend # 401501) diluido en amortiguador FACS (PBS, 0.1% de BSA) a una concentración final de 25 μ g/ml (o a concentraciones de saturación) y la tinción se realizó durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Luego, se añadieron 100 μ l de Perlas de Configuración o Calibración en cavidades separadas y las células, así como las perlas se lavaron dos veces con amortiguador FACS. Las células y perlas se resuspendieron en 25 μ l de amortiguador FACS, que contenía anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (a concentraciones de saturación), proporcionado por Qifikit. Las células y perlas se tiñeron durante 45 min a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez y todas las muestras se resuspendieron en 100 μ l de amortiguador FACS. Las muestras se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo multicolor y un software instalado (por ejemplo, un dispositivo CantoII que ejecuta el software FACS Diva o un citómetro de flujo FACSCalibur que usa el software CellQUEST).

Tabla 17. Capacidad de unión al antígeno específico de BCMA en células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes, medida por análisis de citometría de flujo cuantitativo

N° de paciente	SABC _{BCMA}
P1	n/A
P2	n/A
P3	679

P4	145
P5	957
P6	969
P7	554
P8	4479
P9	350
P10	414
P11	2756
P12	2911
P13	1267
P14	3453
P15	1006
P16	1097
P17	1622
P18	429
P19	1684
P20	383
P21	1602
P22	799
P23	204

Ejemplo 13: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de plasma de mieloma de pacientes de médula ósea en la presencia de células T infiltrantes de médula ósea autólogas inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo de multiparámetros)

Una de las caracterizaciones in vitro más significativas y críticas durante la evaluación preclínica de los candidatos de

anticuerpos TCB para mieloma múltiple es si la molécula de TCB podría activar las células T de los pacientes e inducir la matanza de células T redirigidas de las células de plasma de mieloma primarias de la médula ósea de los pacientes. Para evaluar el efecto de los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 para inducir la matanza de células T redirigidas de células de plasma de mieloma de médula ósea, los aspirados de médula ósea entera se recolectaron de pacientes con mieloma múltiple en tubos revestidos con EDTA y utilizados inmediatamente para los ensayos de cultivo celular. La relación de células efectoras a células de tumor (relación E:T) presente en las muestras de médula ósea entera se determinó y midió por citometría de flujo. Brevemente, se transfirieron 200 μ l de muestras de médula ósea a placas de 96 cavidades profundos. Se prepararon diluciones de anticuerpo de TCB anti-BCMA/anti-CD3 y anticuerpo de control en medio estéril y se añadieron 10 μ l de la preparación a las cavidades respectivas para concentraciones finales que variaron desde 0.1 pM a 30 nM. La suspensión de médula ósea-anticuerpo se mezcló por agitación suave y luego se incubó a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 h, se selló con película de parafina. Después del período de incubación, 20 μ l de una solución de anticuerpo FACS correspondiente preparada con base en un panel de anticuerpo que incluía CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC/Anexina-V-PerCP-Cy5.5 se añadieron a una placa con fondo de 96 U. Los anticuerpos marcados con fluorocromo se adquirieron de BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco, CA) y se utilizó anticuerpo anti-BCMA humano conjugado con APC. Las muestras se incubaron después durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron usando un citómetro de flujo multicolor. La muerte celular de las células de mieloma se determinó por la evaluación de la expresión positiva a anexina-V en las poblaciones de células de mieloma CD138⁺ CD38⁺ CD45⁺ CD19⁻ CD56⁺. Luego se determinó el porcentaje de muerte celular del mieloma. El

porcentaje de lisis de las células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes inducida por una concentración específica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 también se determinó midiendo el recuento absoluto de células de plasma de mieloma negativas a anexina-V a una concentración de TCB dada y restándolo del recuento absoluto de células de plasma de mieloma negativas a anexina-V sin TCB; dividido por el recuento absoluto de células de plasma de mieloma negativas a anexina-V sin TCB. Para verificar la especificidad de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3, también se midió la expresión de anexina-V en otros tipos de células de médula ósea tales como células T, células B y células NK. Como se muestra en la Figura 8, hubo una lisis específica y dependiente de la concentración de las células de plasma de mieloma de pacientes, mientras que no se observó la lisis de las células T, células B y células NK. Además, el TCB de control que se une solamente a CD3 pero no a BCMA no indujo la muerte celular de las células de plasma de mieloma a las concentraciones más altas de anticuerpos de TCB. Como se muestra en la Tabla 18, el porcentaje de células de mieloma de médula ósea de pacientes positivas a anexina-V a la concentración más alta (30 nM) alcanzó hasta 52.54% y 55.72% para 42-TCBcv y 22-TCBcv respectivamente en comparación con 29.31% para 83A10-TCBcv, concluyendo que 42-TCBcv y 22-TCBcv son más potentes que 83A10-TCBcv para inducir la matanza de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes.

25

Tabla 18. Porcentaje de células de plasma de mieloma positivas a anexina-V de aspirados de médula ósea de pacientes inducido por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

Células de plasma de mieloma positivas a anexina-V (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	29.31	30.95	23.14	15.74	16.76	13.11
42-TCBcv	52.54	39.87	29.96	10.51	19.6	13.11
22-TCBcv	55.72	51.71	31.01	14.81	14.19	13.11
TCB de control	15.18	10.93	/	/	/	/

En otro estudio en aspirados de médula ósea de 5 pacientes con MM diferentes, se determinó el porcentaje de células de plasma de mieloma viables por activación en la población de células negativas a anexina-V y se graficó contra la concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. Los valores de EC50 se midieron y determinaron como la concentración de anticuerpo de TCB que da como resultado 50% de las células de plasma de mieloma viables máximas. Se determinó la EMAX (%) como máximo de células de plasma de mieloma viables en la presencia de anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 respectivo. 83A10-TCBcv fue mucho menos potente para inducir la lisis de células de plasma de mieloma que 22-TCBcv y 42-TCBcv en la mayoría de las cinco muestras de aspirado de médula ósea de pacientes con mieloma (Tabla 26; la Figura 9 muestra curvas de respuesta de concentración de ejemplo para 2 de los 5 pacientes). La reducción dependiente de la concentración de células de mieloma viables se observó en 5/5 muestras de pacientes tratadas con 22-TCBcv o 42-TCBcv, en comparación con solamente 1/5 muestras de pacientes para 83A10-TCBcv. La Tabla 19 muestra la comparación de 83A10-TCBcv con 22-TCBcv y 42-TCBcv y el efecto de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 sobre la viabilidad de las células de plasma de mieloma de médula ósea. Los resultados muestran claramente

que hubo menos células de plasma de mieloma de médula ósea viables con 22-TCBcv y 42-TCBcv (es decir, más lisis de las células de plasma de mieloma de médula ósea) en 4/5 muestras de pacientes, como se demuestra por valores menores de EMAX (%) para 22-TCBcv y 42-TCBcv vs. 83A10-TCBcv en las respectivas muestras de pacientes. Se observó la lisis específica y dependiente de la concentración de células de plasma de mieloma de paciente, mientras que no se observó lisis de células de médula ósea no malignas (datos no mostrados).

