

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente No. NC2018/0008338

**Solicitud de patente de invención titulada: “ANTICUERPOS
HETERODIMÉRICOS QUE SE UNEN A CD3 Y A ANTÍGENOS
TUMORALES”**

Solicitante: XENCOR INC.

Nuestra Ref.: P2017/000093A

**RESPUESTA AL OFICIO No. 13089 NOTIFICADO EL 06 DE NOVIEMBRE DE
2018**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo (C.P.A.C.A):

1. a- La Examinadora señala que el Capítulo Descriptivo de la presente solicitud divisional aun se refiere a anticuerpos de unión a CD19, CD20 y CD38, por lo que incumple con el requisito de la Resolución 3719 de 2016, ya que el Capítulo Descriptivo debe limitarse al objeto reclamado en la presente divisional.

b- En respuesta, respetuosamente difiero de la opinión de la Examinadora sobre la obligación del Solicitante de adaptar el Capítulo Descriptivo de la solicitud divisional únicamente a la materia allí reclamada, pues en este caso tal requerimiento resulta excesivo e incluso podría afectar los requisitos de soporte y reproducibilidad de la invención, establecidos en el art. 28 de la Decisión 486. Vale la pena resaltar que es requisito fundamental en el derecho de patentes que el Capítulo Descriptivo sea lo suficientemente claro y completo como para que la invención reivindicada sea entendida por completo por una persona medianamente versada en la materia, además de reproducible sin necesidad de experimentación adicional excesiva (*“para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla”* establece el art. 28 de la Decisión 486).

En este sentido, llamo su atención sobre la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la Superintendencia de Industria y Comercio (en adelante, Guía de la SIC), en particular sobre la sección 2.7 relacionada directamente con el Capítulo Descriptivo, donde la Guía de la SIC señala que las modalidades preferidas o los ejemplos de las mismas son casos particulares que sirven para ilustrar la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a cabo la invención¹, más en ningún momento establece que dichas modalidades o ejemplos deben ser restrictivos de manera que se refieran únicamente a la materia reivindicada. Es más, **es una práctica común en el campo de patentes que el Capítulo Descriptivo incluya más información que la reclamada en el Capítulo Reivindicatorio**, pues el objetivo del Capítulo Descriptivo es precisamente contextualizar y brindar detalles del invento, incluso incorporando información y modalidades que no hagan parte de las reivindicaciones.

Por el contrario, la Guía de la SIC señala que la invención estaría insuficientemente descrita si las reivindicaciones abarcan un campo extenso, y el número de ejemplos, modalidades o variaciones no es suficiente para soportar el alcance reclamado, hasta el punto que para la persona medianamente versada en la materia no sea posible reproducir la invención sin acudir a experimentación adicional. En tal caso, se consideraría que sólo hay algunas modalidades preferidas adecuadamente soportadas y que el Capítulo Descriptivo no cumpliría el requisito de suficiencia, por lo que las reivindicaciones no tendrían soporte en el Capítulo Descriptivo.²

Ahora bien, no existe obligación alguna de limitar las modalidades del Capítulo Descriptivo estrictamente al alcance de la materia reclamada, pues esta medida reduciría de manera injusta el concepto inventivo al que el inventor tiene derecho. Asimismo, la posibilidad de obtener protección de la invención en diversas modalidades es una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes, ya que una patente de invención no se limita a una única modalidad, sino que cubre un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención.

Además, vale la pena recordar que la función de las modalidades preferidas y los ejemplos de las mismas en el Capítulo Descriptivo son **estrictamente ilustrativas** y de ninguna manera pueden considerarse como el único alcance reivindicable posible. Reclamar estrictamente aquello ejemplificado en el Capítulo Descriptivo o una modalidad específica limita injustamente el alcance de la protección a la cual el inventor tiene derecho. Es más, desde la óptica de defensa de las patentes en litigios de infracción, dicho alcance

¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio (2014) Sección 2.7, p. 91.

² Ibídem, Sección 2.7.2, p. 93 y 94.

injustamente limitado haría inútil el derecho de patentes, pues los elementos específicos ilustrados en los ejemplos y así reivindicados, deberían necesariamente estar presentes en el producto o proceso infractor, lo cual facilita el diseño alrededor de derechos legítimos.

En el presente caso, el Capítulo Descriptivo radicado al momento de radicar la divisional se adaptó para evitar hacer referencia a la materia reclamada en la solicitud parental, que corresponde a modalidades de los anticuerpos heterodiméricos CD3xCD20. Las restantes modalidades divulgadas en la presente solicitud, tales como aquellas reclamadas en la divisional y otras (anti CD19 y CD38) no fueron eliminadas pues, como se señaló anteriormente, limitar el Capítulo Descriptivo a aquella información que únicamente da soporte a la materia reclamada en la divisional puede afectar el cumplimiento de otros requisitos establecidos en la norma supranacional, la Decisión 486, con el fin de cumplir lo establecido en la Resolución 3719 de 2016 expedida por la SIC.

Sin perjuicio de lo anterior y con el único fin de que la presente divisional sea aceptada a trámite, me permito presentar un **Capítulo Descriptivo Modificado** con control de cambios y una versión en limpio, que además de reemplazar en su totalidad al Capítulo Descriptivo radicado el 8 de agosto de 2018, permite evidenciar de manera clara cada una de las modificaciones realizadas de tal forma que se eliminan las referencias de los anticuerpos CD38 y CD19 en la descripción detallada del presente Capítulo Descriptivo, sin embargo las referencias de dichos anticuerpos en los ejemplos y antecedentes del mismo se mantienen, permitiendo que cualquier persona medianamente versada en la materia pueda reproducir en su totalidad el concepto inventivo reclamado sin necesidad de acudir a información o experimentación adicional. Por todo lo anterior considero superada la objeción al respecto.

2. a- La Examinadora señala que los ejemplos del Capítulo Descriptivo únicamente hacen referencia a anticuerpos anti CD3xCD38, por lo que no se presenta un adecuado soporte de la materia reclamada en la presente solicitud divisional

b- En cuanto al momento procesal en el que la Examinadora eleva objeciones contra el soporte de la materia reclamada en la presente solicitud, me permito señalar respetuosamente que cualquier requerimiento relacionado con los requerimientos sustantivos, tales como el soporte del Capítulo Reivindicatorio, que se realice en esta etapa en la que la solicitud divisional ni siquiera ha sido aceptada a trámite es irregular. El objetivo del requerimiento elevado en el marco del artículo 17 del C.P.A.C.A tiene como objetivo que la entidad administrativa le informe al solicitante los documentos o información necesaria para poder completar la solicitud realizada, para lo cual, le otorga un término en el cual el solicitante debe completarla.

En el caso de las solicitudes de patente divisionales, la SIC ha utilizado lo previsto por el artículo 17 del C.P.A.C.A para verificar que dicha solicitud divisional presentada cumpla con los requisitos de la Resolución 3719 de 2016 y del artículo 36 de la Decisión 486, más no para que reemplace el examen de fondo establecido en el artículo 45 de la Decisión 486. Lo anterior se resume en el punto 1 del Oficio 13089 del 06 de noviembre de 2018.

Así, el Oficio que aquí se responde solamente pretende la verificación de requerimientos específicos, valga la redundancia, **formales**, correspondientes a la Resolución 3719 de 2016 y del artículo 36 de la Decisión 486 y no un análisis de fondo de la solicitud divisional que se debe realizar en virtud del Artículo 45 (por ejemplo, análisis de la claridad, soporte o unidad de invención). Por el contrario, el requerimiento de que la solicitud divisional encuentra soporte en los ejemplos, tal como lo pide la Examinadora, no encuentra sustento ni en el artículo 36 de la Decisión 486 ni en la Resolución 3719 de 2016 y tiene relación con el artículo 28 de la Decisión cuyo cumplimiento se debe verificar como parte del examen de fondo, esto es, del artículo 45 de la Decisión 486.

Por lo tanto, considero que las objeciones elevadas por la Examinadora respecto al soporte de las reivindicaciones en esta etapa del trámite son injustificados y se extralimitan según las disposiciones legales aplicables pues el soporte de las reivindicaciones **no debe** ser estudiado durante esta etapa del examen de forma.

Sin perjuicio de lo anterior, me permito señalarle a la Examinadora que la materia reclamada sí encuentra soporte en el Capítulo Descriptivo, pues a lo largo de la misma se divulgan anticuerpos heterodiméricos CD3xCD123, como se evidencia en el Capítulo Descriptivo Modificado adjunto. Adicionalmente, y como la Examinadora debe saberlo, el soporte de la materia reclamada también se encuentra en las Figuras de la solicitud, las cuales en este caso proporcionan ejemplos de modalidades específicas que se encuentran dentro de las alcance de las reivindicaciones. En particular, la Figura 123 de la presente solicitud proporciona ilustración de algunas modalidades de la invención, por lo que considero superada cualquier objeción al respecto. Sin embargo, en el caso de que la Examinadora considere que la objeción no ha sido superada, le solicito respetuosamente ésta sea elevada en el marco del artículo 45 de la Decisión 486, con el término legal que dicho artículo proporciona al solicitante.

Por consiguiente, considero que el Capítulo Descriptivo Modificado adjuntos cumplen con los requerimientos del Título X sección 1.2.2.3.2.1 de la Circular Única, en cuanto que el contenido del Capítulo Descriptivo corresponde a la materia reclamada en la presente solicitud.

3. En adición a lo anterior, me permito presentar adjunto al presente memorial las

Figuras Modificadas No. 68 L-Z, 71 a 106 y 121 a 123. Particularmente, en las Figuras Modificadas 68 L-Z, 71 a 106 y 121 a 123 se incluyeron los números de SEQ ID NO para las secuencias divulgadas previamente en dichas figuras. Dicha modificación se realizó también en fase internacional y en la solicitud parental, pues las SEQ ID NO: de las Figuras 68 L-Z, 71 a 106 y 121 a 123 originalmente presentadas no estaban identificadas por su número, sino por “XXXX”. Así, las figuras modificadas adjuntas al presente memorial pretenden corregir un error tipográfico de la solicitud internacional, más no adicionar materia.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Descriptivo Modificado con control de cambios;
- Capítulo Descriptivo Modificado en limpio;
- Figuras Modificadas.

**Anticuerpos heterodiméricos que se unen a CD3 y a antígenos
tumorales**

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad según el artículo
5 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de
Estados Unidos n.º 62/085,117 presentada el 26 de noviembre
de 2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados
Unidos n.º 62/084,908 presentada el 26 de noviembre de
2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos
10 n.º 62/085,027 presentada el 26 de noviembre de 2014, la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º
62/085,106 presentada el 26 de noviembre de 2014 la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º
62/159,111 presentada el 8 de mayo de 2015, la Solicitud de
15 Patente Provisional de Estados Unidos n.º 62/251,005
presentada el 4 de noviembre de 2015 y la Solicitud de
Patente Provisional de Estados Unidos n.º 62/250,971,
presentada el 4 de noviembre de 2015, todas ellas
incorporadas expresamente en el presente documento por
20 referencia en su totalidad, con referencia particular a las
figuras, leyendas y reivindicaciones del presente
documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se han usado satisfactoriamente agentes terapéuticos
25 basados en anticuerpos para tratar una diversidad de
enfermedades, incluyendo cánceres y trastornos
autoinmunitarios/inflamatorios. Sin embargo aún se
necesitan mejoras en esta clase de fármacos,
particularmente con respecto al aumento de su eficacia
30 clínica. Una vía que se está explorando es la obtención por
ingeniería genética de sitios de unión a antígeno

adicionales y nuevos en fármacos basados en anticuerpos de tal forma que una sola molécula de inmunoglobulina se acople al mismo tiempo con dos antígenos diferentes. Dichos formatos de anticuerpo no nativos o alternos que se acoplan con dos antígenos diferentes con frecuencia se denominan
5 biespecíficos. Debido a la diversidad considerable de la región variable del anticuerpo (Fv) se hace posible producir un Fv que reconozca prácticamente cualquier molécula, el enfoque típico para la generación biespecífica
10 es la introducción de nuevas regiones variables en el anticuerpo.

Se han explorado varios formatos de anticuerpo alternos para la dirección biespecífica (Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger y Hudson, 2005, Nature
15 Biotechnology 23[9]:1126-1136; Kontermann, mAbs 4(2):182 (2012), y todos ellos se incorporan expresamente en el presente documento por referencia). Inicialmente, se prepararon anticuerpos biespecíficos fusionando dos líneas celulares que producían, cada una, un solo anticuerpo
20 monoclonal (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-540). Aunque el hibridoma o cuadroma híbrido resultante producía anticuerpos biespecíficos, solo eran una población minoritaria y se necesitaba una purificación extensiva para aislar el anticuerpo deseado. Una solución de ingeniería
25 genética para esto fue el uso de fragmentos de anticuerpo para preparar biespecíficos. Como dichos fragmentos carecen de la estructura cuaternaria compleja de un anticuerpo de longitud completa, las cadenas ligera y pesada variables pueden unirse en construcciones genéticas individuales. Se
30 han generado fragmentos de anticuerpo de muchas formas diferentes, incluyendo diacuerpos, diacuerpos

monocatenarios, scFv en tándem y Fab₂ biespecíficos (Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; incorporado expresamente en el presente documento por referencia).

5 Aunque estos formatos pueden expresarse a altos niveles en bacterias y pueden tener efectos beneficiosos de penetración favorables debido a su pequeño tamaño, se eliminan rápidamente *in vivo* y pueden presentar obstáculos de fabricación relacionados con su producción y

10 estabilidad. Una causa principal de estos inconvenientes es que los fragmentos de anticuerpo típicamente carecen de la región constante del anticuerpo con sus propiedades funcionales asociadas, incluyendo un mayor tamaño, alta estabilidad y unión a diversos receptores Fc y ligandos que

15 mantienen una larga semivida en suero (es decir, el receptor Fc neonatal FcRn) o servir como sitios de unión para la purificación (es decir proteína A y proteína G).

Un trabajo más reciente ha intentado solucionar los inconvenientes de los biespecíficos basados en fragmentos

20 mediante la creación por ingeniería genética de una unión doble en formatos de tipo anticuerpo de longitud completa (Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297; USSN12/477,711; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo et al., 2000, Protein Engineering

25 13[5]:361-367; USSN09/865,198; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; incorporado expresamente en el presente documento por referencia).

Estos formatos solucionan algunos de los obstáculos de los

30 biespecíficos de fragmentos de anticuerpo, principalmente porque contienen una región Fc. Un inconveniente

significativo de estos formatos es que, como construyen nuevos sitios de unión a antígeno en la parte superior de las cadenas constantes homodiméricas, la unión al nuevo antígeno siempre es bivalente.

5 Para muchos antígenos que son atractivos como codianas en un formato biespecífico terapéutico, la unión deseada es monovalente más bien que bivalente. Para muchos receptores inmunitarios, la activación celular se realiza por entrecruzamiento de una interacción de unión monovalente.

10 El mecanismo de entrecruzamiento típicamente está mediado por complejos inmunitarios de anticuerpo/antígeno, o a través del acoplamiento de una célula efectora a una célula diana. Por ejemplo, los receptores Fc gamma de baja afinidad (FcγR) tales como FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa se

15 unen de forma monovalente a la región Fc del anticuerpo. La unión monovalente no activa a las células que expresan estos FcγR; sin embargo, tras la formación de complejos inmunitarios o el contacto entre una célula y otra, los receptores se entrecruzan y agrupan en la superficie

20 celular, llevando a la activación. En el caso de receptores responsables de mediar la destrucción celular, por ejemplo, FcγRIIIa en células citolíticas naturales (NK), el entrecruzamiento de receptores y la activación celular se

25 produce cuando la célula efectora se acopla a la célula diana en un formato de alta avidéz (Bowles y Weiner, 2005, J Immunol Methods 304: 88-99, incorporado expresamente por referencia).. De forma similar, en las células B, el receptor inhibidor FcγRIIb regula negativamente la

30 activación de células B solo cuando se acopla en un complejo inmunitario con el receptor de células B de la superficie celular (BCR), un mecanismo que está mediado por

la formación de complejos inmunitarios de IgG solubles con el mismo antígeno que se reconoce por el BCR (Heyman 2003, Immunol Lett 88[2]: 157-161; Smith y Clatworthy, 2010, Nature Reviews Immunology 10: 328-343; incorporado expresamente por referencia). Como otro ejemplo, se produce activación por CD3 de células T solo cuando su receptor de células T asociado (TCR) se acopla al MHC cargado con antígeno sobre células presentadoras de antígeno en una sinapsis célula a célula de alta avidez (Kuhns et al., 2006, Immunity 24: 133-139). De hecho, el entrecruzamiento bivalente no específico de CD3 usando un anticuerpo anti-CD3 induce una tormenta de citocinas y toxicidad (Perruche et al., 2009, J Immunol 183[2]: 953-61; Chatenoud y Bluestone, 2007, Nature Reviews Immunology 7: 622-632; incorporado expresamente por referencia). De esta manera, para el uso clínico práctico, el modo preferido de co-acoplamiento de CD3 para la destrucción redirigida de células diana es una unión monovalente que da como resultado la activación solo después del acoplamiento con la diana co-acoplada.

CD38, también conocido como ADP cíclico ribosa hidrolasa, es una glicoproteína transmembrana de tipo II con un largo dominio extracelular C terminal y un corto dominio citoplásmico N terminal. Entre las células hematopoyéticas, una colección de efectos funcionales se han atribuido a la señalización mediada por CD38, incluyendo proliferación de linfocitos, liberación de citocinas, regulación del desarrollo y supervivencia de células B y células mieloides, e inducción de la maduración de células dendríticas. CD38 carece de regulación en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares

derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas incluyendo el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de
5 células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otra parte, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38-. A pesar del reciente progreso en
10 el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerosos, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 siguen teniendo un mal pronóstico. De esta manera, existe la necesidad de métodos mejorados para tratar dichas formas de cáncer.

15 El antígeno CD19 de células B (CD19, también conocido como antígeno de superficie de células B B4, Leu-12) es un marcador de superficie de todas las células B humanas que se expresa desde las primeras etapas del desarrollo de células pre-B hasta la diferenciación terminal en células
20 plasmáticas. CD19 promueve la proliferación y supervivencia de células B maduras. Se asocia en un complejo con CD21 en la superficie celular. También se asocia con CD81 y Leu-13 y potencia la señalización del receptor de células B (BCR). Junto con BCR, CD19 modula umbrales de señalización
25 intrínsecos e inducidos por receptores de antígenos críticos para la expansión clonal de células B e inmunidad humoral. En colaboración con CD21, asocia el sistema inmunitario adaptativo y el innato. Tras la activación, la cola citoplásmica de CD19 se fosforila, lo cual conduce a
30 la unión por quinasas de la familia Src y el reclutamiento de la PI-3 quinasa. Es una diana de inmunoterapia atractiva

para cánceres de origen linfoide ya que también se expresa en la inmensa mayoría de células NHL así como en algunas leucemias.

Se han evaluado varios anticuerpos o conjugados de anticuerpo que se dirigen a CD19 en estudios preclínicos o en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres. Estos anticuerpos o conjugados de anticuerpo anti-CD19 incluyen, pero sin limitación, MT-103 (un anticuerpo CD19/CD3 biespecífico monocatenario; Hoffman et al, 2005 Int J Cancer 115: 98-104; Schlereth et al, 2006 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514), un diacuerpo CD19/CD16 (Schlenzka et al, 2004 Anti-cancer Drugs 15: 915-919; Kipriyanov et al, 2002 J Immunol 169: 137-144), BU12-saporina (Flavell et al, 1995 Br J Cancer 72: 1373-1379), y anti-CD19-idarrubicina (Rowland et al, 1993 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514); todos incorporados expresamente por referencia.

CD123, también conocido como receptor alfa de interleucina 3 (IL-3R α), se expresa en células dendríticas, monocitos, eosinófilos y basófilos. CD123 también se expresa de forma constitutiva por células madre/progenitoras hematopoyéticas comprometidas, por la mayoría de las células de linaje mieloide (CD13+, CD14+, CD33+, CD15^{low}), y por algunas células CD19+. Está ausente de las células CD3+.

De esta manera, aunque los biespecíficos generados a partir de fragmentos de anticuerpo sufren obstáculos biofísicos y farmacocinéticos, un inconveniente de los construidos con formatos de tipo anticuerpo de longitud completa es que se acoplan a antígenos co-diana de forma multivalente en ausencia del antígeno diana primario,

llevando a una activación no específica y posiblemente a toxicidad. La presente invención resuelve este problema mediante la introducción de nuevos anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD3 y CD38.

5 **BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable;
10 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo C de dicho dominio de Fc usando
15 un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada constante que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero
20 variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un
25 primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho primer dominio ligero variable está unido covalentemente al extremo C de dicho primer dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que
30 comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo

dominio de Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio de Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común
5 que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que
10 comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio de Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; donde dicho
15 scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada
20 constante que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer
25 monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho segundo dominio ligero variable está unido
30 covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 de dicho primer dominio pesado constante y el extremo N de dicho

primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio de Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio de Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio de Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En algunos aspectos, el primer y el segundo dominios de Fc tienen un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q. Además, el o los dominios pesados variables y el o los dominios ligeros variables se unen a un primer antígeno tumoral diana (TTA), el scFv se une a un segundo

TTA o a CD3 humano. En algunas realizaciones, el TTA se selecciona del grupo que consiste en CD123.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a antígeno anti-CD3 que tienen CDR y/o los dominios variables y/o las secuencias de scFv representadas en las Figuras para H1.32_L1.47, H1.89_L1.47, H1.90_L1.47, H1.33_L1.47 y H1.31_L1.47. La invención proporciona además composiciones de ácido nucleico, composiciones de vectores de expresión y células hospedadoras.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable; en donde el scFv anti-CD3 se selecciona del grupo que consiste en anti-CD3 H1.32_L1.47, anti-CD3 H1.89_L1.47, anti-CD3 H1.90_L1.47 y anti-CD3 H1.33_L1.47 (SEQ ID NO:XX). El dominio variable pesado y el dominio variable ligero se unen a TTA (incluyendo, pero sin limitación a CD123).

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii)

un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable; en donde las cadenas ligera y pesada variables forman un dominio de unión de C2B8 H1.202_L1.113 o CDB8_H1L1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable. En esta realización, los dominios variables se unen a CD123 y pueden tener las secuencias de 7G3_H1.109_L1.47.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B representan varios formatos de la presente invención. Se representan dos formas del "abridor de botellas", uno con el dominio de unión a antígeno anti-

CD3 que comprende un scFv y el dominio de unión a antígeno anti-TTA que comprende un Fab, y otro con estos invertidos. También se muestran los formatos mAb-Fv, mAb-scFv, Central-scFv y Central-Fv. Además, se muestran formatos "uno-armado", donde un monómero solo comprende un dominio de Fc, tanto un brazo Central-scFv como un brazo Central-Fv. También se muestra un formato de scFv doble.

La Figura 2 representa las secuencias de las construcciones anti-CD3_H1.30_L1.47 "High CD3", incluyendo los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 3 representa las secuencias de la construcción de anti-CD3_H1.32_L1.47 "High-Int #1", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 4 representa las secuencias de la construcción de anti-CD3_H1.89_L1.47 "High-Int #2", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las

secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 5 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 "High-Int #3", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 6 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 "Int", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 7 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.31_L1.47 "Low", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 8 representa las secuencias de la construcción High CD38: OKT10_H1.77_L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 9 representa las secuencias de la construcción intermediate CD38: OKT10_H1L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 10 representa la secuencia de la construcción Low CD38: OKT10_H1L1, incluyendo los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 11 representa las secuencias de XENP15331.

La Figura 12 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 13 representa las secuencias de XENP14702.

La Figura 14 representa las secuencias de XENP15426.

La Figura 15 representa las secuencias de XENP14701.

La Figura 16 representa las secuencias de XENP14703.

La Figura 17 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 18 representa las secuencias de XENP18967.

La Figura 19 representa las secuencias de XENP18971.

La Figura 20 representa las secuencias de XENP18969.

La Figura 21 representa las secuencias de XENP18970.

La Figura 22 representa las secuencias de XENP18972.

La Figura 23 representa las secuencias de XENP18973.

La Figura 24 representa las secuencias de XENP15055.

La Figura 25 representa las secuencias de XENP13544.

La Figura 26 representa las secuencias de XENP13694.

La Figura 27 representa las secuencias de CD3 ϵ humana.

La Figura 28 representa la longitud completa (SEQ ID NO:130) y el dominio extracelular (ECD; SEQ ID NO:131) de la proteína CD38 humana.

La Figura 29A-29E representa pares útiles de conjuntos de variantes de heterodimerización (incluyendo las variantes skew y pI).

La Figura 30 representa una lista de regiones constantes de anticuerpo variante isostérico y sus sustituciones respectivas. pI₍₋₎ indica variantes de pI inferior, mientras que pI₍₊₎ indica variantes de pI superior. Estas pueden combinarse de forma opcional e independiente con otras variantes de heterodimerización de la invención (y también otros tipos de variantes, como se indica en el presente documento).

La Figura 31 representa variantes de ablación útiles que anular la unión a Fc γ R (denominadas algunas veces "variantes knock out" o "KO").

La Figura 32 muestra dos realizaciones particularmente útiles de la invención.

La Figura 33 representa varios enlazadores de scFv cargados que encuentran utilidad en el aumento o disminución del pI de anticuerpos heterodiméricos que utilizan uno o más scFv como componente. Un enlazador de scFv individual de la técnica anterior con una sola carga se denomina "Whitlow", de Whitlow et al., Protein Engineering 6(8): 989-995 (1993). Debe tenerse en cuenta que este enlazador se usó para reducir la agregación y aumentar la estabilidad proteolítica de los scFv.

La Figura 34 representa una lista de variantes de Fc con desviación de heterodímero obtenidas por ingeniería genética con rendimientos de heterodímeros (determinados por HPLC-CIEX) y estabilidades térmicas (determinadas por DSC). La estabilidad térmica no determinada se indica por "n.d."

Figura 35 Rendimientos de expresión de biespecíficos después de purificación de afinidad en proteína A.

Figura 36 Cromatogramas de purificación de intercambio catiónico.

Figura 37 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, incubación 24 h, 10.000 células RPMI8226, 400.000 células T. Los artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por LDH

Figura 38 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC humanas. Los artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por LDH

La Figura 39 representa las secuencias de XENP14419.

La Figura 40 representa las secuencias de XENP14420.

La Figura 41 representa las secuencias de XENP14421.

La Figura 42 representa las secuencias de XENP14422.

La Figura 43 representa las secuencias de XENP14423.

Figura 44 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 96 h de incubación, 40.000 células RPMI8226, 400.000 PBMC humanas. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD38+.

Figura 45 Análisis adicional de ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas descrito en la Figura 1. La primera fila muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) del marcador de activación CD69 sobre células CD4+ y CD8+ detectadas por citometría de flujo. La segunda fila muestra el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que son Ki-67+, una medida de la proliferación celular. La tercera fila muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) intracelular del inhibidor de granzyme B PI-9 en células T CD4+ y CD8+ detectado por citometría de flujo.

Figura 46 Diseño de estudio de ratón para examinar la actividad antitumoral de Fab-scFv-Fc biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3.

Figura 47 Tamaño tumoral medido por IVIS® en función del tiempo y el tratamiento

Figura 48 Imágenes bioluminiscentes IVIS® (Día 10)

Figura 49 Reducción de células CD38⁺ en monos cinomolgus después de dosis únicas de los artículos de ensayo indicados

Figura 50 Activación de células T medida por Intensidad Media de Fluorescencia de CD69 (MFI) en monos cinomolgus, la codificación de colores es como en la Figura 49.

Figura 51 Niveles en suero de IL-6, después de dosis únicas de los artículos de ensayo indicados.

La Figura 52 representa las secuencias de XENP15427.

La Figura 53 representa las secuencias de XENP15428.

La Figura 54 representa las secuencias de XENP15429.

La Figura 55 representa las secuencias de XENP15430.

La Figura 56 representa las secuencias de XENP15431.

La Figura 57 representa las secuencias de XENP15432.

La Figura 58 representa las secuencias de XENP15433.

La Figura 59 representa las secuencias de XENP15434.

La Figura 60 representa las secuencias de XENP15435.

La Figura 61 representa las secuencias de XENP15436.

5 La Figura 62 representa las secuencias de XENP15437.

La Figura 63 representa las secuencias de XENP15438.

La Figura 64 muestra las afinidades de unión en un ensayo Biacore.

10 La Figura 65 muestra la pureza de Heterodímeros durante la generación de grupos estables usando relaciones variadas de cadena Ligera, Fab-Fc y scFv-Fc.

Figura 66 Reducción de IgG2 e IgM humana por biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 en un modelo de ratón huPBMc.

15 La Figura 67 representa scFv variantes de anti-CD3 humanizados, con estabilidad optimizada. Se proporcionan sustituciones con respecto a la secuencia de scFv H1_L1.4. La numeración de aminoácidos es la numeración de Kabat.

20 Figura 68. Secuencias de aminoácidos de scFv variantes de anti-CD3 humanizados, de estabilidad optimizada. Las CDR están subrayadas. Para cada combinación de cadena pesada/cadena ligera, se indican cuatro secuencias: (i) scFv con etiqueta 6xHis C-terminal, (ii) scFv solo, (iii) VH sola, (iv) VL sola.

25 Figura 69 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMc. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

30 Figura 70 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del

injerto de PBMC a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgM e IgG2 humana.

- 5 La Figura 71 representa las secuencias de XENP15049.
La Figura 72 representa las secuencias de XENP15051.
La Figura 73 representa las secuencias de XENP15050.
La Figura 74 representa las secuencias de XENP13676.
La Figura 75 representa las secuencias de XENP14696.
10 La Figura 76 representa las secuencias de XENP15629.
La Figura 77 representa las secuencias de XENP15053.
La Figura 78 representa las secuencias de XENP15630.
La Figura 79 representa las secuencias de XENP15631.
La Figura 80 representa las secuencias de XENP15632.
15 La Figura 81 representa las secuencias de XENP15633.
La Figura 82 representa las secuencias de XENP15634.
La Figura 83 representa las secuencias de XENP15635.
La Figura 84 representa las secuencias de XENP15636.
La Figura 85 representa las secuencias de XENP15638.
20 La Figura 86 representa las secuencias de XENP15639.
La Figura 87 representa las secuencias de XENP13677.
La Figura 88 representa las secuencias de XENP14388.
La Figura 89 representa las secuencias de XENP14389.
La Figura 90 representa las secuencias de XENP14390.
25 La Figura 91 representa las secuencias de XENP14391.
La Figura 92 representa las secuencias de XENP14392.
La Figura 93 representa las secuencias de XENP14393.
La Figura 94 representa las secuencias de XENP16366.
La Figura 95 representa las secuencias de XENP16367.
30 La Figura 96 representa las secuencias de XENP16368.
La Figura 97 representa las secuencias de XENP16369.

La Figura 98 representa las secuencias de XENP16370.

La Figura 99 representa las secuencias de XENP16371.

La Figura 100 representa las secuencias de XENP16372.

La Figura 101 representa las secuencias de XENP16373.

5 La Figura 102 representa las secuencias de XENP16374.

La Figura 103 representa las secuencias de XENP16375.

La Figura 104 representa las secuencias de XENP16376.

La Figura 105 representa las secuencias de XENP16377.

10 La Figura 106 representa las secuencias de los
antígenos CD20 y CD123.

Figura 107 determinación de resonancia de plasmón de
superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc humano (Sino Biological) a
15 la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se
sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

Figura 108 determinación de resonancia de plasmón de
superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
20 Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino
Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos
de ensayo se sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

Figura 109 determinación de resonancia de plasmón de
superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
25 son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc humano (Sino Biological) a
la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se
sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

Figura 110 Determinación de resonancia de plasmón de
30 superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.

Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

5 Figura 111 Determinación de resonancia de plasmón de superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos
10 de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

Figura 112 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células Ramos, 250.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-
15 CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

Figura 113 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 200.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son
20 Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 114 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

25 Figura 115 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 5 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1L1) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la
30 desaparición de células CD19⁺.

Figura 116 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La
5 detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 117 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

Figura 118 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La
10 detección se realizó por LDH.

Figura 119 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 1 y 8 días después del injerto de PBMC a 5 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgG2 e IgM humana.
15

Figura 120 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del injerto de PBMC a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgG2 e IgM humana.
20
25

La Figura 121 representa las secuencias de C2B8_H1.202_L1.113 High CD20.

La Figura 122 representa las secuencias de C2B8_H1L1 Low CD20.

La Figura 123 representa las secuencias de 7G3_H1.109_L1.57 CD123.
30

La Figura 124 muestra una matriz de posibles combinaciones para la invención. Una "A" significa que las CDR de las secuencias de CD3 mencionadas pueden combinarse con las CDR de la TTA en el lado derecho. Es decir, las
5 vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con las vhCDR de la secuencia de CD38 OKT10 H1.77 y las vlCDR de la secuencia de OKT10L1.24. Una "B" significa que las CDR de
10 las construcciones de CD3 pueden combinarse con los dominios ligero y pesado variables de la TTA. Es decir, las vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con la secuencia
15 de CD38 OKT10 H1.77 de dominio pesado variable y la secuencia de OKT10L1.24. Una "C" está invertida, de tal forma que el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de las secuencias de CD3 se usan con las CDR de las TTA. Una "D" es cuando están combinadas las dos cadenas
20 ligeras variables y pesadas variables de cada uno. Una "E" es cuando el scFv del CD3 se usa con la CDR de la TTA, y una "F" es cuando el scFv del CD3 se usa con los dominios pesado variable y ligero variable del dominio de unión a antígeno de TTA.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Para que la solicitud pueda entenderse más completamente, a continuación se proporcionan varias definiciones. Se entiende que dichas definiciones incluyen
30 sus equivalentes gramaticales.

Por "anulación" en el presente documento se entiende una reducción o eliminación de actividad. Así pues, por ejemplo, "anulación de la unión de FcγR" significa que la variante de aminoácidos de la región Fc tiene menos de un 50 % de la unión de partida en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, siendo preferida una pérdida de actividad menor del 70-80-90-95-98 %, y en general, estando la actividad por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore. Son de un uso particular en la anulación de la unión a FcγR los mostrados en la Figura 16.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. La ADCC está correlacionada con la unión a FcγRIIIa; una mayor unión a FcγRIIIa conduce a un aumento de la actividad ADCC.

Por "ADCP" o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos, como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen la fagocitosis de la célula diana.

Por "modificación", en el presente documento, se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia de polipéptido o una alteración en un resto unido químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser una estructura PEG o carbohidrato alterado unido a una proteína. Por

"modificación de aminoácido" en el presente documento se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia de polipéptido. Por motivos de claridad, a menos que se indique otra cosa, la modificación de aminoácidos siempre es en un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en el ADN y ARN.

Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución", en el presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con un aminoácido diferente. En particular, en algunas realizaciones, la sustitución es en un aminoácido que no es natural en la posición particular, o bien no es natural dentro del organismo o en ningún organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se ha reemplazado con tirosina. Por motivos de claridad, una proteína que se ha modificado por ingeniería genética para cambiar el ácido nucleico que codifica la secuencia pero sin cambiar el aminoácido de partida (por ejemplo, cambiando CGG (que codifica arginina) por CGA (que sigue codificando arginina) para aumentar los niveles de expresión en el organismo hospedador) no es una "sustitución de aminoácido"; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular que inicialmente no es una sustitución de aminoácido.

Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa en el presente documento, se entiende la adición de una

secuencia de aminoácidos en una posición particular en una
secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, -233E o
233E designa una inserción de ácido glutámico después de la
posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o
5 A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la
posición 233 y antes de la posición 234.

Por "delección de aminoácido" o "delección", como se usa
en el presente documento, se entiende la eliminación de una
secuencia de aminoácidos en una posición particular en una
10 secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, E233- o
E233# o E233() designa una delección de ácido glutámico en la
posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una
delección de la secuencia GluAspAla que empieza en la
posición 233.

15 Por "proteína variante" o "variante de proteína" o
"variante", como se usan en el presente documento, se
entiende una proteína que difiere de la proteína parental
en al menos una modificación de aminoácido. La variante de
proteína puede hacer referencia a la propia proteína, una
20 composición que comprende la proteína, o la secuencia amino
que la codifica. Preferentemente, la variante de proteína
tiene al menos una modificación de aminoácido en
comparación con la proteína parental, por ejemplo, de
aproximadamente una a aproximadamente setenta
25 modificaciones de aminoácidos, y preferentemente de
aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones
de aminoácidos en comparación con la secuencia parental.
Como se describe más adelante, en algunas realizaciones, el
polipéptido parental, por ejemplo un polipéptido parental
30 Fc, es una secuencia humana de tipo silvestre, tal como la
región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque ciertas

secuencias humanas con variantes también pueden servir como "polipéptidos parentales", por ejemplo, el híbrido IgG1/2 de la Figura 19. La secuencia variante de proteína en el presente documento preferentemente poseerá al menos

5 aproximadamente un 80 % de identidad con una secuencia de proteína parental, y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad, más preferentemente al menos un 95-98-99 % de identidad. Proteína variante puede hacer referencia a la propia proteína variante, a

10 composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. Por consiguiente, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental por al menos una

15 modificación de aminoácido, por "variante de IgG" o "IgG variante", como se usan en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG parental (de nuevo, en muchos casos, de una secuencia de IgG humana) al menos en una modificación de aminoácido, y por "variante de

20 inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usan en el presente documento, se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de una secuencia de inmunoglobulina parental por al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de Fc" o "Fc variante", como se

25 usan en el presente documento, se entiende una proteína que comprende una modificación de aminoácido en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. De esta manera, por ejemplo, N434S o 434S es una

30 variante de Fc con la sustitución de serina en posición 434 con respecto al polipéptido Fc parental, en donde la

numeración está de acuerdo con el índice EU. De forma similar, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S con respecto al polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT puede no estar
5 especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 428L/434S. Debe indicarse que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que M428L/N434S, y así sucesivamente.

10 Para todas las posiciones analizadas en la presente invención que se refieren a anticuerpos, a menos que se indique otra cosa, la numeración de posiciones de aminoácidos está de acuerdo con el índice EU. El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se
15 refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, incorporado en su totalidad en el presente documento por referencia). La modificación puede ser una adición, delección o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y,
20 en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen la Patente de Estados Unidos n.º 6.586.207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J. W. Chin, y P.
25 G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PIGAS United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, todos incorporados en su totalidad por referencia.

30 Como se usa en el presente documento, "proteína" en el presente documento significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteína, polipéptidos,

oligopéptidos y péptidos. El grupo peptidilo puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992), incorporado en su totalidad por referencia). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos (por ejemplo, no un aminoácido que está codificado por ADN); como apreciarán los expertos en la materia. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los fines de la invención, y pueden utilizarse aminoácidos tanto en configuración D como en configuración L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos sintéticos incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Shultz y colaboradores, incluyendo pero sin limitación métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635): 964-7, todos incorporados en su totalidad por referencia. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadena laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, enlazadores con otras moléculas, fusión con proteínas o dominios de proteína y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por "resto" como se usa en el presente documento se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la Asparagina 297

(también denominada Asn297 o N297) es un resto en la posición 297 en el anticuerpo humano IgG1.

Por "Fab" o "región Fab", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede hacer referencia a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fab. Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un solo anticuerpo. Como apreciarán los expertos en la materia, estos generalmente están constituidos por dos cadenas.

Por "modificación de subclase de IgG" o "modificación de isotipo", como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alienado diferente. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG.

Por "modificación no natural", como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácido que no es isotípica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende una serina en la posición 434, la sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (o híbridos de las mismas) se considera una modificación no natural.

Por "aminoácido" y "identidad de aminoácido", como se usa en el presente documento, se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales que se codifican por el ADN y ARN.

Por "función efectora" como se usa en el presente documento, se entiende un acontecimiento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor Fc o ligando. Las funciones efectoras incluye, pero sin limitación, ADCC, ADCP y CDC.

Por "ligando de Fc de IgG", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando Fc. Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitación, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, Clq, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de estafilococo, proteína G de estreptococo y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136, incorporado en su totalidad por referencia). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Son ligandos de Fc de IgG particulares FcRn y los receptores Fc gamma. Por "ligando de Fc", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de Fc/ligando de Fc.

Por "receptor Fc gamma", "FcγR" o "FcγgammaR", como se usan en el presente documento, se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifican por un gen FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, pero sin limitación, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa

(incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, incorporado en su totalidad por referencia), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen pero sin limitación FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR de ratón no descubiertos.

Por "FcRn" o "Receptor Fc neonatal", como se usa en el presente documento, se entiende una proteína que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifica al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada se codifica por el gen FcRn. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. En la Leyenda de la Figura 83 se muestra una diversidad de variantes de FcRn usadas para aumentar la unión al receptor FcRn y, en algunos casos, para aumentar la semivida en suero.

Por "polipéptido parental", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de partida que

posteriormente se modifica para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. El polipéptido parental puede
5 hacer referencia al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido parental o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "inmunoglobulina parental", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de inmunoglobulina no
10 modificado que se modifica para generar una variante y por "anticuerpo parental", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe indicarse que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos
15 comerciales, producidos de forma recombinante conocidos como se indica más adelante.

Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo
20 el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. De esta manera, Fc se refiere a al menos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e
25 IgM, y el extremo N terminal de bisagra flexible de estos dominios. En el caso de IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. En el caso de IgG, el dominio Fc comprende dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 (C γ 2 y C γ 3) y la región de bisagra inferior entre C γ 1 (C γ 1) y C γ 2 (C γ 2).
30 Aunque los límites de la región Fc pueden variar, normalmente se define que la región Fc de la cadena pesada

de IgG humana incluye los restos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe de forma más detallada más adelante, las modificaciones de aminoácidos se realizan en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o en el receptor FcRn.