Tabla 19. Valores de EMAX (%) con respecto a las células de plasma de mieloma viables negativas a anexina-V de aspirados de médula ósea de pacientes en la presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

Muestra de paciente de aspirado de médula ósea (Estudio 2)	83A10- TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
	EMAX (%)		
Paciente 001	100	7.6	22.6
Paciente 003	54.3	38.9	44.6
Paciente 004	100	66.6	53.9
Paciente 006	81.8	65.9	73.5
Paciente 007	81.8	48.6	72.8

En investigaciones adicionales de los nuevos anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de esta invención en comparación con 83A10-TCBcv, se tiñeron muestras/aspirados de médula ósea entera de pacientes recién tomados con microperlas magnéticas de CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), se pasó a través de una columna de separación de células autoMACS y las

fracciones recolectadas con suficiente número restante de células de plasma de MM de habitualmente > 4% células de plasma de mieloma se usaron para experimentos adicionales. En placas de 24 cavidades, 500,000 células/cavidad, se incubaron y se cultivaron durante 48 horas. Las diluciones de anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 y anticuerpos de control se añadieron a las cavidades respectivas para una concentración final de TCB de 0.1 pM a 10 nM. Cada punto de dosis se realizó por triplicado. La viabilidad de las células de plasma y células del microambiente de médula ósea se investigó por doble tinción con yoduro de propidio/CD138-FITC usando citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson). El análisis de datos se realizó con el software FACSDiva (Becton Dickinson). Como se representa en la Figura 10, las gráficas de barras muestran los valores medios normalizados en la media sobre los triplicados del control de medio respectivo (MC). Para el análisis estadístico, se utilizó una prueba y unilateral. La inhibición máxima del crecimiento de células de plasma de MM a una concentración de 10 nM (IMAX10) y la inhibición medida a 1 nM (IMAX1), respectivamente, se dieron en porcentaje en referencia al control de medio. También se representó la inhibición máxima del anticuerpo de TCB de control (10 nM) en comparación con el control de medio. Los cálculos se realizaron utilizando R 3.1.19 y Bioconductor 2.1310, pero para el cálculo de los valores IMAX (Microsoft Excel®, Microsoft Office Professional 2013). Un efecto se consideró estadísticamente significativo si el valor P de su prueba estadística correspondiente fue < 5% (*), < 1% (**) o < 0.1% (***). Como se muestra en las Figuras 10A-10G, los resultados muestran claramente que hubo menos células de plasma de mieloma de médula ósea viables con 22-TCBcv y 42-TCBcv (es decir, más lisis de las células de plasma de mieloma de médula ósea) en 7/7 muestras de pacientes en comparación con 83A10-TCBcv. La Tabla 20 demuestra el porcentaje de células de plasma de mieloma viables de aspirados de médula ósea de pacientes inducidos por anticuerpos biespecíficos de células T anti-

BCMA/anti-CD3 con respecto al control de medio. La Tabla 21 muestra los valores de IMAx10 e IMAx1. Los resultados demuestran que 22-TCBcv y 42-TCBcv son claramente más potentes que 83A10-TCBcv para inducir la matanza de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes. A pesar de la lisis específica de células de plasma de médula ósea (BMPC) inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y observada en todas las muestras de pacientes con médula ósea, el microambiente de médula ósea (BMME) no se vio afectado en las muestras respectivas (Figura 10H, representativo de 7 muestras de pacientes).

Tabla 20. Porcentaje relativo de células de plasma de mieloma viables negativas a yoduro de propidio de aspirados de médula ósea de pacientes inducido por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

Muestra de paciente No. 1 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	181.3	106.3	31.3	9.4
42-TCVcv	81.3	15.6	9.4	9.4
22-TCVcv	37.5	6.3	6.3	9.4
TCB de Control	/	/	/	162.5
Muestra de paciente No. 2 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	89.5	31.6	5.3	0
42-TCVcv	42.1	10.5	0	0
22-TCVcv	15.8	5.3	0	0

TCB de Control	/	/	/	94.7
Muestra de paciente No. 3 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	76.7	35.0	1.7	0
42-TCVcv	13.3	0	0	0
22-TCVcv	3.3	0	0	0
TCB de Control	/	/	/	86.7
Muestra de paciente No. 4 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	93.9	51.5	9.1	6.1
42-TCVcv	9.1	0	0	0
22-TCVcv	15.2	15.2	0	0
TCB de Control	/	/	/	127.3
Muestra de paciente No. 5 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	100	91.4	62.9	20.0
42-TCVcv	71.4	34.3	22.9	11.4
22-TCVcv	20.0	22.9	14.3	11.4
TCB de Control	/	/	/	85.7
Muestra de paciente No. 6 / Células de plasma de mieloma	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			

viables (%)	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	55.6	22.2	6.7	4.4
42-TCVcv	35.6	6.7	4.4	4.4
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
TCB de Control	/	/	/	117.8
Muestra de paciente No. 7 / Células de plasma de mieloma viables (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti- BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	84.4	82.6	46.8	19.3
42-TCVcv	67.0	33.9	12.8	5.5
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
TCB de Control	/	/	/	106.4

Tabla 21. Valores de IMAX10 e IMAX1 con respecto a la inhibición máxima del crecimiento de células de plasma de MM a IMAX10 10 nM e inhibición a IMAX1 1 nM con base en las células de plasma de mieloma viables negativas a yoduro de propidio de aspirados de médula ósea de pacientes en la presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

No. de muestra del paciente	83A10-TCBcv		42-TCBcv		22-TCBcv		TCB de Control
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	90.6	68.8	90.6	90.6	90.6	93.8	-62.5
3	100	94.7	100	100	100	100	5.3
4	100	98.3	100	100	100	100	13.3
5	93.9	90.9	100	100	100	100	-27.3

6	80.0	37.1	88.6	77.1	88.6	85.7	14.3
7	95.6	93.3	95.6	95.6	97.8	91.1	-17.8
8	80.7	53.2	94.5	87.2	97.2	97.2	-6.4

Ejemplo 14: Activación de células T de células T de médula ósea del paciente inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo de multiparámetros)

5 Para evaluar si los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 inducen la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con mieloma (es decir, células T infiltradas de médula ósea (MIL)), las muestras de los respectivos grupos tratados, no tratados y de control después de 48 h de incubación también se tiñeron con una solución de anticuerpo FACS preparada con base en un panel de anticuerpos que
10 incluía ocho marcadores: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. Las muestras se incubaron después durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron usando un citómetro de flujo multicolor. La activación de células T se
15 determinó por la evaluación de la expresión positiva de CD25, CD69 y/o HLA-DR activada en las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺. Se midieron después los porcentajes de activación de células T. La Figura 11 muestra una sobrerregulación dependiente de la concentración de CD69 y CD25 en células T CD4⁺ y CD8⁺ infiltradas en
20 médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. La Tabla 22 resume el aumento de la expresión de CD69 y CD25 en células T CD4⁺ y CD8⁺ inducidas por anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3; datos de un paciente.

25 **Tabla 22:** Activación de células T de células T autólogas de pacientes con mieloma inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en la presencia de células de plasma de mieloma de médula ósea de pacientes

Células T CD69+/CD4 (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	21.8	14.93	1.80	0.93	1.02	0.85
42-TCBcv	29.6	24.8	1.90	1.57	0.94	0.85
22-TCBcv	34.99	30.72	3.62	1.69	2.31	0.85
TCB de control	0.7	0.62	/	/	/	/
Células T CD69+/CD8 (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	25.50	22.07	8.330	5.60	5.14	5.30
42-TCBcv	23.61	24.22	11.125	9.26	6.28	5.30
22-TCBcv	25.48	28.14	11.460	6.64	14.08	5.30
TCB de control	5.71	4.93	/	/	/	/
Células T CD25+/CD4 (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	17.47	12.86	5.18	4.58	4.07	7.5
42-TCBcv	8.65	7.42	3.51	2.71	2.81	7.5
22-TCBcv	12.34	11.52	5.23	4.89	4.90	7.5
TCB de control	6.90	6.50	/	/	/	/
Células T CD25+/CD8 (%)	Concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0

83A10-TCBcv	9.79	6.560	0.42	0.13	0.12	0.12
42-TCBcv	2.20	2.231	0.42	0.14	0.08	0.12
22-TCBcv	3.57	4.110	0.65	0.10	0.08	0.12
TCB de control	0.09	0.100	/	/	/	/

Ejemplo 15: Función aumentada de células T (producción de citocinas) de células T de médula ósea de pacientes inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo/inmunoensayo basado en perlas multiplexadas)

Para evaluar si los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCBcv, 22-TCBcv y 42-TCBcv) inducen la activación de las células T y la función aumentada de células T CD4⁺ y CD8⁺ infiltrantes de médula ósea de pacientes con mieloma, se recolectó el sobrenadante del cultivo de los respectivos grupos tratados, no tratados y de control después de 48 h de incubación y se midieron el contenido de citocinas y serina proteasas. El análisis de matriz de perlas de citocinas (CBA) se realizó en un citómetro de flujo multicolor de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando ya sea el Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD #551809) o la combinación de los siguientes CBA Flex Sets: granzima B humana (BD # 560304), Flex Set de IFN- γ humano (BD # 558269), Flex Set de TNF- α humano (BD # 558273), Flex Set de IL-10 humana (BD # 558274), Flex Set de IL-6 humana (BD # 558276), Flex Set de IL-4 humana (BD # 558272), Flex Set de IL-2 humana (BD # 558270).