Por "región constante pesada" en el presente documento se entiende la parte CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

Por "proteína de fusión Fc" o "inmunoadesina", en el presente documento, se entiende una proteína que comprende una región Fc, generalmente unida (opcionalmente a través de un resto enlazador, como se describe en el presente documento) a una proteína diferente, tal como un resto de unión a una proteína diana, como se describe en el presente documento. En algunos casos, un monómero del anticuerpo heterodimérico comprende una cadena pesada de anticuerpo (que incluye un scFv o que incluye además una cadena ligera) y el otro monómero es una fusión de Fc, que comprende un dominio de Fc variante y un ligando. En algunas realizaciones, estas "proteínas medio anticuerpo-medio fusión" se denominan "cuerpos de fusión".

Por "posición", como se usa en el presente documento, se entiende una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo el índice EU para la numeración de anticuerpos.

Por "antígeno diana", como se usa en el presente documento, se entiende la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno diana puede ser una proteína,

carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. A continuación se describen un amplio número de antígenos diana adecuados.

Por "capacidad de emparejamiento" en el contexto de los monómeros de los anticuerpos heterodiméricos de la invención en el presente documento se entiende que, de forma similar a las dos cadenas de ADN que "se emparejan", se incorporan variantes de heterodimerización en cada monómero para conservar la capacidad de "emparejarse" para formar heterodímeros. Por ejemplo, si algunas variantes de pI se modifican por ingeniería genética en el monómero A (por ejemplo, haciendo que el pI sea superior) entonces las variantes estéricas que son "pares de carga" que pueden utilizarse tampoco interfieren con las variantes de pI, por ejemplo, las variantes de carga que hacen que un pI sea superior se ponen en la misma "cadena" o "monómero" para conservar las dos funcionalidades. De forma similar, para variantes "sesgadas" que se convierten en pares de un conjunto como se indica con más detalle más adelante, el experto en la materia considerará el pI para decidir en que cadena o monómero incorpora un conjunto del par, de tal forma que la separación de pI se maximice usando el pI de los sesgos también.

Por "célula diana", como se usa en el presente documento, se entiende una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable", como se usa en el presente documento, se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes de V. kappa, V. lambda y/o VH que constituyen los loci genéticos de

inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada respectivamente.

Por "tipo silvestre o WT" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de
5 nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

Los anticuerpos de la presente invención generalmente
10 están aislados o son recombinantes. "Aislados", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresó. Normalmente, un
15 polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un "anticuerpo aislado", se refiere a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes. "Recombinante" significa que los anticuerpos se
20 han generado usando técnicas de ácido nucleico recombinante en células hospedadoras exógenas.

"Unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un antígeno o un epítipo particular significa una unión que es mediblemente diferente de una
25 interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica
30 puede determinarse por competición con una molécula de control que es similar a la diana.

La unión específica para un antígeno o un epítipo particular puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítipo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para una molécula de control con respecto al antígeno o epítipo.

Además, la unión específica para un antígeno o un epítipo particular puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítipo de al menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para el epítipo con respecto a un control, donde KA o Ka se refiere a una tasa de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular.

II. Visión general

Se han diseñado anticuerpos biespecíficos que se acoplan conjuntamente a CD3 y a un antígeno tumoral diana y se han usado para redirigir las células T para que ataquen y lisen células tumorales diana. Los ejemplos incluyen los formatos BiTE y DART, que se acoplan de forma monovalente a CD3 y a un antígeno tumoral. Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción

asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo biespecífico se acopla a todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Además, estos formatos no contienen dominios de Fc y muestran semividas en suero muy cortas en los pacientes.

Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo biespecífico se acopla a todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Una de estas posibles formas para reducir la producción de citocinas y posiblemente reducir la activación de células T CD4 es reducir la afinidad del dominio anti-CD3 por CD3.

Debe apreciarse que las secuencias de anti-CD3 "altos, medios, bajos" de la presente invención pueden usarse en una diversidad de formatos de heterodimerización. Aunque la mayor parte de la divulgación del presente documento usa el formato "abridor de botella" de los heterodímeros, estas secuencias pesada y ligera variables, así como las

secuencias de scFv (y secuencias de Fab que comprenden estas secuencias pesada y ligera variables) pueden usarse en otros formatos, tales como los representados en la Figura 2 de la Publicación WO n.º 2014/145806, cuyas
5 Figuras, formatos y leyendas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo los anticuerpos son
10 "biespecíficos", ya que se unen a dos antígenos diana diferentes, en general antígenos tumorales diana (TTA) como se describe más adelante. Estos anticuerpos heterodiméricos pueden unirse a estos antígenos diana de forma monovalente (por ejemplo, hay un solo dominio de unión a antígeno tal
15 como un par de dominios ligero variable y pesado variable) o de forma bivalente (hay dos dominios de unión a antígeno que se unen cada uno independientemente al antígeno). Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se basan en el uso de diferentes monómeros que contienen sustituciones de
20 aminoácidos que "favorecen" la formación de heterodímeros sobre los homodímeros, como se indica con más detalles más adelante, acoplados con "variantes de pI" que permiten una purificación sencilla de los heterodímeros de entre los homodímeros, como se indica de forma similar más adelante.
25 Para los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos de la invención, la presente invención generalmente se basa en el uso de dominios de Fc modificados por ingeniería genética o variantes que pueden autoensamblarse en células de producción para producir proteínas heterodiméricas, y
30 métodos para generar y purificar dichas proteínas heterodiméricas.

III. Anticuerpos

La presente invención se refiere a la generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo CD3 y un antígeno tumoral diana tal como CD123, y en general son anticuerpos terapéuticos. Como se analiza más adelante, el término "anticuerpo" se usa de forma general. Los anticuerpos que encuentran utilidad en la presente invención pueden tener varios formatos como se describe en el presente documento, incluyendo anticuerpos tradicionales así como derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpo, descritos en el presente documento.

Las unidades estructurales de anticuerpo tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. La presente invención se refiere a la clase de IgG, que tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. De esta manera, "isotipo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Debe entenderse que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases. Por ejemplo, como se muestra en la Publicación US 2009/0163699, incorporada por referencia, la presente invención cubre la modificación por ingeniería genética por pI de híbridos IgG1/G2.

La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno, generalmente denominado en la técnica y en el presente documento "dominio Fv" o "región Fv". En la región variable, tres bucles están juntos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (denominado en lo sucesivo "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa. "Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida de forma uniforme. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad," "CDR" y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable en general incluye los restos de aminoácido desde aproximadamente los restos de aminoácido 24-34 (LCDR1; "L" indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región

variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF
PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a Ed. Public Health
Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.
(1991) y/o los restos que forman un bucle hipervariable
5 (por ejemplo, restos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96
(LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32
(HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región
variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol.
Biol. 196: 901-917. Más adelante se describen CDR
10 específicas de la invención.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, el
sistema de numeración de Kabat generalmente se usa cuando
se hace referencia a un resto en el dominio variable
(aproximadamente, restos 1-107 de la región variable de
15 cadena ligera y restos 1-113 de la región variable de
cadena pesada) y el sistema de numeración EU para regiones
Fc (por ejemplo, Kabat et al., supra (1991)).

La presente invención proporciona un gran número de
conjuntos de CDR diferentes. En este caso, un "conjunto de
20 CDR completo" comprende las tres CDR ligeras variables y
tres CDR pesadas variables, por ejemplo, una vlCDR1,
vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden
formar parte de un dominio ligero variable o pesado
variable de mayor tamaño, respectivamente. Además, como se
25 indica con más detalle en el presente documento, los
dominios pesado variable y ligero variable pueden estar en
cadenas polipeptídicas separadas, cuando se usa una cadena
pesada y ligera (por ejemplo, cuando se usan Fab) o en una
sola cadena polipeptídica en el caso de las secuencias de
30 scFv.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno, o más específicamente sitio de unión a epítopo de los anticuerpos. "Epítopo" se refiere a un determinante que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como parátopo. Los epítopos son agrupamientos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender restos de aminoácido directamente implicados en la unión (también denominados componentes inmunodominantes del epítopo) y otros restos de aminoácido, que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácido que están bloqueados efectivamente por el péptido de unión a antígeno específicamente; en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente.

Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por restos de aminoácido adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítopos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única

conformación espacial. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden verificarse en un inmunoensayo sencillo que muestre la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, "binning".

La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Basándose en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a edición, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporado en su totalidad por referencia).

En la subclase de inmunoglobulinas IgG, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria característica. Son de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada incluyendo, los dominios pesado constante (CH) y los dominios de bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, dominios "CH" en el contexto de las IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Como se muestra en el presente documento y se describe más adelante, las

variantes de pI pueden estar en una o más de las regiones CH, así como en la región de bisagra, analizada más adelante.

5 Debe indicarse que las secuencias representadas en el presente documento empiezan en la región CH1, posición 118; las regiones variables no están incluidas excepto cuando se indica. Por ejemplo, el primer aminoácido de SEQ ID NO: 2, aunque se denomina posición "1" en el listado de secuencias, corresponde a la posición 118 de la región CH1,
10 de acuerdo con la numeración EU.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región de bisagra. Por "bisagra" o "región de bisagra" o "región de bisagra de anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en el presente documento se entiende el
15 polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el resto en la posición 237 EU. De esta manera, para la IgG,
20 la bisagra de anticuerpo en el presente documento se define de manera que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, está incluida
25 la bisagra inferior, haciendo referencia en general "bisagra inferior" a las posiciones 226 o 230. Como se indica en el presente documento, también pueden realizarse variantes de pI en la región de bisagra.

La cadena ligera en general comprende dos dominios, el
30 dominio ligero variable (que contiene las CDR de cadena ligera y junto con los dominios pesados variables que

forman la región Fv), y una región de cadena ligera constante (con frecuencia denominada CL o Ck).

Otra región de interés para sustituciones adicionales, indicadas más adelante, es la región Fc.

5 De esta manera, la presente invención proporciona diferentes dominios de anticuerpo. Como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica, los anticuerpos heterodiméricos de la invención comprenden diferentes dominios dentro de las cadenas pesada y ligera,
10 que pueden ser también solapantes. Estos dominios incluyen, pero sin limitación, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio de bisagra, el dominio constante pesado (CH1-bisagra-dominio Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3), el dominio pesado variable, el dominio
15 ligero variable, el dominio constante ligero, dominios FAb y dominios scFv.

De esta manera, el "dominio Fc" incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio de bisagra. La cadena pesada comprende un dominio pesado variable y un
20 dominio constante, que incluye un CH1-bisagra opcional-dominio Fc que comprende un CH2-CH3. La cadena ligera comprende una cadena ligera variable y el dominio constante ligero.

Algunas realizaciones de la invención comprenden al
25 menos un dominio scFv, que, aunque no se produce de forma natural, generalmente incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, unidos entre sí por un enlazador de scFv. Como se muestra en el presente documento, hay varios enlazadores de scFv adecuados que
30 pueden usarse, incluyendo enlaces peptídicos tradicionales generados por técnicas recombinantes.

El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes restos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal forma que asuman la conformación correcta una con respecto a la otra de forma que retenga la actividad deseada. En una realización, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una realización, pueden usarse enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, encontrando utilidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos en algunas realizaciones. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS) n , (GSGGS) n , (GGGGS) n y (GGGS) n , donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles. Como alternativa, pueden encontrar utilidad como enlazadores, es decir pueden encontrar uso como enlazadores una diversidad de polímeros no proteicos, incluyendo pero sin limitación polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud de dominio CL/CH1 pero no todos los restos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 restos de aminoácido de los dominios CL/CH1. Los enlazadores pueden proceder de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo C κ o C λ . Los enlazadores pueden proceder de cadenas pesadas de inmunoglobulina de cualquier isotipo, incluyendo por ejemplo C γ 1, C γ 2, C γ 3,

C γ 4, C α 1, C α 2, C δ , C ϵ y C μ . Las secuencias enlazadoras también pueden proceder de otras proteínas tales como proteínas de tipo Ig (por ejemplo TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de regiones bisagra y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En algunas realizaciones, el enlazador es un "enlazador de dominios", usado para unir dos dominios cualesquiera como se indica en el presente documento. Aunque puede usarse cualquier enlazador adecuado, muchas realizaciones utilizan un polímero de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS) $_n$, (GSGGS) $_n$, (GGGGS) $_n$ y (GGGS) $_n$, donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4 a 5) así como cualquier secuencia peptídica que permita la unión recombinante de los dos dominios con una longitud y flexibilidad suficiente para permitir que cada dominio retenga su función biológica. En algunos casos, y prestando atención a la "capacidad de emparejamiento", como se indica más adelante, pueden usarse enlazadores de dominio cargado, como se usa en algunas realizaciones de enlazadores de scFv.

En algunas realizaciones, el enlazador de scFv es un enlazador de scFv cargado, de los que se muestran varios en la Figura 33. Por consiguiente, la presente invención proporciona además enlazadores de scFv cargados, para facilitar la separación en pI entre un primer y un segundo monómero. Es decir, mediante la incorporación de un enlazador de scFv cargado, positivo o negativo (o ambos, en el caso de soportes que usan scFv en diferentes monómeros), esto permite que el monómero que comprende el enlazador cargado altere el pI sin realizar cambios adicionales en los dominios Fc. Estos enlazadores cargados pueden

sustituirse en cualquier scFv que contenga enlazadores estándar. De nuevo, como apreciarán los expertos en la materia, los enlazadores de scFv cargados usados en la "cadena" o monómero correcto, de acuerdo con los cambios
5 deseados en pI. Por ejemplo, como se analiza en el presente documento, para realizar un anticuerpo heterodimérico en formato F triple, se calcula el pI original de la región Fv de cada uno de los dominios de unión a antígeno deseado, y se elige uno para fabricar un scFv, y dependiendo del pI,
10 se eligen enlazadores positivos o negativos.

También pueden usarse enlazadores de dominio cargado para aumentar la separación de pI de los monómeros de la invención, y por lo tanto estos se incluyen en la Figura 33 y pueden usarse en cualquier realización del presente
15 documento en la que se utilice un enlazador.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" en el presente documento se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo,
20 incluyendo regiones variable y constante, incluyendo una o más modificaciones como se indican en el presente documento, particularmente en los dominios Fc para permitir la formación de heterodimerización o la purificación de heterodímeros de entre los homodímeros. Los anticuerpos de
25 longitud completa generalmente incluyen dominios Fab y Fc y pueden contener además dominios de unión a antígeno extra tales como scFv, como se representa en general en las Figuras.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de
30 anticuerpo, siempre que contenga al menos un dominio constante que puede modificarse por ingeniería genética

para producir heterodímeros, tales como ingeniería genética de pI. Otros fragmentos de anticuerpo que pueden usarse incluyen fragmentos que contienen uno o más de los dominios CH1, CH2, CH3 bisagra y CL de la invención que se han modificado por ingeniería genética de pI. Por ejemplo, las fusiones Fc son fusiones de la región Fc (CH2 y CH3, opcionalmente con la región de bisagra) fusionadas a otra proteína. En la técnica se conocen varias fusiones de Fc y pueden mejorarse por la adición de las variantes de heterodimerización de la invención. En el presente caso, pueden realizarse fusiones de anticuerpos que comprenden CH1; CH1, CH2 y CH3; CH2; CH3; CH2 y CH3; CH1 y CH3, de las que cualquiera o todas pueden realizarse opcionalmente con la región de bisagra, utilizando cualquier combinación de variantes de heterodimerización descritas en el presente documento.

En particular, los formatos representados en la Figura 1 son anticuerpos, denominados normalmente "anticuerpos heterodiméricos", lo que significa que la proteína tiene al menos dos secuencias de Fc asociadas autoensambladas en un dominio Fc heterodimérico.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ejemplo un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden una o más regiones variables de un ratón (o rata en algunos casos) y la región o regiones constantes de un humano. "Anticuerpos humanizados" en

general se refieren a anticuerpos no humanos que han cambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo entero, excepto las CDR, se codifica por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, de las que algunas o todas se codifican por ácidos nucleicos que se han originado en un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad se determina por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, todos incorporados en su totalidad por referencia. Con frecuencia se requiere una "retromutación" de restos marco aceptores seleccionados en los restos donadores correspondientes para volver a conseguir la afinidad que se pierde en las construcciones injertadas iniciales (documentos US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, todos incorporados en su totalidad por referencia). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando ratones con un sistema inmunitario modificado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654, incorporado en su totalidad por referencia. En la técnica se conocen bien una diversidad de técnicas y métodos para humanizar y reformar

anticuerpos no humanos (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y referencias citadas en el presente documento, todas incorporadas en su totalidad por referencia). Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitación, métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332: 323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86: 10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, todos incorporados en su totalidad por referencia. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de modificación de superficie, como se describe por ejemplo en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973, incorporado en su totalidad por referencia. En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración de afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004,590. Pueden emplearse métodos basados en selección para humanizar y/o madurar la afinidad de regiones variables de anticuerpos, incluyendo pero sin limitación los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294: 151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618;

Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10): 753-759, todos incorporados en su totalidad por referencia. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de únicamente partes de las CDR, incluyendo pero sin limitación los métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, todos incorporados en su totalidad por referencia.

10 **IV. Anticuerpos heterodiméricos**

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se basan en el uso de dos secuencias Fc variantes de cadena pesada diferentes, que se autoensamblarán para formar dominios Fc heterodiméricos y anticuerpos heterodiméricos.

La presente invención se refiere a nuevas construcciones para proporcionar anticuerpos heterodiméricos que permiten la unión a más de un antígeno o ligando, por ejemplo, para permitir la unión biespecífica. Las construcciones de anticuerpo heterodimérico se basan en la naturaleza de autoensamblamiento de los dos dominios Fc de las cadenas pesadas de los anticuerpos, por ejemplo dos "monómeros" que se ensamblan formando un "dímero". Los anticuerpos heterodiméricos se obtienen alterando la secuencia de aminoácidos de cada monómero como se analiza con más detalle más adelante. De esta manera, la presente invención generalmente se dirige a la creación de anticuerpos heterodiméricos que pueden acoplarse conjuntamente a antígenos de varias formas, basándose en las variantes de

aminoácidos en las regiones constantes que son diferentes en cada cadena para promover la formación heterodimérica y/o facilitar la purificación de los heterodímeros de entre los homodímeros.

5 De esta manera, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos. Un problema en curso en las tecnologías de anticuerpos es el deseo de anticuerpos "biespecíficos" que se unan a dos antígenos diferentes de forma simultánea, permitiendo de esta forma en general que
10 los diferentes antígenos estén próximos y den como resultado nuevas funcionalidades y nuevas terapias. En general, estos anticuerpos se obtienen incluyendo genes de cada cadena pesada y ligera en las células hospedadoras. Esto generalmente da como resultado la formación del
15 heterodímero deseado (A-B), así como los dos homodímeros (A-A y B-B (sin incluir los elementos heterodiméricos de cadena ligera)). Sin embargo, un obstáculo importante en la formación de anticuerpos biespecíficos es la dificultad de purificar los anticuerpos heterodiméricos de entre los
20 anticuerpos homodiméricos y/o desviar la formación del heterodímero con respecto a la formación de los homodímeros.

Hay varios mecanismos que pueden usarse para generar los heterodímeros de la presente invención. Además, como
25 apreciarán los expertos en la materia, estos mecanismos pueden combinarse para asegurar una alta heterodimerización. De esta manera, las variantes de aminoácidos que conducen a la producción de heterodímeros se denominan "variantes de heterodimerización". Como se
30 analiza más adelante, las variantes de heterodimerización pueden incluir variantes estéricas (por ejemplo, las

variantes de "llave y cerradura" o "sesgadas" descritas más adelante y las variantes de "pares de carga" descritas más adelante) así como "variantes de pI", lo cual permite la purificación de homodímeros de entre los heterodímeros.

5 Como se describe en general en el documento WO2014/145806, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad y como se indica específicamente más adelante para la discusión de "variantes de heterodimerización", los mecanismos útiles para la heterodimerización incluyen

10 variantes de "llave y cerradura" ("KIH"; algunas veces en el presente documento como variantes "sesgadas" (véase la discusión en el documento WO2014/145806), "dirección electroestática" o "pares de carga" como se describe en el documento WO2014/145806, variantes de pI como se describe

15 en el documento WO2014/145806, y variantes de Fc adicionales generales como se indica en el documento WO2014/145806 y más adelante.

En la presente invención, hay varios mecanismos básicos que pueden facilitar la purificación de anticuerpos

20 heterodiméricos; uno se basa en el uso de variantes de pI, de tal forma que cada monómero tiene un pI diferente, permitiendo de esta manera la purificación isoeléctrica de proteínas diméricas A-A, A-B y B-B. Como alternativa, algunos formatos de armazón, tales como el formato "triple

25 F", también permiten la separación basándose en el tamaño. Como se indica adicionalmente más adelante, también es posible "desviar" la formación de heterodímeros con respecto a los homodímeros. De esta manera, una combinación de variantes de heterodimerización estéricas y variantes de

30 pI o de par de carga encuentran utilidad particular en la invención.

En general, las realizaciones de uso particular en la presente invención se basan en conjuntos de variantes que incluyen variantes de sesgo, que promueven la formación de heterodimerización con respecto a la formación de homodimerización, junto con variantes de pI, que aumentan la diferencia de pI entre los dos monómeros.

Además, como se indica con más detalle más adelante, dependiendo del formato del anticuerpo de heterodímero, las variantes de pI pueden estar contenidas dentro de los dominios constante y/o Fc de un monómero, o pueden usarse enlazadores cargados, enlazadores de dominio o enlazadores de scFv. Es decir, los armazones que utilizan scFv tales como el formato Triple F pueden incluir enlazadores de scFv cargados (positivos o negativos), que proporcionan un refuerzo de pI adicional con fines de purificación. Como apreciarán los expertos en la materia, algunos formatos Triple F son útiles con enlazadores de scFv cargados y sin ajustes de pI adicionales, aunque la invención proporciona variantes de pI que están en uno o los dos monómeros, y/o también enlazadores de dominio cargado. Además, una modificación por ingeniería genética de aminoácidos adicional para funcionalidades alternativas también puede conferir cambios de pI, tales como variantes de Fc, FcRn y KO.

La presente invención que utiliza pI como mecanismo de separación para permitir la purificación de proteínas heterodiméricas, pueden introducirse variantes de aminoácidos en uno o los dos polipéptidos del monómero; es decir, el pI de uno de los monómeros (denominado en el presente documento por simplificar "monómero A") puede modificarse por ingeniería genética de manera que sea

distinto del del monómero B, o pueden cambiarse tanto el monómero A como el monómero B, aumentándose el pI del monómero A y reduciéndose el pI del monómero B. Como se indica con más detalle más adelante, los cambios de pI de uno o los dos monómeros pueden realizarse retirando o añadiendo un resto cargado (por ejemplo, un aminoácido neutro se reemplaza por un resto de aminoácido cargado positiva o negativamente, por ejemplo glicina por ácido glutámico), cambiando un resto cargado de positivo o negativo a la carga opuesta (ácido aspártico por lisina) o cambiando un resto cargado por un resto neutro (por ejemplo pérdida de carga, lisina por serina). En las Figuras se muestran varias de estas variantes.

Por consiguiente, esta realización de la presente invención permite crear un cambio suficiente en el pI en al menos uno de los monómeros de tal forma que los heterodímeros puedan separarse de los homodímeros. Como apreciarán los expertos en la materia y como se analiza más adelante adicionalmente, esto puede hacerse usando una región constante de cadena pesada "de tipo silvestre" y una región variante que se haya modificado por ingeniería genética para aumentar o disminuir su pI (wt A-+B o wt A- - B), o aumentando una región y reduciendo la otra región (A+ -B- o A- B+).

De esta manera, en general, un componente de algunas realizaciones de la presente invención son variantes de aminoácido en las regiones constantes de anticuerpos que se dirigen para alterar el punto isoeléctrico (pI) de al menos uno, si no los dos, monómeros de una proteína dimérica para formar "anticuerpos de pI") incorporando sustituciones de aminoácidos ("variantes de pI" o "sustituciones de pI") en

uno o los dos monómeros. Como se muestra en el presente documento, la separación de los heterodímeros de los dos homodímeros puede realizarse si los pI de los dos monómeros difieren en una cantidad tan pequeña como 0.1 unidades de pH, encontrando utilidad en la presente invención diferencias de 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 o mayores.

Como apreciarán los expertos en la materia, el número de variantes de pI a incluir en cada uno o los dos monómeros para conseguir una buena separación dependerá en parte del pI de partida de los componentes, por ejemplo en el formato triple F, el pI de partida del scFv y Fab de interés. Es decir, para determinar que monómero modificar por ingeniería genética o en que "dirección" (por ejemplo, más positivo o más negativo), las secuencias de Fv de los dos antígenos diana se calculan y se toma una decisión a partir de esto. Como se conoce en la técnica, los diferentes Fv tendrán diferentes pI de partida que se explotan en la presente invención. En general, como se indica en el presente documento, los pI se modifican por ingeniería genética para dar como resultado una diferencia de pI total de cada monómero de al menos aproximadamente 0.1 log, siendo preferido de 0.2 a 0.5 como se indica en el presente documento.

Además, como apreciarán los expertos en la materia y como se indica en el presente documento, en algunas realizaciones, los heterodímeros pueden separarse de los homodímeros basándose en el tamaño. Como se muestra en las Figuras 1, por ejemplo, varios de los formatos permiten la separación de heterodímeros y homodímeros basándose en el tamaño.

En el caso en el que se usan variantes de pI para conseguir la heterodimerización, mediante el uso de la región o regiones constantes de la cadena o cadenas pesadas, se proporciona un enfoque más modular par diseñar y purificar proteínas biespecíficas, incluyendo anticuerpos. De esta manera, en algunas realizaciones, no se incluyen variantes de heterodimerización (incluyendo variantes de heterodimerización de sesgo y purificación) en las regiones variables, de tal forma que cada anticuerpo individual debe modificarse por ingeniería genética. Además, en algunas realizaciones, la posibilidad de inmunogenicidad resultante de las variantes de pI se reduce significativamente al importar variantes de pI de diferentes isotipos de IgG de tal forma que el pI se cambia sin introducir una inmunogenicidad significativa. De esta manera, un problema adicional a solucionar es el esclarecimiento de dominios constantes de bajo pI con un alto contenido de secuencia humana, por ejemplo, la minimización o evitación de restos no humanos en cualquier posición particular.

Un efecto beneficioso secundario que puede producirse con esta ingeniería genética de pI es también la extensión de la semivida en suero y el aumento de la unión a FcRn. Es decir, como se describe en USSN 13/194,904 (incorporado por referencia en su totalidad), la reducción del pI de dominios constantes de anticuerpo (incluyendo los encontrados en anticuerpos y fusiones de Fc) pueden conducir a una mayor retención en suero *in vivo*. Estas variantes de pI para aumentar la semivida en suero también facilitan cambios de pI para la purificación.

Además, debe indicarse que las variantes de pI de las variantes de heterodimerización proporcionan un efecto beneficioso adicional para la analítica y el proceso de control de calidad de los anticuerpos biespecíficos, ya que la capacidad de eliminar, minimizar y distinguir cuando están presentes homodímeros es significativa. De forma similar, la capacidad de ensayar de forma fiable la reproducibilidad de la producción de anticuerpos heterodiméricos es importante.

10 Variantes de heterodimerización

La presente invención proporciona proteínas heterodiméricas, incluyendo anticuerpos heterodiméricos en una diversidad de formatos, que utilizan variantes heterodiméricas para permitir la formación heterodimérica y/o la purificación de entre los homodímeros.

Hay varios pares adecuados de conjuntos de variantes de sesgo de heterodimerización. Estas variantes vienen en "pares" de "conjuntos". Es decir, un conjunto del par se incorporar en el primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora en el segundo monómero. Debe tenerse en cuenta que estos conjuntos no se comportan necesariamente como variantes de "llave en cerradura", con una correspondencia de uno a uno entre un resto en un monómero y un resto en el otro; es decir, estos pares de conjuntos forman una interfaz entre los dos monómeros que promueve la formación de heterodímeros y reduce la formación de homodímeros, permitiendo que el porcentaje de heterodímeros que se forman espontáneamente en condiciones biológicas sea mayor del 90 %, en lugar del 50 % esperado (25 % homodímero A/A:50 % heterodímero A/B:25 % homodímero B/B).

30 Variantes estéricas

En algunas realizaciones, la formación de heterodímeros puede facilitarse por la adición de variantes estéricas. Es decir, cambiando aminoácidos en cada cadena pesada, es más probable que cadenas pesadas diferentes se asocien para formar la estructura heterodimérica que para formar homodímeros con las mismas secuencias de aminoácidos de Fc. En la Figura 29 se incluyen variantes estéricas adecuadas.

Un mecanismo se denomina en general en la técnica "llaves y cerraduras", que se refiere a que también puede usarse opcionalmente la modificación por ingeniería genética de aminoácidos que crea influencias estéricas para favorecer la formación heterodimérica y desfavorecer la formación homodimérica; esto se denomina algunas veces "llaves y cerraduras", como se describe en USSN 61/596,846, Ridgway et al., Protein Engineering 9(7): 617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270: 26; Patente de Estados Unidos n.º 8,216,805, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Las Figuras identifican varios pares de "monómero A - monómero B" que se basan en "llaves y cerraduras". Además, como se describe en Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677 (1998), estas mutaciones de "llave y cerradura" pueden combinarse con enlaces disulfuro para desviar la formación hacia la heterodimerización.

Un mecanismo adicional que encuentra utilidad en la generación de heterodímeros algunas veces se denomina "dirección electroestática" como se describe en Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25): 19637 (2010), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. Esto algunas veces se denomina en el presente documento

"pares de carga". En esta realización, se usan cargas electroestáticas para desviar la formación hacia la heterodimerización. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede tener también un efecto sobre el pI, y por lo tanto sobre la purificación, y de esta manera en algunos casos también podrían considerarse variantes de pI. Sin embargo, como estas se generaron para forzar la heterodimerización y no se usaron como herramientas de purificación, se clasifican como "variantes estéricas". Estas incluyen pero sin limitación, D221E/P228E/L368E emparejado con D221R/P228R/K409R (por ejemplo, estos son "conjuntos correspondientes a monómeros") y C220E/P228E/368E emparejado con C220R/E224R/P228R/K409R.

Otras variantes de monómero A y monómero B adicionales que pueden combinarse con otras variantes, opcional e independientemente en cualquier cantidad, tales como variantes de pI indicadas en el presente documento u otras variantes estéricas que se muestran en la Figura 37 del documento US 2012/0149876, cuyas figuras y leyendas y SEQ ID NO se incorporan expresamente por referencia en el presente documento.

En algunas realizaciones, las variantes estéricas indicadas en el presente documento pueden incorporarse de forma opcional e independiente con cualquier variante de pI (u otras variantes tales como variantes de Fc, variantes de FcRn etc.) en uno o los dos monómeros, y pueden incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de las proteínas de la invención.

En la Figura 29 se encuentra una lista de variantes de sesgo adecuadas, mostrando la Figura 34 algunos pares de utilidad particular en muchas realizaciones. Son de uso

particular en muchas realizaciones los pares de conjuntos que incluyen, pero sin limitación, S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q. En términos de nomenclatura, el par "S364K/E357Q: L368D/K370S" significa que uno de los monómeros tiene el conjunto doble variante S364K/E357Q y el otro tiene el conjunto doble variante L368D/K370S.

10 Variantes de pI (punto isoeléctrico) para heterodímeros

En general, como apreciarán los expertos en la materia, hay dos categorías generales de variantes de PI: las que aumentan el pI de la proteína (cambios básicos) y las que reducen en pI de la proteína (cambios ácidos). Como se describe en el presente documento, pueden realizarse todas las combinaciones de estas variantes: un monómero puede ser de tipo silvestre, o una variante que no presenta un pI significativamente diferente del tipo silvestre, y el otro puede ser más básico o más ácido. Como alternativa, cada monómero se cambia, uno a más básico y otro a más ácido.

En la Figura 30 se muestran combinaciones preferidas de variantes de pI. Como se indica en el presente documento y se muestra en las figuras, estos cambios se muestran con respecto a IgG1, pero todos los isotipos pueden alterarse de esta manera, así como híbridos de isotipo. En el caso en el que el dominio constante procede de IgG2-4, también puede usarse R133E y R133Q.

30 Heterodímeros de anticuerpo variantes de cadena ligera

En el caso de heterodímeros basados en anticuerpos, por ejemplo, en los que al menos uno de los monómeros

comprende una cadena ligera además del dominio de cadena pesada, también pueden realizarse variante de pI en la cadena ligera. Las sustituciones de aminoácidos para reducir el pI de la cadena ligera incluyen, pero sin limitación K126E, K126Q, K145E, K145Q, N152D, S156E, K169E, S202E, K207E y la adición del péptido DEDE en el extremo c de la cadena ligera. Los cambios en esta categoría basados en la cadena ligera lambda constante incluyen una o más sustituciones en R108Q, Q124E, K126Q, N138D, K145T y Q199E. Además, también puede aumentarse el pI de las cadenas ligeras.

Variantes isotópicas

Además, muchas realizaciones de la invención se basan en la "importación" de aminoácidos de pI en posiciones particulares de un isotipo de IgG en otro, reduciéndose o eliminándose de esta manera la posibilidad de introducir inmunogenicidad indeseada en las variantes. Se muestran varias de estas en la Figura 21 de la Publicación de Estados Unidos 2014/0370013, incorporada en el presente documento por referencia. Es decir, la IgG1 es un isotipo común para anticuerpos terapéuticos por una diversidad de razones, incluyendo una alta función efectora. Sin embargo, la región constante pesada de IgG1 tiene un mayor pI que la de IgG2 (8.10 frente a 7.31). Mediante la introducción de restos de IgG2 en posiciones particulares en el esqueleto de IgG1, se reduce (o se aumenta) el pI del monómero resultante y presenta adicionalmente una mayor semivida en suero. Por ejemplo, IgG1 tiene una glicina (pI 5.97) en la posición 137, e IgG2 tiene un ácido glutámico (pI 3.22); la importación del ácido glutámico afectará al pI de la proteína resultante. Como se describe más adelante,

generalmente se requieren varias sustituciones de aminoácidos para afectar de forma significativa al pI del anticuerpo variante. Sin embargo, debe indicarse como se analiza más adelante que incluso cambios en las moléculas de IgG2 permiten una mayor semivida en suero.

En otras realizaciones, se realizan cambios de aminoácidos no isotípicos, para reducir el estado de carga total de la proteína resultante (por ejemplo, cambiando un aminoácido de mayor pI por un aminoácido de menor pI) o para permitir acomodaciones en la estructura para conseguir estabilidad, etc., como se describe adicionalmente más adelante.

Además, mediante la modificación del pI por ingeniería genética de los dominios constantes tanto ligero como pesado, pueden verse cambios significativos en cada monómero del heterodímero. Como se analiza en el presente documento, si los pI de los dos monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico.

Cálculo del pI

El pI de cada monómero puede depender del pI del dominio constante de cadena pesada variante y el pI del monómero total, incluyendo el dominio constante de cadena pesada variante y el compañero de fusión. De esta manera, en algunas realizaciones, el cambio de pI se calcula basándose en el dominio constante de cadena pesada variante, usando el esquema de la Figura 19 de la Publicación de Estados Unidos 2014/0370013. Como se analiza en el presente documento, cada monómero a modificar por ingeniería genética generalmente se decide por el pI

intrínseco de las regiones Fv y armazón. Como alternativa, el pI de cada monómero puede compararse.

Variantes de pI que también confieren mejor unión a FcRn *in vivo*

5 En el caso en el que la variante de pI reduce el pI del monómero, pueden tener el efecto beneficioso añadido de mejorar la retención en suero *in vivo*.

Aunque aún se está examinando, se cree que las regiones Fc tienen mayores semividas *in vivo*, por que la
10 unión a FcRn a pH 6 en un endosoma se encuentra la región Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, incorporado en su totalidad por referencia). El compartimento endosómico después recicla el Fc a la superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al
15 espacio extracelular, el mayor pH, ~7.4, induce la liberación de Fc de nuevo a la sangre. En ratones, Dall'Acqua et al. mostraron que mutantes de Fc con mayor unión a FcRn a pH 6 y pH 7.4 realmente tenían concentraciones en suero reducidas y la misma semivida que el Fc de tipo
20 silvestre (Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180, incorporado en su totalidad por referencia). La mayor afinidad de Fc por FcRn a pH 7.4 se cree que impide la liberación del Fc de nuevo a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones de Fc que aumentarán la semivida de Fc *in vivo*
25 idealmente aumentarán la unión de FcRn a menor pH mientras que se permite la liberación de Fc a mayor pH. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el intervalo de pH de 6.0 a 7.4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar restos de His en posiciones
30 importantes en el complejo Fc/FcRn.

Recientemente se ha sugerido que anticuerpos con regiones variables que tienen puntos isoeléctricos menores también pueden tener mayores semivida en suero (Igawa et al., 2010 PEDS. 23(5): 385-392, incorporado en su totalidad por referencia). Sin embargo, el mecanismo de esto aún no se entiende bien. Además, las regiones variables difieren de un anticuerpo a otro. Las variantes de región constante con pI reducido y una semivida prolongada proporcionarían un enfoque más modular para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos, como se describe en el presente documento.

Otras variantes de Fc para una funcionalidad adicional

Además de las variantes de aminoácidos de pI, hay varias modificaciones de aminoácidos de Fc útiles que pueden realizarse por una diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitación, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR, alterar la unión a receptores FcRn, etc.

Por consiguiente, las proteínas de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos, incluyendo las variantes de heterodimerización indicadas en el presente documento, que incluye las variantes de pI y variantes estéricas. Cada conjunto de variantes puede incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de cualquier proteína heterodimérica particular.

Variantes de FcγR

Por consiguiente, hay varias sustituciones de Fc útiles que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Pueden ser útiles sustituciones que den como resultado una mayor unión así como una menor unión. Por ejemplo, se sabe que la mayor unión a Fc RIIIa

generalmente da como resultado una mayor ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana). De forma similar, la unión reducida a FcγRIIb (un receptor inhibidor) puede ser beneficiosa también en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que encuentran utilidad en la presente invención incluyen las indicadas en USSN 11/124,620 (particularmente en la Figura 41), 11/174,287, 11/396,495, 11/538,406, todos los cuales se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad y específicamente para las variantes desveladas en el presente documento. Las variantes particulares que encuentran utilidad incluyen, pero sin limitación, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T.

Además, hay sustituciones de Fc adicionales que encuentran utilidad para aumentar la unión al receptor FcRn y aumentar la semivida en suero, como se desvela específicamente en USSN 12/341,769, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad, incluyendo, pero sin limitación 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I o V/434S, 436V/428L y 259I/308F/428L.

Variantes de ablación

De forma similar, otra categoría de variantes funcionales son las "variantes de ablación de FcγR" o

"variantes knock out de Fc(FcKO o KO)". En estas realizaciones, para algunas aplicaciones terapéuticas, es deseable reducir o eliminar la unión normal del dominio Fc a uno o más o a todos los receptores de Fcγ (por ejemplo FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de acción adicionales. Es decir, por ejemplo, en muchas realizaciones, particularmente en el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 de forma monovalente, generalmente es deseable anular la unión a FcγRIIIa para eliminar o reducir significativamente la actividad ADCC, en donde uno de los dominios Fc comprende una o más variantes de ablación del receptor de Fcγ. Estas variantes de ablación se representan en la Figura 31 y cada una puede incluirse o excluirse independiente y opcionalmente, utilizando los aspectos preferidos variantes de ablación seleccionadas del grupo que consiste en G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del. Debe tenerse en cuenta que las variantes de ablación mencionadas en el presente documento anular la unión a FcγR, pero generalmente no anulan la unión a FcRn.

25 Combinación de variantes heterodiméricas y de Fc

Como apreciarán los expertos en la materia, todas las variantes de heterodimerización mencionadas (incluyendo variantes de sesgo y/o pI) pueden combinarse opcional e independientemente de cualquier manera, siempre que 30 conserven su "capacidad de emparejamiento" o "partición de

monómeros". Además, todas estas variantes pueden combinarse en cualquiera de los formatos de heterodimerización.

En el caso de variantes de pI, aunque en las Figuras se muestran realizaciones que encuentran utilidad particular, pueden generarse otras combinaciones, siguiendo la norma básica de alterar la diferencia de pI entre dos monómeros para facilitar la purificación.

Además, cualquiera de las variantes de heterodimerización, sesgo y pI también se combinan de forma independiente y opcional con variantes de anulación de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como se indica en general en el presente documento.

Formatos útiles de la invención

Como apreciarán los expertos en la materia y analizarán con más detalle más adelante, las proteínas de fusión heterodiméricas de la presente invención pueden tener una amplia diversidad de configuraciones, como se representa en general en las Figuras 1. Algunas figuras representan configuraciones "de un solo extremo", en las que hay un tipo de especificidad en un "brazo" de la molécula y una especificidad diferente en el otro "brazo". Otras figuras representan configuraciones de "doble extremo", en las que hay al menos un tipo de especificidad en la "parte superior" de la molécula y una o más especificidades diferentes en la "parte inferior" de la molécula. De esta manera, la presente invención se dirige a nuevas composiciones de inmunoglobulina que se acoplan conjuntamente a un primer y un segundo antígeno diferente.

Como apreciarán los expertos en la materia, los formatos heterodiméricos de la invención pueden tener diferentes valencias así como pueden ser biespecíficos. Es

decir, los anticuerpos heterodiméricos de la invención pueden ser bivalentes y específicos, en donde un antígeno tumoral diana (por ejemplo CD3) se une por un dominio de unión y el otro antígeno tumoral diana (por ejemplo CD123, etc.) se une por un segundo dominio de unión. Los anticuerpos heterodiméricos también pueden ser trivalentes y biespecíficos, en donde el primer antígeno se une por dos dominios de unión y el segundo antígeno por un segundo dominio de unión. Como se indica en el presente documento, cuando CD3 es uno de los antígenos diana, es preferible que CD3 se una solo de forma monovalente, para reducir los posibles efectos secundarios.