Ejemplo 16: Estudio farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) en monos cynomolgus

Una ventaja clara que un anticuerpo de TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 podría tener sobre otros anticuerpos biespecíficos tales como (scFV)₂ (por ejemplo, acoplador BiTE® de células T biespecífico

BCMAxCD3 como se describe en WO2013072415 y WO2013072406) es la vida media de eliminación mucho más larga/menor depuración in vivo que podría permitir una administración IV o SC dos veces o una vez a la semana en comparación con la vida media de eliminación muy corta de (scFV)₂ (por ejemplo 1 a 4 horas) que requiere tratamiento administrado a través de una bomba portada por los pacientes durante semanas a meses (Topp et al., J Clin Oncol 2011; 29 (18): 2493-8). Una administración dos veces o una vez por semana sería mucho más conveniente para los pacientes y también mucho menos arriesgada (por ejemplo, falla de la bomba, problemas con el catéter, etc.).

a) Para verificar la vida media de eliminación/depuración del anticuerpo 83A10-TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 in vivo, se realizaron estudios farmacocinéticos (PK)/farmacodinámicos (PD) de dosis única con anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCBcv, 22-TCBcv y 42-TCBcv) en CRO acreditado por AAALAC experimentado. Los monos cynomolgus adultos biológicamente naïves de aproximadamente dos años de edad y que pesaron aproximadamente 3 kg se aclimataron durante al menos 40 días y se seleccionaron sobre la base del peso corporal, observaciones clínicas y exámenes de patología clínica. Los animales fueron identificados por tatuajes individuales y tarjetas de jaulas codificadas por colores. Todos los procedimientos con animales (incluyendo el alojamiento, monitoreo de salud, restricción, dosificación, etc.) y revisión ética se realizaron de acuerdo con la legislación vigente del país que aplica la Directiva sobre la protección de los animales utilizados para la investigación biomédica. Los animales se asignaron aleatoriamente al grupo de tratamiento con base en el peso corporal previo a la prueba más reciente. Después de excluir a los animales con hallazgos anteriores a la prueba inaceptables, un programa informático incluido en el sistema Pristima® diseñado para lograr el equilibrio con respecto a los pesos corporales antes de la prueba se utilizó para excluir los animales de ambos extremos de peso corporal y aleatorizar

los animales restantes al grupo de tratamiento. Los animales se asignaron a tres grupos de tratamiento con 83A10-TCBcv (n = 2 animales, es decir, 1 hembra y 1 macho por grupo) a 0.003; 0.03; y 0.3 mg/kg. Los animales recibieron una inyección i.v. única de 83A10-TCBcv y se recolectaron al menos 0.8 ml de muestras de sangre por punto de tiempo a través de la vena periférica para las evaluaciones PK de acuerdo con el siguiente programa y procedimientos de recolección: Pre-dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se dejaron coagular en tubos para la separación del suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó (al menos 10 min., 1200 g, +4°C). El suero resultante (aproximadamente 300 µL) se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis posterior. Las muestras de médula ósea para las evaluaciones PK también se recolectaron en el fémur bajo anestesia/tratamiento analgésico de acuerdo con el siguiente programa de recolección: Pre-dosis, 96 y 336 h después de la dosificación. Se permitió que las muestras de médula ósea coagularan en tubos para la separación del suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó (al menos 10 min, 1200 g, +4°C). La médula ósea resultante (aproximadamente 1 ml) se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis adicional. El análisis y evaluación de los datos PK se realizaron. El análisis estándar no compartimental se realizó utilizando el paquete Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, EUA) o sistema Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, EUA). Como se muestra en la Figura 12 y Tabla 23, las concentraciones en suero de 83A10-TCBcv se midieron por ELISA de muestras de suero recolectadas en diferentes puntos de tiempo después de la inyección IV. La Tabla 24 muestra las concentraciones de 83A10-TCBcv en la médula ósea medidas por ELISA para cada grupo de tratamiento (BLQ significa debajo del nivel de cuantificación).

Diversa información relevante para uso clínico potencial de

un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se puede tomar de la FIGURA 12, Tabla 23 y Tabla 24:

- En aspirados de médula ósea de pacientes con MM, las concentraciones de 1 nM o 10 nM de TCB de esta invención inducen una matanza significativa o incluso total de célula de plasma de MM; a la dosis de 0.03 mg/kg en el intervalo de inyección a 168 horas (7 días) las concentraciones de plasma entre aprox. 1 nM y 4 nM se han logrado mostrando que una vez por semana la terapia con dosis de aprox. 0.03 mg/kg puede ser factible (200 ng/ml corresponde a aproximadamente 1 nM)
- La Figura 12 muestra que en el rango de dosis investigada, la PK es en gran parte lineal a la dosis; eso significa que las concentraciones son proporcionales a la dosis; una propiedad útil para la terapia clínica
- MM es una enfermedad que se ubica principalmente en la médula ósea; las concentraciones de 83A10-TCBcv detectadas en la médula ósea están cerca de las concentraciones en suero (Tabla 24), por ejemplo a 96 h después de la inyección, las concentraciones de médula ósea de aprox. 1 y 2 nM se han medido; estas son concentraciones de TCB de esta invención en las que se observa una matanza significativa de células de plasma de MM en aspirados de médula ósea recién tomados de pacientes con MM; demostrando nuevamente la oportunidad de intervalos de dosificación convenientes como una vez a la semana
- Entre 24 y 504 horas después de la inyección, la eliminación es mayormente de primer orden con una vida media de eliminación de aprox. 6 a 8 días mostrando nuevamente la oportunidad de, por ejemplo, una dosificación una vez a la semana

Tabla 23. Concentraciones en suero de 83A10-TCBcv después del tratamiento IV en monos cynomolgus

83A 10-TCBcv						
Conc. (ng/mL)	0.003 mg/kg IV		0.03 mg/kg IV		0.3 mg/kg IV	
	A	B	C	D	E	F
Pre-dosis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30 min	75.69	74.99	668.6 6	796.54	17207.2 0	14943.95
90 min	70.92	74.56	951.8 1	628.72	12831.5 4	16248.97
180 min	76.54	62.55	981.4 2	722.27	10653.2 8	6824.72
7 h	53.17	77.39	700.6 7	972.38	8204.77	4560.36
24 h	33.16	50.41	358.9 0	532.11	4609.28	4127.41
48 h	26.05	37.40	279.8 0	433.30	3546.09	2700.43
96 h	17.28	19.52	226.0 1	429.80	1959.96	2006.92
168 h	17.33	15.87	55.58	365.67	1918.06	1382.57
336 h	11.21	4.43	102.9 4	153.54	1102.96	773.55
504 h	4.33	BLQ	43.99	130.14	952.03	377.04

Tabla 24. Concentraciones en médula ósea de 83A10-TCBcv después del tratamiento IV único en monos cynomolgus

Conc. (ng/mL)	0.003 mg/kg		0.03 mg/kg		0.3 mg/kg	
	A	B	C	D	E	F

Pre-dosis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
96 h	25.07	37.15	179.87	469.08	3432.54	2674.70
336 h	9.92	6.90	59.39	47.22	1987.48	850.87