La presente invención utiliza dominios de unión a antígeno anti-CD3 en combinación con dominios de unión a antígeno anti-antígeno tumoral diana (TTA). Como apreciarán los expertos en la materia, puede usarse cualquier colección de anti-CDR de CD3, anti-dominios pesados variables y ligeros variables de CD3, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras (véanse en particular las Figuras 2 a 7, y la Figura 68). De forma similar, puede usarse cualquier de los dominios de unión a antígeno anti-TTA, por ejemplo, los dominios de unión a antígeno anti-CD123, ya sean CDR, dominios ligeros variables o dominios pesados variables, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras, opcional e independientemente combinados en cualquier combinación.

Formato de abridor de botella

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato de armazón "triple F" o "abridor de botella" como se muestra en la Figura 1A, A y B. En esta realización, una cadena

pesada del anticuerpo contiene un Fv monocatenario ("scFv", como se define más adelante) y la otra cadena pesada es un formato FAb "regular", que comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera. Esta estructura algunas veces se denomina en el presente documento formato "triple F" (scFv-FAb-Fc) o formato "abridor de botella", debido a la similitud visual general a un abridor de botellas (véase las Figuras 1). Las dos cadenas se juntan mediante el uso de variantes de aminoácido en las regiones constantes (por ejemplo, el dominio Fc, el dominio CH1 y/o la región de bisagra) que promueven la formación de anticuerpos heterodiméricos como se describe con más detalle más adelante.

Hay varias ventajas distintas en el presente formato "triple F". Como se conoce en la técnica, los análogos de anticuerpo que se basan en dos construcciones de scFv con frecuencia tienen problemas de estabilidad y de agregación, que pueden aliviarse en la presente invención mediante la adición de un par de cadena ligera y pesada "regular". Además, a diferencia de los formatos que se basan en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, no hay problemas con el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, emparejamiento pesada 1 con ligera 2, etc.).

Muchas de las realizaciones indicadas en el presente documento se basan en general en el formato de abridor de botella que comprende un primer monómero que comprende un scFv, que comprende un dominio pesado variable y ligero variable, unidos covalentemente usando un enlazador de scFv (cargado, en muchos pero no en todos los casos), donde el scFv está unido covalentemente al extremo N de un primer

dominio Fc normalmente a través de un enlazador de dominios (que, como se indica en el presente documento, puede estar sin carga o cargado). El segundo monómero del formato de abridor de botella es una cadena pesada y la composición
5 comprende además una cadena ligera.

En general, en muchas realizaciones preferidas, el scFv es el dominio que se une al CD3, uniéndose el Fab de las cadenas pesada y ligera al otro TTA. Además, los dominios Fc de la invención generalmente comprenden
10 variantes de sesgo (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en la Figura 29 y Figura 34, seleccionándose las variantes de sesgo particularmente útiles del grupo que consiste en S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S:
15 S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q), opcionalmente variantes de ablación (incluyendo las mostradas en la Figura 31), opcionalmente enlazadores de scFv cargados (incluyendo los mostrados en la Figura 33) y la cadena pesada comprende variantes de pI
20 (incluyendo las mostradas en la Figura 30).

La presente invención proporciona formatos de abridor de botella en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

25 La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

Formato mAb-Fv

30 Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-Fv

mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de una unión C-terminal de un dominio pesado variable "extra" a un monómero y la unión C-terminal de un dominio ligero variable "extra" al otro monómero, formándose así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio de scFv "extra" se une a CD3.

En esta realización, el primer monómero comprende una primera cadena pesada, que comprende un primer dominio pesado variable y un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc, con un primer dominio ligero variable unido covalentemente al extremo C del primer dominio de Fc usando un enlazador de dominios. El segundo monómero comprende un segundo dominio pesado variable del segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio Fc, y un tercer dominio pesado variable unido covalentemente al extremo C del segundo dominio Fc usando un enlazador de dominios. Los dos dominios variables unidos por el extremo C terminal constituyen un scFv que se une a CD3. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv
5 que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

10 mAb-scFv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de una unión C-terminal de un scFv a uno de
15 los monómeros, formándose así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. De esta manera, el primer monómero comprende una primera cadena pesada (que comprende un dominio pesado variable y
20 un dominio constante), con un scFv unido covalentemente en el extremo C-terminal que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero
25 variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación,
30 variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Central scFv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-scFv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de un dominio scFv insertado formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a antígeno.

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. Esta realización utiliza

además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Formato Central-Fv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de un dominio scFv insertado formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de los monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a

antígeno, en donde cada monómero contiene un componente del scFv (por ejemplo, un monómero comprende un dominio pesado variable y el otro un dominio ligero variable).

En esta realización, un monómero comprende una primera
5 cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, y un dominio ligero variable adicional. El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio
10 Fc usando enlazadores de dominios. El otro monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y dominio Fc, y un dominio pesado variable adicional. El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del
15 dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios.

Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas
20 para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en
25 el presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv
30 con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv
5 que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Un central-scFv armado

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es un formato central-scFv armado mostrado en la Figura 1. En esta realización,
10 un monómero comprende solo un dominio Fc, mientras que el otro monómero usa un dominio scFv insertado formando así el segundo dominio de unión a antígeno. En este formato, la parte Fab se une a un TTA y el scFv se une a CD3 o
15 viceversa. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros.

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que
20 comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. El segundo monómero
25 comprende un dominio Fc. Esta realización utiliza además una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con la cadena pesada para formar un Fab. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones
30 incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de

ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos central-scFv con un brazo donde las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Formatos scFv dobles

La presente invención también proporciona formatos scFv dobles como se muestra en la técnica y se muestra en la Figura 1.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de ablación como se muestran en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Antígenos diana

5 Los anticuerpos biespecíficos de la invención tienen dos dominios de unión al antígeno diferentes: uno que se une a CD3 (generalmente de forma monovalente) y otro que se une a un antígeno tumoral diana (algunas veces denominado en el presente documento "TTA"). Los antígenos tumorales
10 diana adecuados incluyen, pero sin limitación CD123; ROR1, ROR2, BCMA; PSMA; SSTR2; SSTR5, FLT3, CD33, PSCA, ADAM 17, CEA, Her2, EGFR, EGFR-vIII, CD30, FOLR1, GD-2, CA-IX, Trop-2, CD70, mesotelina, EphA2, CD22, CD79b, GPNMB, CD56, CD138, CD52, CD74, CD30, CD123, RON, ERBB2, y EGFR.

15 El formato "triple F" es particularmente beneficioso para dirigirse a dos (o más) antígenos distintos. (Como se indica en el presente documento, esta dirección puede ser cualquier combinación de unión monovalente y divalente, dependiendo del formato). De esta manera, las
20 inmunoglobulinas del presente documento preferentemente se acoplan conjuntamente a dos antígenos distintos. La especificidad de cada monómero puede seleccionarse de las listas presentadas en el presente documento. En la Figura 1 se muestran formatos biespecíficos útiles adicionales para
25 uso con un dominio de unión anti-CD3.

Son aplicaciones adecuadas particulares de los anticuerpos heterodiméricos del presente documento pares co-diana para los que es beneficioso o crítico que cada antígeno diana se acople de forma monovalente. Dichos
30 antígenos pueden ser, por ejemplo, receptores inmunitarios que se activan tras la formación de complejos inmunitarios.

La activación celular de muchos receptores inmunitarios se produce solo por reticulación, lo que se consigue típicamente por complejos inmunitarios anticuerpo/antígeno, o mediante el acoplamiento de células efectoras a células diana. Para algunos receptores inmunitarios, por ejemplo, el receptor de señalización CD3 en células T, la activación es crítica únicamente tras el acoplamiento con la diana co-acoplada, ya que la reticulación no específica en una situación clínica puede inducir una tormenta de citocinas y toxicidad. Desde el punto de vista terapéutico, mediante el acoplamiento de dichos antígenos de forma monovalente en lugar de en forma multivalente, usando las inmunoglobulinas del presente documento, dicha activación se produce solo en respuesta a la reticulación solo en el microentorno del antígeno diana primario. La capacidad de dirigirse a dos antígenos diferentes con diferentes valencias es un aspecto nuevo y útil de la presente invención. Los ejemplos de antígenos diana para los que puede ser terapéuticamente beneficioso o necesario el co-acoplamiento de forma monovalente incluyen, pero sin limitación, receptores de activación inmunitaria tales como CD3, FcγR, receptores de tipo toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y receptores de quimiocinas. En muchas realizaciones, uno de los sitios de unión a antígeno se une a CD3 y en algunas realizaciones es el monómero que contiene scFv.

Prácticamente cualquier antígeno puede fijarse como diana por las inmunoglobulinas del presente documento, incluyendo pero sin limitación, proteínas, subunidades, dominios, motivos y/o epítomos que pertenecen a la siguiente lista de antígenos diana, que incluye tanto

factores solubles tales como citocinas como factores unidos a la membrana, incluyendo receptores transmembrana: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, A1 Receptor de Adenosina, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, 5 Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista 10 alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPARTIC, Factor natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, 15 BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neutrotrífico derivado 20 de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor del complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario(CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, 25 Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, 30 CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a,

CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 proteins), CD34, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-
5 1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de Clostridium botulinum, toxina de Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1,
10 CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor de aceleración de la Degradación, des(1-3)-IGF-I
15 (IGF-1 de cerebro), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, Encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxinal, EpCAM, Efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor IIa, Factor VII,
20 Factor VIIIC, Factor IX, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimuladora del Folículo, Fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7,
25 FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GITR, Glucagón, Glut 4, glicoproteína
30 IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de hormona de crecimiento Hapteno (NP-cap o NIP-

cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de la envuelta de gB de HCMV, HCMV) glicoproteína de la envuelta de gH, UL de HCMV, factor de crecimiento Hemopoyético (HGF), gp120 de Hep B, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4
5 (ErbB-4), glicoproteína gB del virus del herpes simple (HSV), glicoproteína gD de HSV, HGFA, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), gp120 de HIV, bucle V3 de gp 120 de HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus
10 humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-
15 12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, cadena A de Insulina, cadena B de Insulina, factor de crecimiento similar a Insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina
20 alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6,, Calicreína 11, Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15,
25 Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR, Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1 Latente, TGF-1 bp1 Latente, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, antígeno Y de Lewis, antígeno relacionado con Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo,
30 LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Surfactante pulmonar, hormona

Luteinizante, Receptor Beta de Linfotóxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, receptor de MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, 5 MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora Muellieriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4 o -6, Neurturina, factor de crecimiento 10 Neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona Paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria 15 (PLAP), PlGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, Proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de Relaxina, cadena B de Relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, 20 factores Reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, albúmina Sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína-72 asociada a tumores), TARC, TCA-3, receptores de células T (por 25 ejemplo, receptor alfa/beta de células T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Específico, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIb, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, 30 TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de Timo, hormona estimuladora del Tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Factor Tisular,

TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (Ligando TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (Ligando TRANCE/RANK ODF, Ligando OPG), TNFSF12 (Ligando TWEAK Apo-3, Ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (Ligando LIGHT HVEM), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (Ligando GITR Ligando AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (Ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (Ligando CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Ligando Fas Ligando Apo-1, Ligando APT1), TNFSF7 (Ligando CD27 CD70), TNFSF8 (Ligando CD30 CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1BB Ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno CA 125 asociado a tumores, antígeno asociado a tumores que expresa carbohidrato relacionado con Y de

Lewis, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos Virales, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Los antígenos ejemplares que pueden fijarse como diana específicamente por las inmunoglobulinas de la invención incluyen pero sin limitación: Her2, EGFR, EpCAM, CD3, FcγRIIIa (CD16), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRI (CD64), receptores de tipo Toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas tales como IL-2, IL-5, IL-13, IL-12, IL-23 y TNFα y receptores de citocinas tales como IL-2R, quimiocinas, receptores de quimiocinas, factores de crecimiento tales como VEGF y HGF y similares. Para formar los anticuerpos biespecíficos de la invención, pueden prepararse anticuerpos contra cualquier combinación de estos antígenos; es decir, cada uno de estos antígenos puede incluirse o excluirse opcional e independientemente de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención.

Son combinaciones particularmente preferidas para anticuerpos biespecíficos un dominio de unión a antígeno contra CD3 y un dominio de unión a antígeno seleccionado de un dominio que se une a CD123, cuyas secuencias se muestran en las Figuras.

Ácidos nucleicos de la invención

La invención proporciona además composiciones de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos biespecíficos de la invención. Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones de ácidos nucleicos dependerán del formato y armazón de la proteína heterodimérica. De esta manera, por ejemplo, cuando el formato requiere tres secuencias de aminoácidos, tal como para el formato triple F (por ejemplo, un primer monómero de aminoácido que comprende un dominio Fc y un scFv, un segundo monómero de aminoácido que comprende una cadena pesada y una cadena ligera), pueden incorporarse tres secuencias de ácido nucleico en uno o más vectores de expresión para la expresión. De forma similar, en algunos formatos (por ejemplo, formatos scFv dobles tales como se desvela en la Figura 1) solo se necesitan dos ácidos nucleicos; de nuevo, pueden ponerse en uno o dos vectores de expresión.

Como se conoce en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la invención pueden incorporarse en vectores de expresión como es conocido en la técnica y dependiendo de las células hospedadoras usadas para producir los anticuerpos heterodiméricos de la invención. En general, los ácidos nucleicos se unen operativamente a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores de selección, sitios de unión a ribosomas, inductores, etc.). Los vectores de expresión pueden ser extracromosómicos o vectores de integración.

Los ácidos nucleicos y/o vectores de expresión de la invención después se utilizan para transformar cualquier número de tipos diferentes de células hospedadoras como es

bien conocido en la técnica, incluyendo células de mamífero, bacterianas, de levadura, de insecto y/o fúngicas, encontrando utilidad las células de mamífero (por ejemplo células CHO) en muchas realizaciones.

5 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican cada monómero y el ácido nucleico opcional que codifica una cadena ligera, según es aplicable dependiendo del formato, están contenidos cada uno dentro de un solo vector de expresión, generalmente bajo controles de
10 promotor diferentes o el mismo control de promotor. En realizaciones de utilidad particular en la presente invención, cada uno de estos dos o tres ácidos nucleicos está contenido en un vector de expresión diferente. Como se muestra en el presente documento y en el documento
15 62/025,931, incorporado en el presente documento por referencia, pueden usarse diferentes relaciones de vector para dirigir la formación de heterodímeros. Es decir, sorprendentemente, aunque las proteínas comprenden primer monómero:segundo monómero:cadena ligera (en el caso de
20 muchas de las realizaciones del presente documento que tienen tres polipéptidos que comprenden el anticuerpo heterodimérico) en una relación 1:1:2, estas no son las relaciones que proporcionan los mejores resultados. Véase **Error! Reference source not found..**

25 Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se preparan cultivando células hospedadoras que comprenden el vector o los vectores de expresión como es bien conocido en la técnica. Una vez producidos, se realizan etapas de purificación de anticuerpo tradicionales, incluyendo una
30 etapa de cromatografía de intercambio iónico. Como se analiza en el presente documento, si los pI de los dos

monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico. Es decir, la inclusión de sustituciones de pI que alteren el punto isoeléctrico (pI) de cada monómero de forma que cada monómero tenga un pI diferente y el heterodímero también tenga un pI distinto, facilita de esta manera la purificación isoeléctrica del heterodímero "triple F" (por ejemplo, columnas de intercambio aniónico, columnas de intercambio catiónico). Estas sustituciones también ayudan en la determinación y supervisión de cualquier homodímero scFv-Fc doble y mAb después de la purificación (por ejemplo, geles IEF, cIEF y columnas IEX analíticas).

15 Tratamientos

Una vez fabricadas, las composiciones de la invención encuentran utilidad en varias aplicaciones. CD123 está sin regular en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas, por consiguiente, los anticuerpos heterodiméricos de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de cáncer, incluyendo pero sin limitación todos los linfomas de células B y leucemias, incluyendo pero sin limitación el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide crónica (CML).

Por consiguiente, las composiciones heterodiméricas de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de estos cánceres.

Composiciones de anticuerpo para administración in vivo

Las formulaciones de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metilo o propiol parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos) proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o

sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo cuando sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable
10 proporcionar anticuerpos con otras especificidades. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación
15 en cantidades que son eficaces para el fin deseado.

 Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y
20 microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's
25 Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

 Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles o casi estériles. Estos se consiguen fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

30 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de

liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos n.º 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma. etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Pueden aconsejarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S--S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos

apropiados y desarrollando composiciones de matriz poliméricas específicas.

Modalidades de administración

Los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa subcutánea del anticuerpo.

Modalidades de tratamiento

En los métodos de la invención, se usa terapia para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejora en la enfermedad o afección y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un aumento de la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas, (5) inhibición (es decir ralentización en alguna medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral; (6) un aumento de la tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada pueden determinarse por criterios de respuesta estandarizados específicos para esa

enfermedad o afección. La respuesta del tumor puede evaluarse con respecto a cambios en la morfología tumoral (es decir, carga tumoral total, tamaño del tumor y similares) usando técnicas de exploración por imágenes de resonancia magnética (MRI), exploración por imágenes de rayos x, exploración tomográfica computarizada (CT), formación de imágenes de barrido óseo, endoscopia y toma de muestras de biopsias de tumor incluyendo aspiración de médula ósea (BMA) y recuento de células tumorales en la circulación.

Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de una enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF) o proteína monoclonal anormal en caso de mieloma.

Dicha respuesta puede persistir durante al menos 4 a 8 semanas, o algunas veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. Como alternativa, una mejoría en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos aproximadamente un 50 % de reducción en toda la carga tumoral mediable (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína

monoclononal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que pueden persistir durante 4 a 8 semanas o 6 a 8 semanas.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los medicamentos usados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos.

Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular o de inducir apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la materia podría determinar dichas cantidades basándose en factores tales como las dimensiones

del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una sola embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La especificación para las formas de dosificación unitaria de la presente invención se dicta por y es directamente dependiente de (a) las características típicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos biespecíficos usados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia.

Un intervalo ejemplar y no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz y un anticuerpo biespecífico usado en la presente invención es aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-50 mg/kg, por ejemplo
5 aproximadamente 0.1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.5, aproximadamente tal como 0.3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o mayor, tal como una dosis de 1 a
10 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 5 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 8 mg/kg.

Un profesional médico con experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por
15 ejemplo, un médico o veterinario podría empezar dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/kg tal como de 200 a 400 mg/kg. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión
25 continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como mayor de 24 horas, si se desea para
30 reducir efectos secundarios incluyendo toxicidad.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, durante hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces cuando sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre después de la administración, por ejemplo, tomando una muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a la región de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico se administra una vez por semana durante 2 a 12 semanas, tal como durante 3 a 10 semanas, tal como durante 4 a 8 semanas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez por semana durante un periodo de 6 meses o mayor.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo biespecífico seguida de una infusión de un anticuerpo biespecífico conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una dosificación diaria de un anticuerpo en una cantidad de

aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o, como alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4, o 2 horas o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo biespecífica se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos y doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbacina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercalantes de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercalantes de ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo 5-fluorouracilo, capecitibina, gemcitabina, fludarabina,

citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea).

Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y
5 análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (por ejemplo CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasoma (por
10 ejemplo bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluyendo inhibidores de la quinasa I κ B; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y por lo tanto regulan negativamente la replicación celular (por ejemplo trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab) y otros
15 inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que están regulados positivamente, sobreexpresados o activados en cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la
20 invención pueden usarse antes, junto con o después del tratamiento con Velcade® (bortezomib).

Todas las referencias citadas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

25 Aunque anteriormente se han descrito realizaciones particulares de la invención con fines ilustrativos, los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones
30 adjuntas.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. No debe considerarse que estos ejemplos limitan la presente invención a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Para todas las posiciones de región constante discutidas en la presente invención, la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, incorporada en su totalidad por referencia). Los expertos en la materia de los anticuerpos apreciarán que esta invención consiste en una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de inmunoglobulina. Por consiguiente, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada como se define por el índice EU no corresponderá necesariamente a su secuencia secuencial.

En las Publicaciones US 2015/0307629, 2014/0288275 y WO2014/145806, todas ellas incorporadas expresamente por referencia en su totalidad se indica técnicas científicas generales y específicas, y particularmente para las técnicas indicadas en el presente documento.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1: FORMATOS ALTERNATIVOS**

Producción de biespecíficos

En las Figuras 1 se muestran viñetas de biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. En la Figura 39 a Figura 43 se indican secuencias de aminoácidos para biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 de formato alterno. El ADN que codifica las

tres cadenas necesarias para la expresión de biespecíficos se generaron por síntesis de genes (Blue Heron Biotechnology, Bothell, Wash.) y se subclonaron usando técnicas de biología molecular convencionales en el vector de expresión pTT5. Se introdujeron sustituciones usando mutagénesis dirigida (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, Tex.) o síntesis de genes adicionales y subclonación. El ADN se introdujo por transfección en células HEK293E para la expresión y las proteínas resultantes se purificaron de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad en proteína A (GE Healthcare) y cromatografía de intercambio catiónico. En la Figura 35 se muestran los rendimientos después de la purificación de afinidad en proteína A. La purificación por cromatografía de intercambio catiónico se realizó usando una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare) con un tampón de lavado/equilibrio de MES 50 mM, pH 6.0 y un tampón de elución de MES 50 mM, pH 6.0 + gradiente lineal de NaCl 1 M (véanse los cromatogramas en la Figura 36).