Mediciones farmacodinámicas (PD): Se recolectaron muestras de sangre (puntos de tiempo: pre-dosis, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación) y muestras de médula ósea (puntos de tiempo: pre-dosis, 96 y 336 h después de la dosificación) en tubos que contenían 7.5% de EDTA K3 para la evaluación PD por citometría de flujo para evaluar el efecto de 83A10-TCBcv administrado i.v. como dosis única en células de plasma de médula ósea y sangre, células B y células T. Se aplicó un método de tinción de inmunofluorescencia directa "lisar y lavar" de los marcadores de superficie. Brevemente, se incubaron 100 µL de sangre o médula ósea con dos mezclas de anticuerpos incluyendo CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 o CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8 en la oscuridad durante 30 min a +4°C. Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron 2 ml de solución amortiguadora de lisis a la muestra y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se recolectaron por centrifugación y se lavaron con amortiguador de tinción (PBS 2% Suero Bovino Fetal). Las muestras teñidas se mantuvieron refrigeradas, protegidas de la luz, hasta su adquisición con citómetro el mismo día. La adquisición de datos FACS se realizó con un citómetro de flujo Becton Dickinson equipado con 488 y 635 líneas de láser, BD FACS Canto II. El software BD FACSDiva se utilizó para la recolección y el análisis de datos. La enumeración del número absoluto de células se realizó con una plataforma doble, en función del recuento de leucocitos obtenido por el analizador de hematología (ADVIATM 120, Siemens). Como se muestra en la Figura 13, se observó la redistribución de las células T periféricas en todos los animales que recibieron un tratamiento IV de dosis única de 83A10-TCBcv como se

muestra por la disminución en los recuentos de células T circulantes. Como se muestra en la Figura 14A, ya a las 24 horas después del tratamiento con 0.3 mg/kg de 83A10-TCBcv se observó una disminución en células de plasma (células positivas a BCMA) en animales tratados mientras no hubo disminución en células B totales (células negativas a BCMA). La Figura 14b muestra la cinética de reducción de células de plasma de sangre después del tratamiento con 0.3 mg/kg de 83A10-TCBcv en monos cynomolgus.

Las muestras de sangre también se procesaron para la recolección de plasma para el análisis de citocinas (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) de acuerdo con el siguiente programa de recolección: Pre-dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de plástico mantenidos en un baño de agua con hielo, luego se centrifugaron (al menos 10 min., 1200 g, +4°C). El plasma resultante se almacenó directamente a -80°C hasta el análisis. El análisis de citocinas se realizó con inmunoensayo de citocinas basado en microesferas Multiplex (Tecnología Luminex). Los datos se analizaron utilizando el software Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad): se utilizó un modelo de regresión logística de cinco parámetros (5PL).

b) En un estudio adicional, los monos cynomolgus fueron tratados con 42-TCBcv o 22-TCBcv. Los animales (n = 2/grupo) recibieron una inyección IV única (0.01; 0.1 y 1.0 mg/kg) o SC (0.01 y 0.1 mg/kg) de 42-TCBcv o una inyección IV única de 22-TCBcv (0.1 mg/kg). Las muestras de sangre y médula ósea se recolectaron en puntos de tiempo siguiendo un cronograma de recolección definido y se procesaron en consecuencia para la medición de PK y PD (inmunofenotipificación y producción de citocinas).

Los animales recibieron una inyección IV o SC única de 42-TCBcv o 22-TCBcv (IV solamente) y se recolectaron muestras de sangre por punto de tiempo a través de la vena periférica para evaluaciones PK de acuerdo con el siguiente programa de recolección y

procedimientos: Pre-dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se dejaron coagular en tubos para la separación del suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó (al menos 10 min., 1200 g, +4°C). El suero resultante (aproximadamente 300 µL) se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis posterior. Las muestras de médula ósea para las evaluaciones PK también se recolectaron en el fémur bajo anestesia/tratamiento analgésico de acuerdo con el siguiente programa de recolección: pre-dosis, 96 y 336 h después de la dosificación. Se permitió que las muestras de médula ósea B coagularan en tubos para la separación del suero durante 60 minutos a temperatura ambiente. El coágulo se centrifugó (al menos 10 min, 1200 g, +4°C). La médula ósea resultante (aproximadamente 1 ml) se almacenó directamente a -80°C hasta un análisis posterior. Se realizaron el análisis de datos PK y la evaluación. El análisis estándar no compartimental se realizó utilizando el paquete Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, EUA) O el sistema Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, EUA). Como se muestra en la Figura 19 y Tabla 24A-D, las concentraciones de 42-TCBcv se midieron por ELISA a partir de muestras de suero y médula ósea recolectadas en diferentes puntos de tiempo después de la inyección IV o SC. El rango de concentración efectiva de 42-TCBcv en aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple correspondió a 10 a 10 nM (área gris). Las concentraciones entre paréntesis están en nM. BLQ, por debajo del nivel de cuantificación; i/m, medición no concluyente.

Tabla 24A. Concentraciones en suero de 42-TCBcv después del tratamiento IV en monos cynomolgus

42-TCBcv						
Conc. (ng/mL)	0.01 mg/kg IV		0.1 mg/kg IV		1.0 mg/kg IV	
	Macho	Hembra	Macho	Hembr	Macho	Hembra

				a		
Pre-dosis	BLQ	BLQ	i/m	BLQ	BLQ	BLQ
30 min	468.5 7	613.44	4720.33	4506. 64	41939.3 1	32677.2 3
90 min	333.0 9	427.16	4284.66	3214. 61	30889.7 3	103925. 73
180 min	392.3 7	422.36	4336.89	2865. 36	29201.6 9	36157.7 8
7 h	421.9 6	356.34	4028.47	3070. 84	25064.8 1	29962.6 2
24 h	242.6 4	305.74	2996.24	2321. 66	19365.8 6	23656.6 5
48 h	i/m	192.97	2595.62	1781. 91	20539.5 9	13523.6 8
96 h	128.5 0	148.02	2153.34	1277. 02	13147.0 9	12755.5 8
168 h	51.13	72.64	1388.24	948.3 1	6189.79	3952.05
336 h	27.68	13.03	195.51	190.8 7	5337.85	54.15
504 h	18.17	8.04	275.93	13.96	3678.69	37.88

Tabla 24 B. Concentraciones en médula ósea de 42-TCBcv después del tratamiento IV único en monos cynomolgus

42-TCBcv						
Conc. (ng/mL)	0.01 mg/kg IV		0.1 mg/kg IV		1.0 mg/kg IV	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra

Pre-dosis	BLQ	BLQ	406.99	BLQ	BLQ	BLQ
96 h	54.39	130.03	956.56	1022.87	4089.88	4339.33
336 h	27.23	18.49	227.20	170.34	3705.74	62.44

Tabla 24C. Concentraciones en suero de 42-TCBcv después del tratamiento SC en monos cynomolgus

42-TCBcv				
Conc. (ng/mL)	0.01 mg/kg SC		0.1 mg/kg SC	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Pre-dosis	4.76	12.41	BLQ	BLQ
30 min	8.25	12.51	25.11	14.62
90 min	16.38	22.71	140.73	145.39
180 min	23.75	48.51	334.95	269.66
7 h	37.46	63.48	836.86	565.10
24 h	68.15	115.31	2100.42	904.22
48 h	116.63	118.03	1956.60	1111.06
96 h	150.77	120.62	1810.13	1817.52
168 h	106.28	98.64	1192.65	1653.26
336 h	67.02	46.21	482.39	571.04
504 h	25.69	31.99	4.08	83.91

5 **Tabla 24 D.** Concentraciones en médula ósea de 42-TCBcv después del tratamiento SC único en monos cynomolgus

42-TCBcv		
Conc.	0.01 mg/kg SC	0.1 mg/kg SC

(ng/mL)	Hembra	Macho	Hembra	Hembra
Pre-dosis	5.59	10.70	BLQ	BLQ
96 h	109.88	73.93	1064.66	1066.79
336 h	29.35	48.78	518.40	906.48

Los resultados de las Tablas 24A y 24C muestran un atractivo perfil de concentración en suero adecuado para tratamiento una vez a la semana o incluso una vez cada dos semanas con 42-TCBcv. Se determinó el área bajo la curva AUC para las concentraciones en suero después de la administración IV y SC, la comparación de los valores AUC mostró una alta biodisponibilidad cercana al 100% con la inyección SC de 42-TCBcv. Además, los resultados muestran que la concentración de 42-TCBcv en la médula ósea es muy similar a la concentración en suero de 42-TCBcv. Las concentraciones de 42-TCBcv en suero podrían representar las concentraciones de 42-TCBcv disponibles en la médula ósea, es decir, en la ubicación principal donde se enriquecen las células de tumor de mieloma.