Citotoxicidad de células T redirigida

Se caracterizaron biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38⁺. Se incubaron 10.000 células RPMI8266 durante 24 h con 500.000 PBMC humanas. La RTCC se midió por fluorescencia LDH como se indica (véase la Figura 37).

EJEMPLO 2

Citotoxicidad de células T redirigida

Se caracterizaron biespecíficos Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38⁺. Se incubaron 40.000 células RPMI8266

durante 96 h con 400.000 PBMC humanas. La RTCC se midió por citometría de flujo como se indica (véase la Figura 44). También se caracterizaron la expresión de células T CD4+ y CD8+ de CD69, Ki-67 y PI-9 por citometría de flujo y se muestran en la Figura 45.

Modelo en ratón de actividad antitumoral

En cuatro grupos de cinco ratones NOD scid gamma (NSG) se injertaron 5×10^6 células tumorales RPMI8226TrS (mieloma múltiple, que expresa luciferasa) por inyección intravenosa en la vena de la cola el Día 23. El Día 0, en los ratones se injertaron por vía intraperitoneal 10×10^6 PBMC humanas. Después del injerto de PBMC el Día 0, los artículos de ensayo se dosifican semanalmente (Días 0, 7) por inyección intraperitoneal a niveles de dosificación indicados en la Figura 4. El diseño del estudio se resume adicionalmente en la Figura 46. El crecimiento tumoral se controló midiendo el flujo total por ratón usando un sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS®). Tanto XmAb13551 como XmAb15426 mostraron efectos antitumorales sustanciales (véase la Figura 47 y la 48).

Estudios en mono cinomolgus

A monos cinomolgus se les administró una sola dosis de biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. También se incluyó un control de biespecífico anti-RSV x anti-CD3. Los niveles de dosificación fueron: 20 µg/kg XmAb13551 (n=2), 0.5 mg/kg XmAb15426 (n=3), 3 mg/kg XmAb14702 (n=3), o 3 mg/kg XmAb13245 (control anti-RSV x anti-CD3, n=3) (en 3 estudios independientes). Los biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 redujeron rápidamente las células CD38+ en sangre periférica (véase la Figura 49). Los biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 dieron como resultado una activación de células

T como se mide por expresión de CD69 (véase la Figura 50). También se midieron los niveles en suero de IL-6 (véase la Figura 51). Obsérvese que, en comparación con XmAb13551, XmAb15426 tuvo una mayor duración de reducción de células CD38+ y menores niveles de activación de células T de producción de IL-6.

XmAb15426 y XmAb14702 se ensayaron a dosis únicas de 0.5 mg/kg y 3 mg/kg respectivamente. Ambos anticuerpos se toleraron bien a esas dosis superiores, coherente con los niveles moderados de IL6 observados en suero de los monos tratados. Además, XmAb15426, con afinidad CD3 intermedia, redujo más eficazmente las células CD38+ a 0.5 mg/kg en comparación con el XmAb13551 de alta afinidad original dosificado a 2, 5 o 20 µg/kg. La reducción por XmAb15426 fue más sostenida en comparación con la dosis superior de XmAb13551 en el estudio previo (7 frente a 2 días, respectivamente). Debe destacarse que, aunque la reducción de células diana fue mayor en el caso de XmAb15426, la activación de células T (CD69, CD25 e inducción de PD1) fue mucho menor en los monos tratados con XmAb15426 incluso cuando se la dosis fue 25 veces mayor que el grupo de 20 µg/kg de XmAb13551. XmAb14702, con afinidad muy baja por CD3 tuvo poco efecto sobre las células CD38+ y la activación de células T.

Estos resultados demuestran que la modulación de la activación de células T mediante la atenuación de la afinidad por CD3 es un método prometedor para mejorar la ventana terapéutica de anticuerpos biespecíficos que se acoplan a las células T. Esta estrategia tiene posibilidad de expandir el conjunto de antígenos susceptibles de fijarse como diana en la inmunoterapia de células T al

mejorar la la tolerancia y permitir una mayor dosificación para superar el aclaramiento de antígeno con dianas tales como CD38. Los presentes inventores han demostrado que al reducir la afinidad por CD3, XmAb 15426 reduce de forma
5 eficaz las células CD38+ mientras que minimiza los efectos de CRS observados con las dosis comparables de su homólogo de alta afinidad XmAb13551.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la
10 práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

15

20

25

30

**Anticuerpos heterodiméricos que se unen a CD3 y a antígenos
tumorales**

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad según el artículo
5 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de
Estados Unidos n.º 62/085,117 presentada el 26 de noviembre
de 2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados
Unidos n.º 62/084,908 presentada el 26 de noviembre de
2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos
10 n.º 62/085,027 presentada el 26 de noviembre de 2014, la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º
62/085,106 presentada el 26 de noviembre de 2014 la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º
62/159,111 presentada el 8 de mayo de 2015, la Solicitud de
15 Patente Provisional de Estados Unidos n.º 62/251,005
presentada el 4 de noviembre de 2015 y la Solicitud de
Patente Provisional de Estados Unidos n.º 62/250,971,
presentada el 4 de noviembre de 2015, todas ellas
incorporadas expresamente en el presente documento por
20 referencia en su totalidad, con referencia particular a las
figuras, leyendas y reivindicaciones del presente
documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han usado satisfactoriamente agentes terapéuticos
25 basados en anticuerpos para tratar una diversidad de
enfermedades, incluyendo cánceres y trastornos
autoinmunitarios/inflamatorios. Sin embargo aún se
necesitan mejoras en esta clase de fármacos,
particularmente con respecto al aumento de su eficacia
30 clínica. Una vía que se está explorando es la obtención por
ingeniería genética de sitios de unión a antígeno

adicionales y nuevos en fármacos basados en anticuerpos de tal forma que una sola molécula de inmunoglobulina se acople al mismo tiempo con dos antígenos diferentes. Dichos formatos de anticuerpo no nativos o alternos que se acoplan con dos antígenos diferentes con frecuencia se denominan
5 biespecíficos. Debido a la diversidad considerable de la región variable del anticuerpo (Fv) se hace posible producir un Fv que reconozca prácticamente cualquier molécula, el enfoque típico para la generación biespecífica
10 es la introducción de nuevas regiones variables en el anticuerpo.

Se han explorado varios formatos de anticuerpo alternos para la dirección biespecífica (Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger y Hudson, 2005, Nature
15 Biotechnology 23[9]:1126-1136; Kontermann, mAbs 4(2):182 (2012), y todos ellos se incorporan expresamente en el presente documento por referencia). Inicialmente, se prepararon anticuerpos biespecíficos fusionando dos líneas celulares que producían, cada una, un solo anticuerpo
20 monoclonal (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-540). Aunque el hibridoma o cuadroma híbrido resultante producía anticuerpos biespecíficos, solo eran una población minoritaria y se necesitaba una purificación extensiva para aislar el anticuerpo deseado. Una solución de ingeniería
25 genética para esto fue el uso de fragmentos de anticuerpo para preparar biespecíficos. Como dichos fragmentos carecen de la estructura cuaternaria compleja de un anticuerpo de longitud completa, las cadenas ligera y pesada variables pueden unirse en construcciones genéticas individuales. Se
30 han generado fragmentos de anticuerpo de muchas formas diferentes, incluyendo diacuerpos, diacuerpos

monocatenarios, scFv en tándem y Fab₂ biespecíficos (Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; incorporado expresamente en el presente documento por referencia).

5 Aunque estos formatos pueden expresarse a altos niveles en bacterias y pueden tener efectos beneficiosos de penetración favorables debido a su pequeño tamaño, se eliminan rápidamente *in vivo* y pueden presentar obstáculos de fabricación relacionados con su producción y

10 estabilidad. Una causa principal de estos inconvenientes es que los fragmentos de anticuerpo típicamente carecen de la región constante del anticuerpo con sus propiedades funcionales asociadas, incluyendo un mayor tamaño, alta estabilidad y unión a diversos receptores Fc y ligandos que

15 mantienen una larga semivida en suero (es decir, el receptor Fc neonatal FcRn) o servir como sitios de unión para la purificación (es decir proteína A y proteína G).

Un trabajo más reciente ha intentado solucionar los inconvenientes de los biespecíficos basados en fragmentos

20 mediante la creación por ingeniería genética de una unión doble en formatos de tipo anticuerpo de longitud completa (Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297; USSN12/477,711; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo et al., 2000, Protein Engineering

25 13[5]:361-367; USSN09/865,198; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; incorporado expresamente en el presente documento por referencia).

Estos formatos solucionan algunos de los obstáculos de los

30 biespecíficos de fragmentos de anticuerpo, principalmente porque contienen una región Fc. Un inconveniente

significativo de estos formatos es que, como construyen nuevos sitios de unión a antígeno en la parte superior de las cadenas constantes homodiméricas, la unión al nuevo antígeno siempre es bivalente.

5 Para muchos antígenos que son atractivos como codianas en un formato biespecífico terapéutico, la unión deseada es monovalente más bien que bivalente. Para muchos receptores inmunitarios, la activación celular se realiza por entrecruzamiento de una interacción de unión monovalente.

10 El mecanismo de entrecruzamiento típicamente está mediado por complejos inmunitarios de anticuerpo/antígeno, o a través del acoplamiento de una célula efectora a una célula diana. Por ejemplo, los receptores Fc gamma de baja afinidad (FcγR) tales como FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa se

15 unen de forma monovalente a la región Fc del anticuerpo. La unión monovalente no activa a las células que expresan estos FcγR; sin embargo, tras la formación de complejos inmunitarios o el contacto entre una célula y otra, los receptores se entrecruzan y agrupan en la superficie

20 celular, llevando a la activación. En el caso de receptores responsables de mediar la destrucción celular, por ejemplo, FcγRIIIa en células citolíticas naturales (NK), el entrecruzamiento de receptores y la activación celular se

25 produce cuando la célula efectora se acopla a la célula diana en un formato de alta avidéz (Bowles y Weiner, 2005, J Immunol Methods 304: 88-99, incorporado expresamente por referencia).. De forma similar, en las células B, el receptor inhibidor FcγRIIb regula negativamente la

30 activación de células B solo cuando se acopla en un complejo inmunitario con el receptor de células B de la superficie celular (BCR), un mecanismo que está mediado por

la formación de complejos inmunitarios de IgG solubles con el mismo antígeno que se reconoce por el BCR (Heyman 2003, Immunol Lett 88[2]: 157-161; Smith y Clatworthy, 2010, Nature Reviews Immunology 10: 328-343; incorporado expresamente por referencia). Como otro ejemplo, se produce activación por CD3 de células T solo cuando su receptor de células T asociado (TCR) se acopla al MHC cargado con antígeno sobre células presentadoras de antígeno en una sinapsis célula a célula de alta avidez (Kuhns et al., 2006, Immunity 24: 133-139). De hecho, el entrecruzamiento bivalente no específico de CD3 usando un anticuerpo anti-CD3 induce una tormenta de citocinas y toxicidad (Perruche et al., 2009, J Immunol 183[2]: 953-61; Chatenoud y Bluestone, 2007, Nature Reviews Immunology 7: 622-632; incorporado expresamente por referencia). De esta manera, para el uso clínico práctico, el modo preferido de co-acoplamiento de CD3 para la destrucción redirigida de células diana es una unión monovalente que da como resultado la activación solo después del acoplamiento con la diana co-acoplada.

CD38, también conocido como ADP cíclico ribosa hidrolasa, es una glicoproteína transmembrana de tipo II con un largo dominio extracelular C terminal y un corto dominio citoplásmico N terminal. Entre las células hematopoyéticas, una colección de efectos funcionales se han atribuido a la señalización mediada por CD38, incluyendo proliferación de linfocitos, liberación de citocinas, regulación del desarrollo y supervivencia de células B y células mieloides, e inducción de la maduración de células dendríticas. CD38 carece de regulación en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares

derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas incluyendo el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de
5 células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otra parte, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38-. A pesar del reciente progreso en
10 el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerosos, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 siguen teniendo un mal pronóstico. De esta manera, existe la necesidad de métodos mejorados para tratar dichas formas de cáncer.

15 El antígeno CD19 de células B (CD19, también conocido como antígeno de superficie de células B B4, Leu-12) es un marcador de superficie de todas las células B humanas que se expresa desde las primeras etapas del desarrollo de células pre-B hasta la diferenciación terminal en células
20 plasmáticas. CD19 promueve la proliferación y supervivencia de células B maduras. Se asocia en un complejo con CD21 en la superficie celular. También se asocia con CD81 y Leu-13 y potencia la señalización del receptor de células B (BCR). Junto con BCR, CD19 modula umbrales de señalización
25 intrínsecos e inducidos por receptores de antígenos críticos para la expansión clonal de células B e inmunidad humoral. En colaboración con CD21, asocia el sistema inmunitario adaptativo y el innato. Tras la activación, la cola citoplásmica de CD19 se fosforila, lo cual conduce a
30 la unión por quinasas de la familia Src y el reclutamiento de la PI-3 quinasa. Es una diana de inmunoterapia atractiva

para cánceres de origen linfoide ya que también se expresa en la inmensa mayoría de células NHL así como en algunas leucemias.

Se han evaluado varios anticuerpos o conjugados de anticuerpo que se dirigen a CD19 en estudios preclínicos o en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres. Estos anticuerpos o conjugados de anticuerpo anti-CD19 incluyen, pero sin limitación, MT-103 (un anticuerpo CD19/CD3 biespecífico monocatenario; Hoffman et al, 2005 Int J Cancer 115: 98-104; Schlereth et al, 2006 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514), un diacuerpo CD19/CD16 (Schlenzka et al, 2004 Anti-cancer Drugs 15: 915-919; Kipriyanov et al, 2002 J Immunol 169: 137-144), BU12-saporina (Flavell et al, 1995 Br J Cancer 72: 1373-1379), y anti-CD19-idarrubicina (Rowland et al, 1993 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514); todos incorporados expresamente por referencia.

CD123, también conocido como receptor alfa de interleucina 3 (IL-3R α), se expresa en células dendríticas, monocitos, eosinófilos y basófilos. CD123 también se expresa de forma constitutiva por células madre/progenitoras hematopoyéticas comprometidas, por la mayoría de las células de linaje mieloide (CD13+, CD14+, CD33+, CD15^{low}), y por algunas células CD19+. Está ausente de las células CD3+.

De esta manera, aunque los biespecíficos generados a partir de fragmentos de anticuerpo sufren obstáculos biofísicos y farmacocinéticos, un inconveniente de los construidos con formatos de tipo anticuerpo de longitud completa es que se acoplan a antígenos co-diana de forma multivalente en ausencia del antígeno diana primario,

llevando a una activación no específica y posiblemente a toxicidad. La presente invención resuelve este problema mediante la introducción de nuevos anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD3 y CD38.

5 **BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable;
10 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo C de dicho dominio de Fc usando
15 un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada constante que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero
20 variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un
25 primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho primer dominio ligero variable está unido covalentemente al extremo C de dicho primer dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que
30 comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo

dominio de Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio de Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común
5 que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que
10 comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio de Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; donde dicho
15 scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada
20 constante que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer
25 monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho segundo dominio ligero variable está unido
30 covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 de dicho primer dominio pesado constante y el extremo N de dicho

primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio de Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio de Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio de Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio de Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En algunos aspectos, el primer y el segundo dominios de Fc tienen un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q. Además, el o los dominios pesados variables y el o los dominios ligeros variables se unen a un primer antígeno tumoral diana (TTA), el scFv se une a un segundo

TTA o a CD3 humano. En algunas realizaciones, el TTA se selecciona del grupo que consiste en ~~CD19, CD20 y~~ CD123.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a antígeno anti-CD3 que tienen CDR y/o los dominios variables y/o las secuencias de scFv representadas en las Figuras para H1.32_L1.47, H1.89_L1.47, H1.90_L1.47, H1.33_L1.47 y H1.31_L1.47. La invención proporciona además composiciones de ácido nucleico, composiciones de vectores de expresión y células hospedadoras.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable; en donde el scFv anti-CD3 se selecciona del grupo que consiste en anti-CD3 H1.32_L1.47, anti-CD3 H1.89_L1.47, anti-CD3 H1.90_L1.47 y anti-CD3 H1.33_L1.47 (SEQ ID NO:XX). El dominio variable pesado y el dominio variable ligero se unen a TTA (incluyendo, pero sin limitación a ~~CD19, CD20, CD38 y~~ CD123).

~~En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 que comprenden: a) un dominio ligero variable que comprende una v1CDR1 que~~

~~tiene la secuencia RASWSVSYIH (SEQ ID NO:XX), una vlCDR2 que tiene la secuencia ATSNLAS (SEQ ID NO:XX), y una vlCDR3 que tiene la secuencia QQWTHNPPT (SEQ ID NO:XX); y b) un dominio pesado variable comprende una vhCDR1 que tiene la~~
5 ~~secuencia SYNMH (SEQ ID NO:XX), una vhCDR2 que tiene la secuencia AIYPCNGATSYSQKFQC (SEQ ID NO:XX) y una vhCDR3 que tiene la secuencia SYMGGDWYFDV (SEQ ID NO:XX). En algunas realizaciones, los dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 tienen las secuencias de C2B8 H1.202_L1.113.~~

10 ~~En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 que comprenden: a) un dominio ligero variable que comprende una vlCDR1 que tiene la secuencia RASSSVSYIH (SEQ ID NO:XX), una vlCDR2 que tiene la secuencia ATSNLAS (SEQ ID NO:XX), y una vlCDR3~~
15 ~~que tiene la secuencia QQWTSNPPT (SEQ ID NO:XX); y b) un dominio pesado variable comprende una vhCDR1 que tiene la secuencia SYNMH (SEQ ID NO:XX), una vhCDR2 que tiene la secuencia AIYPCNGDTSYNQKFQC (SEQ ID NO:XX) y una vhCDR3 que tiene la secuencia STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO:XX).~~

20 ~~En algunas realizaciones, los dominios de unión al anticuerpo anti-CD20 tienen las secuencias de C2B8_H1L1.~~

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii)
25 un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena
30 pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y
ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende

un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable; en donde las cadenas ligera y pesada variables forman un dominio de unión de C2B8 H1.202_L1.113
5 o CDB8_H1L1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable. En esta realización, los dominios variables se unen a CD123 y pueden tener las secuencias de
10 7G3_H1.109_L1.47.
15
20

~~En aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos seleccionados del grupo que consiste en XENP15049, XENP15051, XENP15050, XENP13676, XENP14696, XENP15629, XENP15053, XENP15630, XENP15631, XENP15632, XENP15633, XENP15634, XENP15635, XENP15636, XENP15638, XENP15639, XENP13677, XENP14388, XENP14389, XENP14390, XENP14391, XENP14392, XENP14393, XENP16366, XENP16367, XENP16368, XENP16369, XENP16370, XENP16371, XENP16372, XENP16373, XENP16375, XENP16376 y XENP16377. También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, además de~~
25
30

~~métodos para fabricar estas proteínas y tratar a los
pacientes con ellas.~~

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B representan varios formatos de la
5 presente invención. Se representan dos formas del "abridor
de botellas", uno con el dominio de unión a antígeno anti-
CD3 que comprende un scFv y el dominio de unión a antígeno
anti-TTA que comprende un Fab, y otro con estos invertidos.
También se muestran los formatos mAb-Fv, mAb-scFv, Central-
10 scFv y Central-Fv. Además, se muestran formatos "uno-
armado", donde un monómero solo comprende un dominio de Fc,
tanto un brazo Central-scFv como un brazo Central-Fv.
También se muestra un formato de scFv doble.

La Figura 2 representa las secuencias de las
15 construcciones anti-CD3_H1.30_L1.47 "High CD3", incluyendo
los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas),
así como las vl y vhCDR individuales, así como una
construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente
subrayado). Como es el caso de todas las secuencias
20 representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede
reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador
cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 3 representa las secuencias de la
construcción de anti-CD3_H1.32_L1.47 "High-Int #1",
25 incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR
subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como
una construcción de scFv con un enlazador cargado
(doblemente subrayado). Como es el caso de todas las
secuencias representadas en las Figuras, este enlazador
30 cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un
enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 4 representa las secuencias de la construcción de anti-CD3_H1.89_L1.47 "High-Int #2", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 5 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 "High-Int #3", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 6 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 "Int", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 7 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.31_L1.47 "Low", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción

de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como es el caso de todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, según sea necesario.

La Figura 8 representa las secuencias de la construcción High CD38: OKT10_H1.77_L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 9 representa las secuencias de la construcción intermediate CD38: OKT10_H1L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 10 representa la secuencia de la construcción Low CD38: OKT10_H1L1, incluyendo los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 11 representa las secuencias de XENP15331.

La Figura 12 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 13 representa las secuencias de XENP14702.

La Figura 14 representa las secuencias de XENP15426.

La Figura 15 representa las secuencias de XENP14701.