Las mediciones farmacodinámicas (PD) son información valiosa para corroborar con mediciones PK. Se realizaron análisis de PD adicionales. Las células B CD20⁺ de Cynomolgus de la sangre también expresan BCMA en la superficie celular y son significativamente más frecuentes (recuento absoluto más alto) que las células de plasma en la sangre. La depleción de células B sanguíneas se utilizó como un efecto farmacodinámico confiable de anticuerpos de TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 y para comparar in vivo la eficacia entre 83A10-TCBcv, 42-TCBcv y 22-TCBcv. Los recuentos de células B absolutas se calcularon con base en la doble plataforma que consiste de citometría de flujo y recuento de glóbulos blancos obtenidos con un analizador hematológico y medidos en los siguientes puntos de tiempo: pre-dosis, 24 h, 48 h, 96 h y 196 h después de 10 min de infusión IV. El

porcentaje de depleción de células B se calculó de la siguiente manera:

$$= \frac{[\text{recuento absoluto de células B a pre-dosis}] - [\text{recuento absoluto de células B en el punto de tiempo}]}{[\text{recuento absoluto de células B a pre-dosis}]} * 100$$

5

Tabla 24E: efectos farmacodinámicos de los anticuerpos de TCBcv anti-BCMA/anti-CD3: agotamiento de células B

Tiempo después de la inyección IV (horas)	Depleción de células B en relación con la pre-dosis (%)		
	83A10-TCBcv 0.3 mg/kg (n = 2)	42-TCBcv 0.1 mg/kg (n = 2)	22-TCBcv 0.1 mg/kg (n = 2)
24 h	19.9 ± 0.21	91.4 ± 3.8	77.8 ± 3.7
48h	11.9 ± 17.6	88.8 ± 3.9	61.5 ± 9.8
96h	5.0 ± 10.8	93.0 ± 7.2	89.2 ± 4.8
168h	-0.23 ± 61.4	96.6 ± 3.5	91.9 ± 3.9

10 42-TCBcv y 22-TCBcv son más potentes que 83A10-TCBcv para inducir el agotamiento de células B que expresan BCMA en monos cynomolgus después de una inyección IV de dosis única (ver Tabla 24E). Dado que las tres moléculas comparten la misma estructura molecular y el mismo enlazante de CD3, la diferencia de eficacia en
 15 monos cynomolgus podría atribuirse principalmente al anticuerpo de BCMA respectivo.

Para confirmar que el agotamiento de las células B que expresan BCMA en monos cynomolgus después de la inyección IV es un resultado de los efectos de farmacodinámica mecanicista de
 20 anticuerpos de TCBcv anti-BCMA/anti-CD3, el aumento de las células T

citotóxicas CD8⁺ activadas (es decir células efectoras) se midió en la médula ósea enriquecida con células positivas a BCMA (es decir, células objetivo) 4 días (96 h) y 3 semanas (336 h) después de la inyección IV. Se calcularon los recuentos de células T activadas por CD8⁺ CD25⁺ con base en la plataforma doble que consiste de citometría de flujo y recuento de leucocitos obtenidos con un analizador de hematología.

Tabla 24F: Efectos farmacodinámicos de los anticuerpos de TCB_{CV} anti-BCMA/anti-CD3: Aumento de células T activadas por CD8⁺ CD25⁺

Tiempo después de la inyección IV (horas)	Aumento de las células T activadas por CD8 ⁺ CD25 ⁺ en relación con la dosis previa (%)		
	83A10-TCB _{CV} 0.3 mg/kg (n = 2)	42-TCB _{CV} 0.1 mg/kg (n = 2)	22-TCB _{CV} 0.1 mg/kg (n = 2)
96h	284 ± 244%	585 ± 496%	1449 ± 1715%
336h	-0.9 ± 1.3%	110 ± 187%	-6.6 ± 45.3%

42-TCB_{CV} y 22-TCB_{CV} son más potentes que 83A10-TCB_{CV} para inducir la activación de células T en monos cynomolgus después de una inyección IV de dosis única (ver Tabla 24F). Dado que las tres moléculas comparten la misma estructura molecular y enlazante de CD3, la diferencia en los efectos farmacodinámicos en monos cynomolgus podría atribuirse principalmente al anticuerpo de BCMA respectivo. Los resultados indican que el agotamiento de las células B positivas a BCMA en la médula ósea y en la sangre es muy probablemente el resultado de la activación de las células T citotóxicas inducidas por anticuerpos de TCB_{CV} anti-BCMA/anti-CD3.

Ejemplo 17: Actividad antitumoral inducida por anticuerpo

biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 en el modelo de xenoinjerto de mieloma humano H929 usando ratones NOG humanizados con PBMC

Con una vida media de eliminación larga, los anticuerpos de
5 TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 que contienen Fc podrían ser más eficaces
que los anticuerpos biespecíficos basados en (scFv)₂, tal como BCMA50-
BiTE® administrado a dosis equimolares, en un programa una vez a la
semana. El efecto in vivo de 83A10-TCBCv y BCMA50-BiTE® (como se
describe en WO2013072415 y WO2013072406) se comparó y evaluó en el
10 modelo de xenoinjerto de mieloma humano H929 en ratones NOG
humanizados con PBMC. Los ratones NOG son apropiados para modelos de
ratón humanizados ya que carecen completamente de células inmunes que
incluyen población de células NK residentes y, por lo tanto, son más
permisivos para el injerto de tumor de células xenogénicas humanas
15 (Ito et al., Curr Top Microbiol Immunol 2008; 324: 53-76).
Brevemente, en el día 0 (d0) del estudio, 5x10⁶ línea celular de
mieloma humano NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) en 100 µl de
medio RPMI 1640 que contiene 50:50 matrigel (BD Biosciences, Francia)
se inyectaron por vía subcutánea (SC) en el flanco dorsal derecho de
20 ratones hembra NOD/Shi-scid IL2rgamma(nulo)(NOG) inmunodeficientes de
8-10 semanas de edad (Taconic, Ry, Dinamarca). Veinticuatro a 72
horas antes de la implantación SC de células de tumor H929, todos los
ratones recibieron una irradiación de cuerpo entero con una fuente γ
(1.44 Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Bretenières, Francia). En el día 15 (d15), los
25 ratones NOG recibieron una inyección intraperitoneal (IP) única de
2x10⁷ PBMC humanas (en 500 µl de PBS 1X pH 7.4). La caracterización de
las PBMC humanas se realizó por inmunofenotipificación (citometría de
flujo). Los ratones luego fueron aleatorizados cuidadosamente en los
diferentes grupos de tratamiento y de control (n = 9/grupo) usando
30 software Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Francia) y una prueba
estadística (análisis de varianza) se realizó para probar la
homogeneidad entre los grupos. El tratamiento con anticuerpo comenzó

el día 19 (d19), es decir, 19 días después de la inyección SC de las células de tumor H929 cuando el volumen de tumor alcanzó al menos 100-150 mm³ en todos los ratones, con un volumen de tumor medio de 300 ± 161 mm³ para el grupo de control tratado con vehículo, 315 ± 148 mm³ para el grupo tratado con 2.6 nM/kg de TCB de control, 293 ± 135 mm³ para el grupo de 2.6 nM/kg de 83A10-TCBcv y 307 ± 138 mm³ para el grupo de 2.6 nM/kg de BCMA50-(scFv)₂ (BCMA50-BiTE®). El programa de tratamiento con anticuerpo de TCB se basó en los resultados farmacocinéticos obtenidos previamente con 83A10-TCBcv y consistió de una administración IV una vez por semana por hasta 3 semanas (es decir, un total de 3 inyecciones de anticuerpo de TCB). Cuatro días después de la reconstitución de los ratones huésped con PBMC humanas (d19), se administró una primera dosis del anticuerpo de 83A10-TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 (2.6 nM/kg, respectivamente, 0.5 mg/kg) por inyección en la vena de la cola. Se recolectaron muestras de sangre por punción de la vena yugular/mandibular (bajo anestesia) 1 h antes de cada tratamiento, 2 h antes del segundo tratamiento y en la terminación en ratones de todos los grupos tratados con 83A10-TCBcv y control-TCBcv. Las muestras de sangre se transfirieron inmediatamente a tubos que contienen activador de coágulo (tubos T MG, parte superior de color rojo cereza, Capiject®, Terumo®). Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la coagulación. Luego los tubos se centrifugaron a 1,300 g durante 5 min para la separación del coágulo/suero. Se prepararon alícuotas de suero, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta un análisis adicional. El volumen de tumor (TV) se midió por calibrador durante el estudio y el progreso se evaluó por comparación intergrupar de TV. El porcentaje de crecimiento de tumor definido como TG (%) se determinó calculando TG (%) = 100 x (TV mediano del grupo analizado)/(TV mediano del grupo tratado con vehículo de control). Por razones éticas, los ratones fueron sacrificados cuando el TV alcanzó al menos 2000 mm³. La Figura

15 muestra el TV de cada ratón individual por grupo experimental: (A) grupos de control que incluyen control de vehículo (línea completa) y TCB de control (línea de puntos), (B) grupo 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) y (C) BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg). En el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg),

5 6 de 9 ratones (67%) experimentaron una regresión de tumor incluso por debajo del TV registrado en d19, es decir, el primer tratamiento con TCB y la regresión de tumor se mantuvo hasta la finalización del estudio. Los 3 ratones en el grupo tratado con 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) que no mostraron regresión de tumor tenían su TV igual a 376,

10 402 y 522 mm³, respectivamente, a d19. Por el contrario, ninguno de los 9 ratones (0%) tratados con una dosis equimolar de BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg) en un programa de una vez a la semana durante 3 semanas tuvo regresión de tumor en cualquier momento. La Tabla 25 muestra la progresión de los volúmenes de tumor con el tiempo en todos los

15 grupos experimentales. El porcentaje de crecimiento de tumor se calculó para d19 a d43 y se comparó entre el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) y BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg) (Figura 16). Los resultados demuestran que TG (%) se redujo constante y significativamente en el grupo de 83A10-TCBcv (2.6 nM/kg) así como que TG (%) siempre es menor

20 en comparación con BCMA50-BiTE® (2.6 nM/kg). La Tabla 26 muestra el volumen de tumor (TV) mediano y el porcentaje de crecimiento de tumor (TG (%)) en los días 19 a 43. Los resultados generales demostraron claramente que 83A10-TCBcv es superior a BCMA50-BiTE® para inducir la actividad antitumor in vivo cuando el tratamiento se administra a

25 dosis equimolar en un programa una vez por semana durante 3 semanas.

Tabla 25. Progresión de volúmenes de tumor con el tiempo en ratones del grupo de vehículo de control y ratones tratados con dosis equimolares de TCB de control, 83A10-TCBcv y BCMA50- (scFv)₂ (BCMA50-BiTE®)

30

Volume	Grupo A de Vehículo de control
--------	--------------------------------

n de tumor (mm ³)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	Mediana	SD
Día 5	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
Día 8	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
Día 12	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
Día 15	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
Día 19	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
Día 23	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
Día 27	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
Día 30	1870	1129	x	419.2	867	1060	1368	673	1331	1090	450
Día 34	x	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
Día 37		2140		2043	1309	2017	2394	1267	x	1862	464
Día 40		x		x	1592	x	x	1346		1469	174
Día 43					1548			1994		1771	314
Día 47					x			x			
Día 51											

Volume n de	Grupo B de 2.6 nM/kg de TCB de Control										
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	Mediana	SD

tumor (mm ³)										a	
Día 5	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
Día 8	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
Día 12	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
Día 15	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
Día 19	257	334	71	318	268	460	602	236	28 5	315	148
Día 23	430	773	95	444	553	738	808	381	46 1	520	227
Día 27	924	125 2	232	780	768	100 9	915	606	63 0	791	289
Día 30	119 1	171 4	326	867	123 0	134 9	111 8	817	78 3	1044	398
Día 34	168 4	x	592	146 6	166 0	195 4	176 5	118 0	57 6	1359	529
Día 37	252 2		597	173 5	110 5	x	x	140 2	86 1	1370	691
Día 40	x		978	238 8	195 2			227 7	13 65	1792	604
Día 43			130 2	x	x			x	18 95	1599	419
Día 47			234 6						23 73	2359	19
Día 51			x						x		

Volumen de tumor (mm ³)	Grupo C de 2.6 nM/kg de 83A10-TCBcv										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	Media	SD

Día 5	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
Día 8	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
Día 12	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
Día 15	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
Día 19	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
Día 23	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210
Día 27	1119	376	443	1400	253	253	678	371	1166	673	441
Día 30	1607	187	260	1975	88	113	219	191	1590	692	783
Día 34	2143	68	100	x	34	54	63	53	2429	618	1033
Día 37	x	41	44		43	34	34	35	x	38	5
Día 40		64	40		43	38	32	39		43	11
Día 43		40	43		33	24	32	25		33	8
Día 47		14	21		16	12	19	14		16	3
Día 51		15	30		20	20	15	18		20	6

Volumen de tumor (mm ³)	Grupo D de 2.6 nM/kg de BCMA50-(scFv)₂ (BCMA50-BiTE®)										
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Media	SD
Día 5	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
Día 8	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
Día 12	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
Día 15	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
Día 19	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
Día 23	560	483	121	811	665	408	654	457	1115	586	278
Día 27	827	879	216	1224	1092	732	886	908	1526	921	359
Día 30	1026	1414	227	1476	1373	1256	1210	1228	2433	1294	567
Día 34	1368	1855	418	2185	1734	1936	1465	1645	x	1576	535

Día 37	1691	2754	599		2542		2102	2062		1958	765
Día 40	2764	x	706		x		x	x		1735	1455
Día 43	x		807							807	n/A
Día 47			x								
Día 51											

Tabla 26. Volumen de tumor (TV) medio y porcentaje de crecimiento de tumor (TG (%)) en los días 19 a 43: 83A10-TCBcv en comparación con BCMA50-BiTE®.

Inhibición del crecimiento de tumor TG _{inh} (%)	Control tratado con vehículo		2.6 nM/kg de 83A10-TCBcv		2.6 nM/kg de BCMA50-BiTE®		2.6 nM/kg de TCB de control	
	TV mediano	TG (%)	TV mediano	TG (%)	TV mediano	TG (%)	TV mediano	TG (%)
Día 19	327	100	287	87.8	303	92.7	285	87.2
Día 23	481	100	395	82.1	560	116.4	461	95.8
Día 27	870	100	443	50.9	886	101.8	780	89.7
Día 30	1094.5	100	219	20.0	1256	114.8	1118	102.1
Día 34	1521	100	65.5	4.3	1689.5	111.1	1563	102.8
Día 37	2030	100	38	1.9	2082	102.6	1253.5	61.7
Día 40	1469	100	39.5	2.7	1735	118.1	1952	132.9
Día 43	1771	100	32.5	1.8	807	45.6	1598.5	90.3
Día 47	/	/	15	/	/	/	2359.5	/
Día 51	/	/	19	/	/	/	/	/

5

Ejemplo 18: Actividad antitumoral inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en modelo de xenoinjerto de mieloma humano RPMI-8226 en ratones NOG humanizados con PBMC

Alternativamente a la línea celular de mieloma H929, la línea celular RPMI-8226 de mieloma humano para la que el nivel de expresión de BCMA de superficie es menor que la de H929 y más representativa del nivel detectado en células de mieloma primario es utilizado como xenoinjerto de tumor. Brevemente, en el día 0 (d0) del estudio, 10×10^6 - 20×10^6 línea celular de mieloma humano RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™) en 200 μ L de solución de NaCl al 0.9% que contiene matrigel 50:50 (BD Biosciences, Francia) se inyectaron por vía subcutánea (SC) en el flanco dorsal derecho de ratones hembra inmunodeficientes NOD/Shi-scid IL2rgamma(nulo) (NOG) de 8-10 semanas de edad (Taconic, Ry, Dinamarca). Veinticuatro a 72 horas antes de la implantación SC de línea celular RPMI-8226, todos los ratones recibieron una irradiación de cuerpo entero con una fuente γ (1.44 Gy, ^{60}Co , BioMep, Bretenières, Francia). Los ratones NOG recibieron una inyección intraperitoneal (IP) única de 2×10^7 PBMC humanas (en 500 μ L de PBS 1X pH7.4) una vez entre el día 9 (d9) y día 45 (d45) una vez que los volúmenes del tumor alcanzaron al menos 100-150 mm^3 . La caracterización de las PBMC humanas se realizó por inmunofenotipificación (citometría de flujo). Los ratones se aleatorizaron cuidadosamente en los diferentes grupos de tratamiento y control (n = 9/grupo) usando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Francia) y una prueba estadística (análisis de varianza) se realizó para analizar la homogeneidad entre los grupos. El tratamiento con anticuerpos comenzó al menos 24 h a 48 h después de la inyección IP de PBMC humana y cuando el volumen de tumor alcanzó al menos 100-150 mm^3 en todos los ratones. El programa de tratamiento con anticuerpo de TCB se basó en resultados farmacocinéticos previos y consistió en una administración IV una o dos veces por semana a través de la vena de la cola por hasta 3 semanas (es decir, total de 3 inyecciones de anticuerpo de TCB). Las muestras de sangre se recolectaron por punción de la vena yugular/mandibular (bajo anestesia) 1 h antes de cada tratamiento, 2 h antes del segundo