La Figura 16 representa las secuencias de XENP14703.

La Figura 17 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 18 representa las secuencias de XENP18967.

La Figura 19 representa las secuencias de XENP18971.

La Figura 20 representa las secuencias de XENP18969.

La Figura 21 representa las secuencias de XENP18970.

La Figura 22 representa las secuencias de XENP18972.

La Figura 23 representa las secuencias de XENP18973.

La Figura 24 representa las secuencias de XENP15055.

5 La Figura 25 representa las secuencias de XENP13544.

La Figura 26 representa las secuencias de XENP13694.

La Figura 27 representa las secuencias de CD3 ϵ humana.

10 La Figura 28 representa la longitud completa (SEQ ID NO:130) y el dominio extracelular (ECD; SEQ ID NO:131) de la proteína CD38 humana.

La Figura 29A-29E representa pares útiles de conjuntos de variantes de heterodimerización (incluyendo las variantes skew y pI).

15 La Figura 30 representa una lista de regiones constantes de anticuerpo variante isostérico y sus sustituciones respectivas. pI₋(-) indica variantes de pI inferior, mientras que pI₊(+) indica variantes de pI superior. Estas pueden combinarse de forma opcional e independiente con otras variantes de heterodimerización de la invención (y también otros tipos de variantes, como se indica en el presente documento).

20 La Figura 31 representa variantes de ablación útiles que anular la unión a Fc γ R (denominadas algunas veces "variantes knock out" o "KO").

La Figura 32 muestra dos realizaciones particularmente útiles de la invención.

30 La Figura 33 representa varios enlazadores de scFv cargados que encuentran utilidad en el aumento o disminución del pI de anticuerpos heterodiméricos que utilizan uno o más scFv como componente. Un enlazador de

scFv individual de la técnica anterior con una sola carga se denomina "Whitlow", de Whitlow et al., Protein Engineering 6(8): 989-995 (1993). Debe tenerse en cuenta que este enlazador se usó para reducir la agregación y
5 aumentar la estabilidad proteolítica de los scFv.

La Figura 34 representa una lista de variantes de Fc con desviación de heterodímero obtenidas por ingeniería genética con rendimientos de heterodímeros (determinados por HPLC-CIEX) y estabilidades térmicas (determinadas por
10 DSC). La estabilidad térmica no determinada se indica por "n.d."

Figura 35 Rendimientos de expresión de biespecíficos después de purificación de afinidad en proteína A.

Figura 36 Cromatogramas de purificación de intercambio
15 catiónico.

Figura 37 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, incubación 24 h, 10.000 células RPMI8226, 400.000 células T. Los artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por
20 LDH

Figura 38 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC humanas. Los artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por
25 LDH

La Figura 39 representa las secuencias de XENP14419.
La Figura 40 representa las secuencias de XENP14420.
La Figura 41 representa las secuencias de XENP14421.
La Figura 42 representa las secuencias de XENP14422.
30 La Figura 43 representa las secuencias de XENP14423.

Figura 44 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 96 h de incubación, 40.000 células RPMI8226, 400.000 PBMC humanas. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3. La detección se realizó por
5 citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD38+.

Figura 45 Análisis adicional de ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas descrito en la Figura 1. La primera fila muestra la Intensidad Media de
10 Fluorescencia (MFI) del marcador de activación CD69 sobre células CD4+ y CD8+ detectadas por citometría de flujo. La segunda fila muestra el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que son Ki-67+, una medida de la proliferación celular. La tercera fila muestra la Intensidad Media de Fluorescencia
15 (MFI) intracelular del inhibidor de granzyme B PI-9 en células T CD4+ y CD8+ detectado por citometría de flujo.

Figura 46 Diseño de estudio de ratón para examinar la actividad antitumoral de Fab-scFv-Fc biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3.

20 Figura 47 Tamaño tumoral medido por IVIS® en función del tiempo y el tratamiento

Figura 48 Imágenes bioluminiscentes IVIS® (Día 10)

Figura 49 Reducción de células CD38⁺ en monos cinomolgus después de dosis únicas de los artículos de
25 ensayo indicados

Figura 50 Activación de células T medida por Intensidad Media de Fluorescencia de CD69 (MFI) en monos cinomolgus, la codificación de colores es como en la Figura
49.

30 Figura 51 Niveles en suero de IL-6, después de dosis únicas de los artículos de ensayo indicados.

La Figura 52 representa las secuencias de XENP15427.

La Figura 53 representa las secuencias de XENP15428.

La Figura 54 representa las secuencias de XENP15429.

La Figura 55 representa las secuencias de XENP15430.

5 La Figura 56 representa las secuencias de XENP15431.

La Figura 57 representa las secuencias de XENP15432.

La Figura 58 representa las secuencias de XENP15433.

La Figura 59 representa las secuencias de XENP15434.

La Figura 60 representa las secuencias de XENP15435.

10 La Figura 61 representa las secuencias de XENP15436.

La Figura 62 representa las secuencias de XENP15437.

La Figura 63 representa las secuencias de XENP15438.

La Figura 64 muestra las afinidades de unión en un ensayo Biacore.

15 La Figura 65 muestra la pureza de Heterodímeros durante la generación de grupos estables usando relaciones variadas de cadena Ligera, Fab-Fc y scFv-Fc.

Figura 66 Reducción de IgG2 e IgM humana por biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 en un modelo de ratón huPBMC.

20

La Figura 67 representa scFv variantes de anti-CD3 humanizados, con estabilidad optimizada. Se proporcionan sustituciones con respecto a la secuencia de scFv H1_L1.4. La numeración de aminoácidos es la numeración de Kabat.

25 Figura 68. Secuencias de aminoácidos de scFv variantes de anti-CD3 humanizados, de estabilidad optimizada. Las CDR están subrayadas. Para cada combinación de cadena pesada/cadena ligera, se indican cuatro secuencias: (i) scFv con etiqueta 6xHis C-terminal, (ii) scFv solo, (iii) VH sola, (iv) VL sola.

30

Figura 69 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La
5 detección se realizó por LDH.

Figura 70 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del injerto de PBMC a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de
10 sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgM e IgG2 humana.

La Figura 71 representa las secuencias de XENP15049.
La Figura 72 representa las secuencias de XENP15051.
La Figura 73 representa las secuencias de XENP15050.
15 La Figura 74 representa las secuencias de XENP13676.
La Figura 75 representa las secuencias de XENP14696.
La Figura 76 representa las secuencias de XENP15629.
La Figura 77 representa las secuencias de XENP15053.
La Figura 78 representa las secuencias de XENP15630.
20 La Figura 79 representa las secuencias de XENP15631.
La Figura 80 representa las secuencias de XENP15632.
La Figura 81 representa las secuencias de XENP15633.
La Figura 82 representa las secuencias de XENP15634.
La Figura 83 representa las secuencias de XENP15635.
25 La Figura 84 representa las secuencias de XENP15636.
La Figura 85 representa las secuencias de XENP15638.
La Figura 86 representa las secuencias de XENP15639.
La Figura 87 representa las secuencias de XENP13677.
La Figura 88 representa las secuencias de XENP14388.
30 La Figura 89 representa las secuencias de XENP14389.
La Figura 90 representa las secuencias de XENP14390.

La Figura 91 representa las secuencias de XENP14391.
La Figura 92 representa las secuencias de XENP14392.
La Figura 93 representa las secuencias de XENP14393.
La Figura 94 representa las secuencias de XENP16366.
5 La Figura 95 representa las secuencias de XENP16367.
La Figura 96 representa las secuencias de XENP16368.
La Figura 97 representa las secuencias de XENP16369.
La Figura 98 representa las secuencias de XENP16370.
La Figura 99 representa las secuencias de XENP16371.
10 La Figura 100 representa las secuencias de XENP16372.
La Figura 101 representa las secuencias de XENP16373.
La Figura 102 representa las secuencias de XENP16374.
La Figura 103 representa las secuencias de XENP16375.
La Figura 104 representa las secuencias de XENP16376.
15 La Figura 105 representa las secuencias de XENP16377.
La Figura 106 representa las secuencias de los
antígenos CD20 y CD123.

Figura 107 determinación de resonancia de plasmón de
superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
20 son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc humano (Sino Biological) a
la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se
sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

Figura 108 determinación de resonancia de plasmón de
25 superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo
son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino
Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos
de ensayo se sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

30 Figura 109 determinación de resonancia de plasmón de
superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo

son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3δ ϵ -Fc humano (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

5 Figura 110 Determinación de resonancia de plasmón de superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3δ ϵ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos
10 de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

 Figura 111 Determinación de resonancia de plasmón de superficie de la afinidad de CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3.
15 Se unió covalentemente CD3δ ϵ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

 Figura 112 Ensayo de citotoxicidad de células T
20 redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células Ramos, 250.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

 Figura 113 Ensayo de citotoxicidad de células T
25 redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 200.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

30 Figura 114 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

Figura 115 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 5 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1L1) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 116 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (reducidas CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 117 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

Figura 118 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

Figura 119 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 1 y 8 días después del injerto de PBMC a 5 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgG2 e IgM humana.

Figura 120 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del injerto de PBMC a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgG2 e IgM humana.

La Figura 121 representa las secuencias de C2B8_H1.202_L1.113 High CD20.

La Figura 122 representa las secuencias de C2B8_H1L1 Low CD20.

5 La Figura 123 representa las secuencias de 7G3_H1.109_L1.57 CD123.

La Figura 124 muestra una matriz de posibles combinaciones para la invención. Una "A" significa que las CDR de las secuencias de CD3 mencionadas pueden combinarse con las CDR de la TTA en el lado derecho. Es decir, las
10 vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con las vhCDR de la secuencia de CD38 OKT10 H1.77 y las vlCDR de la
15 secuencia de OKT10L1.24. Una "B" significa que las CDR de las construcciones de CD3 pueden combinarse con los dominios ligero y pesado variables de la TTA. Es decir, las vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la
20 secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con la secuencia de CD38 OKT10 H1.77 de dominio pesado variable y la secuencia de OKT10L1.24. Una "C" está invertida, de tal forma que el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de las secuencias de CD3 se usan con las CDR de
25 las TTA. Una "D" es cuando están combinadas las dos cadenas ligeras variables y pesadas variables de cada uno. Una "E" es cuando el scFv del CD3 se usa con la CDR de la TTA, y una "F" es cuando el scFv del CD3 se usa con los dominios pesado variable y ligero variable del dominio de unión a
30 antígeno de TTA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Para que la solicitud pueda entenderse más completamente, a continuación se proporcionan varias definiciones. Se entiende que dichas definiciones incluyen sus equivalentes gramaticales.

Por "anulación" en el presente documento se entiende una reducción o eliminación de actividad. Así pues, por ejemplo, "anulación de la unión de FcγR" significa que la variante de aminoácidos de la región Fc tiene menos de un 50 % de la unión de partida en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, siendo preferida una pérdida de actividad menor del 70-80-90-95-98 %, y en general, estando la actividad por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore. Son de un uso particular en la anulación de la unión a FcγR los mostrados en la Figura 16.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. La ADCC está correlacionada con la unión a FcγRIIIa; una mayor unión a FcγRIIIa conduce a un aumento de la actividad ADCC.

Por "ADCP" o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos, como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen la fagocitosis de la célula diana.

Por "modificación", en el presente documento, se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia de polipéptido o una alteración en un resto unido químicamente a una proteína.

5 Por ejemplo, una modificación puede ser una estructura PEG o carbohidrato alterado unido a una proteína. Por "modificación de aminoácido" en el presente documento se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia de polipéptido. Por motivos de

10 claridad, a menos que se indique otra cosa, la modificación de aminoácidos siempre es en un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en el ADN y ARN.

Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución", en el

15 presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con un aminoácido diferente. En particular, en algunas realizaciones, la sustitución es en un aminoácido que no es natural en la posición particular,

20 o bien no es natural dentro del organismo o en ningún organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se ha reemplazado con tirosina. Por motivos de claridad, una

25 proteína que se ha modificado por ingeniería genética para cambiar el ácido nucleico que codifica la secuencia pero sin cambiar el aminoácido de partida (por ejemplo, cambiando CGG (que codifica arginina) por CGA (que sigue codificando arginina) para aumentar los niveles de

30 expresión en el organismo hospedador) no es una "sustitución de aminoácido"; es decir, a pesar de la

creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular que inicialmente no es una sustitución de aminoácido.

5 Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa en el presente documento, se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, -233E o 233E designa una inserción de ácido glutámico después de la
10 posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Por "delección de aminoácido" o "delección", como se usa en el presente documento, se entiende la eliminación de una
15 secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, E233- o E233# o E233() designa una delección de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una delección de la secuencia GluAspAla que empieza en la
20 posición 233.

Por "proteína variante" o "variante de proteína" o "variante", como se usan en el presente documento, se entiende una proteína que difiere de la proteína parental en al menos una modificación de aminoácido. La variante de
25 proteína puede hacer referencia a la propia proteína, una composición que comprende la proteína, o la secuencia amino que la codifica. Preferentemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con la proteína parental, por ejemplo, de
30 aproximadamente una a aproximadamente setenta modificaciones de aminoácidos, y preferentemente de

aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia parental. Como se describe más adelante, en algunas realizaciones, el polipéptido parental, por ejemplo un polipéptido parental Fc, es una secuencia humana de tipo silvestre, tal como la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque ciertas secuencias humanas con variantes también pueden servir como "polipéptidos parentales", por ejemplo, el híbrido IgG1/2 de la Figura 19. La secuencia variante de proteína en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente un 80 % de identidad con una secuencia de proteína parental, y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad, más preferentemente al menos un 95-98-99 % de identidad. Proteína variante puede hacer referencia a la propia proteína variante, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. Por consiguiente, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental por al menos una modificación de aminoácido, por "variante de IgG" o "IgG variante", como se usan en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG parental (de nuevo, en muchos casos, de una secuencia de IgG humana) al menos en una modificación de aminoácido, y por "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usan en el presente documento, se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de una secuencia de inmunoglobulina parental por al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de Fc" o "Fc variante", como se usan en el presente documento, se entiende una proteína que

comprende una modificación de aminoácido en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. De esta manera, por ejemplo, N434S o 434S es una variante de Fc con la sustitución de serina en posición 434 con respecto al polipéptido Fc parental, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU. De forma similar, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S con respecto al polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 428L/434S. Debe indicarse que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que M428L/N434S, y así sucesivamente. Para todas las posiciones analizadas en la presente invención que se refieren a anticuerpos, a menos que se indique otra cosa, la numeración de posiciones de aminoácidos está de acuerdo con el índice EU. El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, incorporado en su totalidad en el presente documento por referencia). La modificación puede ser una adición, delección o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y, en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen la Patente de Estados Unidos n.º 6.586.207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin,

et al., (2002), PICAS United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, todos incorporados en su totalidad por referencia.

Como se usa en el presente documento, "proteína" en el presente documento significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteína, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptidilo puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992), incorporado en su totalidad por referencia). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos (por ejemplo, no un aminoácido que está codificado por ADN); como apreciarán los expertos en la materia. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los fines de la invención, y pueden utilizarse aminoácidos tanto en configuración D como en configuración L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos sintéticos incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Shultz y colaboradores, incluyendo pero sin limitación métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635): 964-7, todos incorporados en su totalidad por referencia. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadena laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, enlazadores con otras

moléculas, fusión con proteínas o dominios de proteína y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por "resto" como se usa en el presente documento se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la Asparagina 297 (también denominada Asn297 o N297) es un resto en la posición 297 en el anticuerpo humano IgG1.

Por "Fab" o "región Fab", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede hacer referencia a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fab. Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un solo anticuerpo. Como apreciarán los expertos en la materia, estos generalmente están constituidos por dos cadenas.

Por "modificación de subclase de IgG" o "modificación de isotipo", como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alienado diferente. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG.

Por "modificación no natural", como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácido que no es isotípica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende una serina en la posición 434, la

sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (o híbridos de las mismas) se considera una modificación no natural.

Por "aminoácido" y "identidad de aminoácido", como se usa en el presente documento, se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales que se codifican por el ADN y ARN.

Por "función efectora" como se usa en el presente documento, se entiende un acontecimiento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor Fc o ligando. Las funciones efectoras incluye, pero sin limitación, ADCC, ADCP y CDC.

Por "ligando de Fc de IgG", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando Fc. Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitación, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, Clq, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de estafilococo, proteína G de estreptococo y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136, incorporado en su totalidad por referencia). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Son ligandos de Fc de IgG particulares FcRn y los receptores Fc gamma. Por "ligando de Fc", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de Fc/ligando de Fc.

Por "receptor Fc gamma", "FcγR" o "FcγgammaR", como se usan en el presente documento, se entiende cualquier

miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifican por un gen FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, pero sin limitación, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, incorporado en su totalidad por referencia), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen pero sin limitación FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR de ratón no descubiertos.

Por "FcRn" o "Receptor Fc neonatal", como se usa en el presente documento, se entiende una proteína que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifica al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada se codifica por el gen FcRn. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. En la Leyenda de la Figura

83 se muestra una diversidad de variantes de FcRn usadas para aumentar la unión al receptor FcRn y, en algunos casos, para aumentar la semivida en suero.

Por "polipéptido parental", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de partida que posteriormente se modifica para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. El polipéptido parental puede hacer referencia al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido parental o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "inmunoglobulina parental", como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante y por "anticuerpo parental", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe indicarse que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos comerciales, producidos de forma recombinante conocidos como se indica más adelante.

Por "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. De esta manera, Fc se refiere a al menos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y el extremo N terminal de bisagra flexible de estos dominios. En el caso de IgA e IgM, Fc puede incluir la

cadena J. En el caso de IgG, el dominio Fc comprende dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 (C γ 2 y C γ 3) y la región de bisagra inferior entre C γ 1 (C γ 1) y C γ 2 (C γ 2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, normalmente se define que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana incluye los restos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe de forma más detallada más adelante, las modificaciones de aminoácidos se realizan en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores Fc γ R o en el receptor FcRn.

Por "región constante pesada" en el presente documento se entiende la parte CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

Por "proteína de fusión Fc" o "inmunoadesina", en el presente documento, se entiende una proteína que comprende una región Fc, generalmente unida (opcionalmente a través de un resto enlazador, como se describe en el presente documento) a una proteína diferente, tal como un resto de unión a una proteína diana, como se describe en el presente documento. En algunos casos, un monómero del anticuerpo heterodimérico comprende una cadena pesada de anticuerpo (que incluye un scFv o que incluye además una cadena ligera) y el otro monómero es una fusión de Fc, que comprende un dominio de Fc variante y un ligando. En algunas realizaciones, estas "proteínas medio anticuerpo-medio fusión" se denominan "cuerpos de fusión".

Por "posición", como se usa en el presente documento, se entiende una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente,

o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo el índice EU para la numeración de anticuerpos.

Por "antígeno diana", como se usa en el presente documento, se entiende la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. A continuación se describen un amplio número de antígenos diana adecuados.

Por "capacidad de emparejamiento" en el contexto de los monómeros de los anticuerpos heterodiméricos de la invención en el presente documento se entiende que, de forma similar a las dos cadenas de ADN que "se emparejan", se incorporan variantes de heterodimerización en cada monómero para conservar la capacidad de "emparejarse" para formar heterodímeros. Por ejemplo, si algunas variantes de pI se modifican por ingeniería genética en el monómero A (por ejemplo, haciendo que el pI sea superior) entonces las variantes estéricas que son "pares de carga" que pueden utilizarse tampoco interfieren con las variantes de pI, por ejemplo, las variantes de carga que hacen que un pI sea superior se ponen en la misma "cadena" o "monómero" para conservar las dos funcionalidades. De forma similar, para variantes "sesgadas" que se convierten en pares de un conjunto como se indica con más detalle más adelante, el experto en la materia considerará el pI para decidir en que cadena o monómero incorpora un conjunto del par, de tal forma que la separación de pI se maximice usando el pI de los sesgos también.

Por "célula diana", como se usa en el presente documento, se entiende una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable", como se usa en el presente documento, se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes de V. kappa, V. lambda y/o VH que constituyen los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada respectivamente.

Por "tipo silvestre o WT" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

Los anticuerpos de la presente invención generalmente están aislados o son recombinantes. "Aislados", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresó. Normalmente, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un "anticuerpo aislado", se refiere a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes. "Recombinante" significa que los anticuerpos se han generado usando técnicas de ácido nucleico recombinante en células hospedadoras exógenas.

"Unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un antígeno o un epítipo particular

significa una unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que
5 generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competición con una molécula de control que es similar a la diana.

La unión específica para un antígeno o un epítopo
10 particular puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítopo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al
15 menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une
20 específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para una molécula de control con respecto al antígeno o epítopo.

Además, la unión específica para un antígeno o un
25 epítopo particular puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo de al menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para el epítopo con respecto a un control, donde KA o Ka se refiere a una tasa de asociación de una
30 interacción de anticuerpo-antígeno particular.