tratamiento y al finalizar. Las muestras de sangre se transfirieron inmediatamente a tubos que contienen activador de coágulo (tubos T MG, parte superior roja cereza, Capiject®, Terumo®). Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la coagulación. Luego los tubos se centrifugaron a 1,300 g durante 5 min para la separación de coágulo/suero. Se prepararon alícuotas de suero, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta un análisis posterior. El volumen del tumor (TV) se midió con un calibrador durante el estudio y el progreso se evaluó por la comparación intergrupar de TV. El porcentaje de crecimiento de tumor como se define como inhibición de TG (%) se determinó calculando $TG\ (%) = 100 \times (TV\ \text{mediano del grupo analizado}) / (TV\ \text{mediano del grupo tratado con vehículo de control})$.

El desarrollo de modelo del xenoinjerto de mieloma humano RPMI-8226 en ratones NOG humanizados con PBMC se realizó en primer lugar para garantizar que el modelo de xenoinjerto fuera apropiado para probar anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. Se inyectaron SC células de MM RPMI-8226 que expresan BCMA^{bajo} a ratones NOG en el día 0. En el día 22, las PBMC humanas se inyectaron IP y las células T humanas pudieron detectarse en sangre una semana después (datos no mostrados). Como se representa en la Figura 20, el crecimiento de tumor y peso corporal se midieron hasta el día 50. Desafortunada e inesperadamente, este modelo de xenoinjerto resultó inadecuado para probar la actividad antitumoral de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 por las siguientes razones: 1) el xenoinjerto de mieloma humano RPMI-8226 no creció de manera consistente en los ratones NOG humanizados con PBMC; 2) los ratones NOG humanizados con PBMC trasplantados con xenoinjerto de RPMI-8226 comenzaron a perder peso corporal poco después de la inyección IP de PBMC humanas, un signo de enfermedad de injerto contra huésped. Estos ratones fueron sacrificados por razones éticas; 3) pérdida de la expresión de BCMA observada en xenoinjerto de tumor

después de la inyección SC en el sacrificio de los ratones huésped.

Ejemplo 19: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de plasma de células mononucleares de sangre periférica o aspirados de médula ósea de pacientes con leucemia de células de plasma (PCL) en la presencia de células T autólogas inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo

La leucemia de células de plasma (PCL) es una variante leucémica de mieloma que surge ya sea *de novo* o de mieloma múltiple (MM) clínicamente preexistente. Los tratamientos actuales disponibles son bastante limitados y consisten principalmente de combinaciones de quimioterapia y fármacos para MM. Hasta la fecha, ninguna terapia ha sido registrada explícitamente para esta enfermedad altamente agresiva y mortal. BCMA juega un papel esencial en la supervivencia de las células de plasma normales y los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento de leucemia de células de plasma en un paciente que padece la enfermedad. Las células mononucleares de sangre periféricas recién tomadas (PBMC) de muestras de pacientes con leucemia de células de plasma que contienen > 80% de células de plasma en los recuentos elevados de leucocitos se aislaron por gradiente de densidad utilizando Ficoll u otros métodos comparables y se incubaron durante 24 h y 48 h con concentraciones de anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 o anticuerpos de control de 0.1 pM a 30 nM a 37°C en una atmósfera de aire humidificado. Los aspirados de médula ósea entera de pacientes con leucemia de células de plasma también se pueden usar como muestras. Cada punto de dosis se realizó por triplicado. La apoptosis se determinó por tinción con anexina/yoduro de propidio de toda la población y de las células positivas a CD 138 en un FACSCalibur usando el software Diva (BD). La viabilidad de las células de plasma y población entera de PBMC se

investigó por tinción doble con yoduro de propidio/CD138-FITC usando citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson). El análisis de los datos se realizó utilizando Software FACSDiva (Becton Dickinson). Los valores medios se normalizaron en la media sobre los triplicados del control de medio respectivo (MC). Para el análisis estadístico, se utilizó una prueba t unilateral. La inhibición máxima del crecimiento celular de PCL a una concentración de 10 nM (IMAX10) y la inhibición medida a 1 nM (IMAX1), respectivamente, se dan en porcentaje como se refiere al control de medio. La inhibición máxima de anticuerpo de TCB de control (10 o 30 nM) en comparación con el control de medio también se midió. Los cálculos se realizaron utilizando R 3.1.19 y Bioconductor 2.1310, pero para el cálculo de los valores IMAX (Microsoft Excel®, Microsoft Office Professional 2013). Un efecto se consideró estadísticamente significativo si el valor P de su prueba estadística correspondiente es < 5% (*), < 1% (**) o < 0.1% (***). La expresión de BCMA también se midió en células de plasma CD138⁺ de PBMC de muestra de pacientes con leucemia de células de plasma, así como también se determinó la relación de células efectoras a células de tumor (E:T). Como se muestra en la Figura 20, los resultados claramente muestran que hubo células leucémicas de células de plasma de médula ósea viables significativamente reducidas con 42-TCBcv (es decir, más lisis de las células leucémicas de células de plasma de médula ósea) en dos muestras de pacientes con leucemia de células de plasma en comparación con el control de medio. La Tabla 27 demuestra el porcentaje de la inhibición máxima de células leucémicas de células de plasma de aspirados de médula ósea de pacientes o sangre periférica inducida por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 10 nM (IMAX10) y 1 nM (IMAX1) en relación con el control de medio. Los resultados demuestran que 42-TCBcv es muy potente para inducir la matanza de células leucémicas de células de plasma de médula ósea de pacientes. A pesar de la lisis específica de

células leucémicas de células de plasma de médula ósea inducidas por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y muestras de médula ósea observadas (paciente 1 con PCL), el microambiente de médula ósea (BMME) no se vio afectado en las 5 muestras respectivas (datos no mostrados).

Tabla 27. Valores de IMAX10 e IMAX1 con respecto a la inhibición máxima de crecimiento de células de plasma de leucemia de células de plasma a 10 nM (IMAX10) e inhibición a 1 nM (IMAX1) con base en 10 células leucémicas de células de plasma viables negativas a yoduro de propidio de aspirados de médula ósea de pacientes en la presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3.

No. de muestra de paciente	42-TCBcv		TCB de Control
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	99.6	88.2	-2.7
2	~60.0	~40.0	~8.0

Ejemplo 20: Citotoxicidad de células T redirigidas de células de 15 plasma de médula ósea de pacientes con AL-amiloidosis en la presencia de células T autólogas inducidas por anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo

La AL-amiloidosis es una enfermedad rara causada por un trastorno de la médula ósea que normalmente afecta a personas de 20 edades de 50-80 años y con dos tercios de los pacientes siendo masculinos. La AL-amiloidosis se refleja por una producción anormal de anticuerpo/proteína de inmunoglobulina por las células de plasma. En la AL-amiloidosis, las cadenas ligeras (CL) del anticuerpo se mal plegaron y el resultado de proteína mal plegada de LC anormal es la 25 formación de amiloide. Estas proteínas amiloides mal plegadas se

depositaron en y alrededor de tejidos, nervios y órganos. A medida que el amiloide se acumuló en un órgano, nervio o tejido, gradualmente causó daño y afectó su función. Los pacientes con AL-amiloidosis a menudo se ven afectados con más de un órgano. Puesto que BCMA juega un papel esencial en la supervivencia de las células de plasma normales, es muy justificado evaluar el efecto de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en la matanza de células de plasma en AL-amiloidosis. Los aspirados/muestras de médula ósea entera de pacientes con AL-amiloidosis recién tomadas ya sea se expusieron directamente a los anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 o se tiñeron con microperlas magnéticas de CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), pasados a través de una columna de separación de células autoMACS y las fracciones recolectadas con suficiente cantidad restante de células de plasma de AL-amiloidosis de habitualmente > 4% se usaron para experimentos adicionales. En placas de 24 cavidades, 500,000 células/cavidad se incubaron y se cultivaron durante 48 horas. Las diluciones de anticuerpos de TCB anti-BCMA/anti-CD3 y anticuerpo de control se añadieron a las cavidades respectivas para una concentración de TCB final de 0.1 pM a 30 nM. Cada punto de dosis se realizó por triplicado. La viabilidad de las células de plasma y células del microambiente de médula ósea se investigó por tinción doble con yoduro de propidio/CD138-FITC usando citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson). El análisis de datos se realizó utilizando Software FACSDiva (Becton Dickinson). Los valores medios se normalizaron en el medio sobre los triplicados del control de medio respectivo (MC). Para el análisis estadístico, se utilizó una prueba t unilateral. La inhibición máxima de crecimiento celular de PCL a una concentración de 10 nM (IMAX10) y la inhibición medida a 1 nM (IMAX1), respectivamente, se dan en porcentaje como es referido al control de medio. La inhibición máxima del anticuerpo de TCB de control (10 o 30 nM) en comparación con el control de medio también

se midió. Los cálculos se realizaron usando R 3.1.19, y Bioconductor 2.13.10, pero para el cálculo de los valores de IMAx (Microsoft Excel®, Microsoft Office Professional 2013). Un efecto se consideró estadísticamente significativo si el valor P de su prueba estadística correspondiente es $< 5\%$ (*), $< 1\%$ (**) o $< 0.1\%$ (***). La expresión de BCMA también se midió en células de plasma CD138⁺ de médula ósea de muestras de pacientes con AL-amiloidosis así como también se determinó la relación de células efectoras a células de tumor (E:T).

10

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno de maduración de células B humanas (BCMA), caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1H, CDR2H, CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32

2. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o

c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

5 3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque comprende como región de VH una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL seleccionada del grupo que consiste de regiones de VL de la SEQ ID NO: 12, 13, y 14.

10 4. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y a CD3ε humano (nombrado adicionalmente también como "CD3"), caracterizado porque comprende una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una CDR1H, CDR2H, CDR1L, y combinación de región CDR2L seleccionada del grupo de

15 a) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 23, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,

b) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 25, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 20 26,

c) región CDR1H de la SEQ ID NO: 21 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 22, región CDR1L de la SEQ ID NO: 27, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28,

d) región CDR1H de la SEQ ID NO: 29 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 25 30, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32,

e) región CDR1H de la SEQ ID NO: 34 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 35, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32, y

30 f) región CDR1H de la SEQ ID NO: 36 y región CDR2H de la SEQ ID NO: 37, región CDR1L de la SEQ ID NO: 31, y región CDR2L de la SEQ ID NO: 32

5. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos objetivos que son el dominio extracelular de BCMA humano (nombrado adicionalmente también como "BCMA") y CD3ε humano (nombrado adicionalmente también como "CD3"), caracterizado porque comprende una región de VH que comprende una región CDR1H de la SEQ ID NO: 21, una región CDR2H de la SEQ ID NO: 22 y una región CDR3H de la SEQ ID NO: 17 y una región de VL que comprende una región CDR3L de la SEQ ID NO: 20 y una combinación de región CDR1L y CDR2L seleccionada del grupo de

- a) región CDR1L de la SEQ ID NO: 23 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 24,
- b) región CDR1L de la SEQ ID NO: 25 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 26, o
- c) región CDR1L de la SEQ ID NO: 27 y región CDR2L de la SEQ ID NO: 28.

6. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque comprende como región de VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 12, o como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 13, o como VH de BCMA una región de VH de la SEQ ID NO: 10 y como región de VL una región de VL de la SEQ ID NO: 14.

7. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque comprende la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a CD3, en donde los dominios variables de VL y VH o los dominios constantes de CL y CH1 se reemplazan entre sí.

8. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado porque el dominio variable de VH de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado adicionalmente "VH de CD3") comprende las CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena

pesada y el dominio variable de VL de la porción de anticuerpo anti-CD3 (nombrado adicionalmente "VL DE CD3") comprende las CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera.

5 9. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y CD3, caracterizado porque comprende

a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

10 b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

c) en donde en el dominio constante de CL de la primera cadena ligera
15 bajo a) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde el dominio constante de CH1 de la primera cadena pesada bajo a) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos
20 independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D).

10. Un anticuerpo biespecífico específicamente de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque comprende además un fragmento Fab del primer anticuerpo (nombrado adicionalmente también "BCMA-Fab") y en el dominio constante de CL
25 del BCMA-Fab, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante de CH1 del BCMA-Fab, el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico
30 (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver, por ejemplo, Figuras 2A, 2C).

11. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a

BCMA y CD3, caracterizado porque comprende

- a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- 5 b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a CD3, y en donde los dominios variables de VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y en donde
- c) en el dominio constante de CL de la segunda cadena ligera bajo b) el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente
- 10 por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante de CH1 de la segunda cadena pesada bajo b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 están sustituidos independientemente
- 15 por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).

12. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, caracterizado porque comprende no más de un fragmento Fab de una porción de anticuerpo anti-CD3, no más de

20 dos fragmentos Fab de una porción de anticuerpo anti-BCMA y no más de una parte de Fc.

13. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, caracterizado porque comprende una parte de Fc enlazada con su extremo N terminal al extremo C terminal

25 del fragmento Fab de anticuerpo CD3 y al extremo C terminal de uno de los fragmentos Fab de anticuerpo de BCMA.

14. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, caracterizado porque comprende un segundo fragmento Fab de la porción de anticuerpo anti-BCMA enlazado

30 con su extremo C terminal al extremo N terminal de la porción de anticuerpo CD3 del anticuerpo biespecífico.

15. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la

reivindicación 14, caracterizado porque el dominio de VL del fragmento Fab de anticuerpo anti-CD3 se enlaza al dominio de CH1 del segundo fragmento Fab de anticuerpo anti-BCMA.

16. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a BCMA y a CD3, caracterizado porque comprende un conjunto de cadena pesada y ligera seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos

i) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 (2x),

ii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 (2x),

y

iii) SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 (2x).

17. Un método para la preparación de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque comprende las etapas de

a) transformar una célula huésped con

b) vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,

c) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de la molécula de anticuerpo; y

d) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo.

18. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

19. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso como un medicamento.

20. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células de plasma.

21. Una composición farmacéutica, caracterizada porque

comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso como un medicamento en el tratamiento de mieloma múltiple o lupus eritematoso sistémico o leucemia de células de plasma o AL-amiloidosis.

5 22. Un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende una porción de reconocimiento de antígeno dirigido contra BCMA y una porción de activación de célula T, caracterizado porque la porción de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo monoclonal o
10 fragmento de anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

 23. Un método de generación de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a BCMA, que agota como anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, células
15 de plasma malignas humanas en aspirados de médula ósea de mieloma múltiple MM en una manera de al menos 80% después de un tratamiento de 48 horas en una concentración de entre 10 nM y 1 fM inclusive, anticuerpo anti-BCMA, caracterizado por

a) cribar una biblioteca de expresión en fagos de cadena pesada variable (VH) de la SEQ ID NO: 9 con BCMA cynomolgus 1-50 nM en 1-3
20 rondas y seleccionar una cadena pesada variable, que cuando se combina con la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 11 a un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera,

25 c) cribar una biblioteca de expresión en fagos de cadena ligera variable (VL) de la SEQ ID NO: 11 con BCMA cynomolgus 1-50 nM en 1-3 rondas y b) seleccionar una cadena ligera variable, que cuando se combina con la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 9 a un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las
30 reivindicaciones 4 a 16 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera, y

combinar la cadena pesada variable seleccionada y la cadena ligera

variable seleccionada para formar un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16 agota tales células de plasma malignas humanas de tal manera.