II. Visión general

Se han diseñado anticuerpos biespecíficos que se acoplan conjuntamente a CD3 y a un antígeno tumoral diana y se han usado para redirigir las células T para que ataquen y lisen células tumorales diana. Los ejemplos incluyen los
5 formatos BiTE y DART, que se acoplan de forma monovalente a CD3 y a un antígeno tumoral. Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al
10 síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo biespecífico se acopla a todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo
15 reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Además, estos formatos no contienen dominios de Fc y muestran semividas en suero muy cortas en los pacientes.

20 Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo
25 biespecífico se acopla a todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto
30 negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Una de estas posibles formas para reducir la producción de

citocinas y posiblemente reducir la activación de células T CD4 es reducir la afinidad del dominio anti-CD3 por CD3.

5 ~~Por consiguiente, en algunas realizaciones la presente invención proporciona construcciones de anticuerpos que comprenden dominios de unión a antígenos anti-CD3 que son agentes de unión "fuertes" o "de alta afinidad" a CD3 (por ejemplo, un ejemplo son los dominios variables pesado y ligero representados como H1.30_L1-47 (incluyendo~~
10 ~~opcionalmente un enlazador cargado cuando sea apropiado)) y también se unen a CD38. En otras realizaciones, la presente invención proporciona construcciones de anticuerpo que comprenden dominios de unión a antígeno anti-CD3 que son agentes de unión "débiles" o "de menor afinidad" a CD3. Otras realizaciones proporcionan construcciones de anticuerpo que comprenden dominios de unión a antígeno anti-CD3 que tienen una afinidad intermedia o "media" por CD3 que también se unen a CD38.~~

Debe apreciarse que las secuencias de anti-CD3 "altos, medios, bajos" de la presente invención pueden usarse en una diversidad de formatos de heterodimerización. Aunque la mayor parte de la divulgación del presente documento usa el formato "abridor de botella" de los heterodímeros, estas secuencias pesada y ligera variables, así como las secuencias de scFv (y secuencias de Fab que comprenden estas secuencias pesada y ligera variables) pueden usarse en otros formatos, tales como los representados en la Figura 2 de la Publicación WO n.º 2014/145806, cuyas Figuras, formatos y leyendas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se unen a dos antígenos

diferentes, por ejemplo los anticuerpos son "bienespecíficos", ya que se unen a dos antígenos diana diferentes, en general antígenos tumorales diana (TTA) como se describe más adelante. Estos anticuerpos heterodiméricos pueden unirse a estos antígenos diana de forma monovalente (por ejemplo, hay un solo dominio de unión a antígeno tal como un par de dominios ligero variable y pesado variable) o de forma bivalente (hay dos dominios de unión a antígeno que se unen cada uno independientemente al antígeno). Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se basan en el uso de diferentes monómeros que contienen sustituciones de aminoácidos que "favorecen" la formación de heterodímeros sobre los homodímeros, como se indica con más detalles más adelante, acoplados con "variantes de pI" que permiten una purificación sencilla de los heterodímeros de entre los homodímeros, como se indica de forma similar más adelante. Para los anticuerpos bienespecíficos heterodiméricos de la invención, la presente invención generalmente se basa en el uso de dominios de Fc modificados por ingeniería genética o variantes que pueden autoensamblarse en células de producción para producir proteínas heterodiméricas, y métodos para generar y purificar dichas proteínas heterodiméricas.

III. Anticuerpos

La presente invención se refiere a la generación de anticuerpos bienespecíficos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo CD3 y un antígeno tumoral diana tal como ~~CD20, CD38 y~~ CD123, y en general son anticuerpos terapéuticos. Como se analiza más adelante, el término "anticuerpo" se usa de forma general. Los anticuerpos que encuentran utilidad en la presente invención pueden tener

varios formatos como se describe en el presente documento, incluyendo anticuerpos tradicionales así como derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpo, descritos en el presente documento.

5 Las unidades estructurales de anticuerpo tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente
10 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. La presente invención se refiere a la clase de IgG, que tiene varias subclases, incluyendo, pero sin
15 limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. De esta manera, "isotipo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Debe entenderse que los anticuerpos
20 terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases. Por ejemplo, como se muestra en la Publicación US 2009/0163699, incorporada por referencia, la presente invención cubre la modificación por ingeniería genética por pI de híbridos IgG1/G2.

25 La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno, generalmente denominado en la técnica y en el presente documento "dominio Fv" o "región Fv". En la región
30 variable, tres bucles están juntos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar

un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (denominado en lo sucesivo "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa.

5 "Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida de forma uniforme. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente
10 invariantes denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones
15 hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad," "CDR" y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable en general incluye los restos
20 de aminoácido desde aproximadamente los restos de aminoácido 24-34 (LCDR1; "L" indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región
25 variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o los restos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, restos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96
30 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región

variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Más adelante se describen CDR específicas de la invención.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva, el sistema de numeración de Kabat generalmente se usa cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, restos 1-107 de la región variable de cadena ligera y restos 1-113 de la región variable de cadena pesada) y el sistema de numeración EU para regiones
10 Fc (por ejemplo, Kabat et al., supra (1991)).

La presente invención proporciona un gran número de conjuntos de CDR diferentes. En este caso, un "conjunto de CDR completo" comprende las tres CDR ligeras variables y tres CDR pesadas variables, por ejemplo, una vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden
15 formar parte de un dominio ligero variable o pesado variable de mayor tamaño, respectivamente. Además, como se indica con más detalle en el presente documento, los dominios pesado variable y ligero variable pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas, cuando se usa una cadena
20 pesada y ligera (por ejemplo, cuando se usan Fab) o en una sola cadena polipeptídica en el caso de las secuencias de scFv.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión
25 a antígeno, o más específicamente sitio de unión a epítipo de los anticuerpos. "Epítipo" se refiere a un determinante que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como parátipo. Los epítopos son
30 agrupamientos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características

estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender restos de aminoácido
5 directamente implicados en la unión (también denominados componentes inmunodominantes del epítopo) y otros restos de aminoácido, que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácido que están bloqueados efectivamente por el péptido de unión a antígeno
10 específicamente; en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente.

Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos
15 yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por restos de aminoácido adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítopos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse en que la unión al
20 primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los anticuerpos que reconocen el
25 mismo epítopo pueden verificarse en un inmunoensayo sencillo que muestre la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, "binning".

La parte carboxi terminal de cada cadena define una
30 región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias

primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Basándose en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5^a edición, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporado en su totalidad por referencia).

En la subclase de inmunoglobulinas IgG, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria característica. Son de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada incluyendo, los dominios pesado constante (CH) y los dominios de bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, dominios "CH" en el contexto de las IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Como se muestra en el presente documento y se describe más adelante, las variantes de pI pueden estar en una o más de las regiones CH, así como en la región de bisagra, analizada más adelante.

Debe indicarse que las secuencias representadas en el presente documento empiezan en la región CH1, posición 118; las regiones variables no están incluidas excepto cuando se indica. Por ejemplo, el primer aminoácido de SEQ ID NO: 2, aunque se denomina posición "1" en el listado de

secuencias, corresponde a la posición 118 de la región CH1, de acuerdo con la numeración EU.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región de bisagra. Por "bisagra" o "región de bisagra" o "región de bisagra de anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en el presente documento se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el resto en la posición 237 EU. De esta manera, para la IgG, la bisagra de anticuerpo en el presente documento se define de manera que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, está incluida la bisagra inferior, haciendo referencia en general "bisagra inferior" a las posiciones 226 o 230. Como se indica en el presente documento, también pueden realizarse variantes de pI en la región de bisagra.

La cadena ligera en general comprende dos dominios, el dominio ligero variable (que contiene las CDR de cadena ligera y junto con los dominios pesados variables que forman la región Fv), y una región de cadena ligera constante (con frecuencia denominada CL o Ck).

Otra región de interés para sustituciones adicionales, indicadas más adelante, es la región Fc.

De esta manera, la presente invención proporciona diferentes dominios de anticuerpo. Como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica, los anticuerpos heterodiméricos de la invención comprenden

diferentes dominios dentro de las cadenas pesada y ligera, que pueden ser también solapantes. Estos dominios incluyen, pero sin limitación, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio de bisagra, el dominio constante pesado (CH1-bisagra-dominio Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3), el dominio pesado variable, el dominio ligero variable, el dominio constante ligero, dominios FAb y dominios scFv.

De esta manera, el "dominio Fc" incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio de bisagra. La cadena pesada comprende un dominio pesado variable y un dominio constante, que incluye un CH1-bisagra opcional-dominio Fc que comprende un CH2-CH3. La cadena ligera comprende una cadena ligera variable y el dominio constante ligero.

Algunas realizaciones de la invención comprenden al menos un dominio scFv, que, aunque no se produce de forma natural, generalmente incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, unidos entre sí por un enlazador de scFv. Como se muestra en el presente documento, hay varios enlazadores de scFv adecuados que pueden usarse, incluyendo enlaces peptídicos tradicionales generados por técnicas recombinantes.

El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes restos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal forma que asuman la conformación correcta una con respecto a la otra de forma que retenga la actividad deseada. En una realización, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 1 a 30

aminoácidos de longitud. En una realización, pueden usarse
enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, encontrando
utilidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 10
aminoácidos en algunas realizaciones. Los enlazadores
5 útiles incluyen polímeros de glicina-serina, incluyendo,
por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n y (GGGS)_n, donde n
es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a
4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-
serina y otros enlazadores flexibles. Como alternativa,
10 pueden encontrar utilidad como enlazadores, es decir pueden
encontrar uso como enlazadores una diversidad de polímeros
no proteicos, incluyendo pero sin limitación
polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol,
polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y
15 polipropilenglicol.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier
secuencia de cualquier longitud de dominio CL/CH1 pero no
todos los restos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los
primeros 5-12 restos de aminoácido de los dominios CL/CH1.
20 Los enlazadores pueden proceder de la cadena ligera de
inmunoglobulina, por ejemplo C_κ o C_λ. Los enlazadores
pueden proceder de cadenas pesadas de inmunoglobulina de
cualquier isotipo, incluyendo por ejemplo C_γ1, C_γ2, C_γ3,
C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε y C_μ. Las secuencias enlazadoras
25 también pueden proceder de otras proteínas tales como
proteínas de tipo Ig (por ejemplo TCR, FcR, KIR),
secuencias derivadas de regiones bisagra y otras secuencias
naturales de otras proteínas.

En algunas realizaciones, el enlazador es un
30 "enlazador de dominios", usado para unir dos dominios
cualesquiera como se indica en el presente documento.

Aunque puede usarse cualquier enlazador adecuado, muchas realizaciones utilizan un polímero de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n y (GGGS)_n, donde n es un número entero de al menos uno (y
5 generalmente de 3 a 4 a 5) así como cualquier secuencia peptídica que permita la unión recombinante de los dos dominios con una longitud y flexibilidad suficiente para permitir que cada dominio retenga su función biológica. En algunos casos, y prestando atención a la "capacidad de
10 emparejamiento", como se indica más adelante, pueden usarse enlazadores de dominio cargado, como se usa en algunas realizaciones de enlazadores de scFv.

En algunas realizaciones, el enlazador de scFv es un enlazador de scFv cargado, de los que se muestran varios en
15 la Figura 33. Por consiguiente, la presente invención proporciona además enlazadores de scFv cargados, para facilitar la separación en pI entre un primer y un segundo monómero. Es decir, mediante la incorporación de un enlazador de scFv cargado, positivo o negativo (o ambos, en
20 el caso de soportes que usan scFv en diferentes monómeros), esto permite que el monómero que comprende el enlazador cargado altere el pI sin realizar cambios adicionales en los dominios Fc. Estos enlazadores cargados pueden sustituirse en cualquier scFv que contenga enlazadores
25 estándar. De nuevo, como apreciarán los expertos en la materia, los enlazadores de scFv cargados usados en la "cadena" o monómero correcto, de acuerdo con los cambios deseados en pI. Por ejemplo, como se analiza en el presente documento, para realizar un anticuerpo heterodimérico en
30 formato F triple, se calcula el pI original de la región Fv de cada uno de los dominios de unión a antígeno deseado, y

se elige uno para fabricar un scFv, y dependiendo del pI, se eligen enlazadores positivos o negativos.

También pueden usarse enlazadores de dominio cargado para aumentar la separación de pI de los monómeros de la invención, y por lo tanto estos se incluyen en la Figura 33 y pueden usarse en cualquier realización del presente documento en la que se utilice un enlazador.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" en el presente documento se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variable y constante, incluyendo una o más modificaciones como se indican en el presente documento, particularmente en los dominios Fc para permitir la formación de heterodimerización o la purificación de heterodímeros de entre los homodímeros. Los anticuerpos de longitud completa generalmente incluyen dominios Fab y Fc y pueden contener además dominios de unión a antígeno extra tales como scFv, como se representa en general en las Figuras.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, siempre que contenga al menos un dominio constante que puede modificarse por ingeniería genética para producir heterodímeros, tales como ingeniería genética de pI. Otros fragmentos de anticuerpo que pueden usarse incluyen fragmentos que contienen uno o más de los dominios CH1, CH2, CH3 bisagra y CL de la invención que se han modificado por ingeniería genética de pI. Por ejemplo, las fusiones Fc son fusiones de la región Fc (CH2 y CH3, opcionalmente con la región de bisagra) fusionadas a otra proteína. En la técnica se conocen varias fusiones de Fc y

pueden mejorarse por la adición de las variantes de heterodimerización de la invención. En el presente caso, pueden realizarse fusiones de anticuerpos que comprenden CH1; CH1, CH2 y CH3; CH2; CH3; CH2 y CH3; CH1 y CH3, de las
5 que cualquiera o todas pueden realizarse opcionalmente con la región de bisagra, utilizando cualquier combinación de variantes de heterodimerización descritas en el presente documento.

En particular, los formatos representados en la Figura
10 1 son anticuerpos, denominados normalmente "anticuerpos heterodiméricos", lo que significa que la proteína tiene al menos dos secuencias de Fc asociadas autoensambladas en un dominio Fc heterodimérico.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ejemplo un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos que combinan regiones de más de una
20 especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden una o más regiones variables de un ratón (o rata en algunos casos) y la región o regiones constantes de un humano. "Anticuerpos humanizados" en general se refieren a anticuerpos no humanos que han
25 cambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo entero, excepto las CDR, se codifica por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR.
30 Las CDR, de las que algunas o todas se codifican por ácidos nucleicos que se han originado en un organismo no humano,

se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad se determina por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, todos incorporados en su totalidad por referencia. Con frecuencia se requiere una "retromutación" de restos marco aceptores seleccionados en los restos donadores correspondientes para volver a conseguir la afinidad que se pierde en las construcciones injertadas iniciales (documentos US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, todos incorporados en su totalidad por referencia). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando ratones con un sistema inmunitario modificado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654, incorporado en su totalidad por referencia. En la técnica se conocen bien una diversidad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y referencias citadas en el presente documento, todas incorporadas en su totalidad por referencia). Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitación, métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332: 323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:

1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:
10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035;
Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-9,
Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-9; Gorman et
5 al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185;
O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, todos
incorporados en su totalidad por referencia. La
humanización u otros métodos para reducir la
inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no
10 humanos pueden incluir métodos de modificación de
superficie, como se describe por ejemplo en Roguska et al.,
1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973, incorporado
en su totalidad por referencia. En una realización, el
anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se
15 conoce en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en
la estructura para la humanización y la maduración de
afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004,590.
Pueden emplearse métodos basados en selección para
humanizar y/o madurar la afinidad de regiones variables de
20 anticuerpos, incluyendo pero sin limitación los métodos
descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294: 151-162;
Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684;
Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618;
Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-
25 8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10): 753-
759, todos incorporados en su totalidad por referencia.
Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de
únicamente partes de las CDR, incluyendo pero sin
limitación los métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et
30 al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al.,

2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, todos incorporados en su totalidad por referencia.

IV. Anticuerpos heterodiméricos

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se basan en el uso de dos secuencias Fc variantes de cadena pesada diferentes, que se autoensamblarán para formar dominios Fc heterodiméricos y anticuerpos heterodiméricos.

La presente invención se refiere a nuevas construcciones para proporcionar anticuerpos heterodiméricos que permiten la unión a más de un antígeno o ligando, por ejemplo, para permitir la unión biespecífica. Las construcciones de anticuerpo heterodimérico se basan en la naturaleza de autoensamblamiento de los dos dominios Fc de las cadenas pesadas de los anticuerpos, por ejemplo dos "monómeros" que se ensamblan formando un "dímero". Los anticuerpos heterodiméricos se obtienen alterando la secuencia de aminoácidos de cada monómero como se analiza con más detalle más adelante. De esta manera, la presente invención generalmente se dirige a la creación de anticuerpos heterodiméricos que pueden acoplarse conjuntamente a antígenos de varias formas, basándose en las variantes de aminoácidos en las regiones constantes que son diferentes en cada cadena para promover la formación heterodimérica y/o facilitar la purificación de los heterodímeros de entre los homodímeros.

De esta manera, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos. Un problema en curso en las tecnologías de anticuerpos es el deseo de anticuerpos

"bienespecíficos" que se unan a dos antígenos diferentes de forma simultánea, permitiendo de esta forma en general que los diferentes antígenos estén próximos y den como resultado nuevas funcionalidades y nuevas terapias. En general, estos anticuerpos se obtienen incluyendo genes de cada cadena pesada y ligera en las células hospedadoras. Esto generalmente da como resultado la formación del heterodímero deseado (A-B), así como los dos homodímeros (A-A y B-B (sin incluir los elementos heterodiméricos de cadena ligera)). Sin embargo, un obstáculo importante en la formación de anticuerpos bienespecíficos es la dificultad de purificar los anticuerpos heterodiméricos de entre los anticuerpos homodiméricos y/o desviar la formación del heterodímero con respecto a la formación de los homodímeros.

Hay varios mecanismos que pueden usarse para generar los heterodímeros de la presente invención. Además, como apreciarán los expertos en la materia, estos mecanismos pueden combinarse para asegurar una alta heterodimerización. De esta manera, las variantes de aminoácidos que conducen a la producción de heterodímeros se denominan "variantes de heterodimerización". Como se analiza más adelante, las variantes de heterodimerización pueden incluir variantes estéricas (por ejemplo, las variantes de "llave y cerradura" o "sesgadas" descritas más adelante y las variantes de "pares de carga" descritas más adelante) así como "variantes de pI", lo cual permite la purificación de homodímeros de entre los heterodímeros. Como se describe en general en el documento WO2014/145806, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad y como se indica específicamente más adelante

para la discusión de "variantes de heterodimerización", los mecanismos útiles para la heterodimerización incluyen variantes de "llave y cerradura" ("KIH"; algunas veces en el presente documento como variantes "sesgadas" (véase la discusión en el documento WO2014/145806), "dirección electroestática" o "pares de carga" como se describe en el documento WO2014/145806, variantes de pI como se describe en el documento WO2014/145806, y variantes de Fc adicionales generales como se indica en el documento WO2014/145806 y más adelante.

En la presente invención, hay varios mecanismos básicos que pueden facilitar la purificación de anticuerpos heterodiméricos; uno se basa en el uso de variantes de pI, de tal forma que cada monómero tiene un pI diferente, permitiendo de esta manera la purificación isoeléctrica de proteínas dimericas A-A, A-B y B-B. Como alternativa, algunos formatos de armazón, tales como el formato "triple F", también permiten la separación basándose en el tamaño. Como se indica adicionalmente más adelante, también es posible "desviar" la formación de heterodímeros con respecto a los homodímeros. De esta manera, una combinación de variantes de heterodimerización estéricas y variantes de pI o de par de carga encuentran utilidad particular en la invención.

En general, las realizaciones de uso particular en la presente invención se basan en conjuntos de variantes que incluyen variantes de sesgo, que promueven la formación de heterodimerización con respecto a la formación de homodimerización, junto con variantes de pI, que aumentan la diferencia de pI entre los dos monómeros.

Además, como se indica con más detalle más adelante, dependiendo del formato del anticuerpo de heterodímero, las variantes de pI pueden estar contenidas dentro de los dominios constante y/o Fc de un monómero, o pueden usarse
5 enlazadores cargados, enlazadores de dominio o enlazadores de scFv. Es decir, los armazones que utilizan scFv tales como el formato Triple F pueden incluir enlazadores de scFv cargados (positivos o negativos), que proporcionan un refuerzo de pI adicional con fines de purificación. Como
10 apreciarán los expertos en la materia, algunos formatos Triple F son útiles con enlazadores de scFv cargados y sin ajustes de pI adicionales, aunque la invención proporciona variantes de pI que están en uno o los dos monómeros, y/o también enlazadores de dominio cargado. Además, una
15 modificación por ingeniería genética de aminoácidos adicional para funcionalidades alternativas también puede conferir cambios de pI, tales como variantes de Fc, FcRn y KO.

La presente invención que utiliza pI como mecanismo de
20 separación para permitir la purificación de proteínas heterodiméricas, pueden introducirse variantes de aminoácidos en uno o los dos polipéptidos del monómero; es decir, el pI de uno de los monómeros (denominado en el presente documento por simplificar "monómero A") puede
25 modificarse por ingeniería genética de manera que sea distinto del del monómero B, o pueden cambiarse tanto el monómero A como el monómero B, aumentándose el pI del monómero A y reduciéndose el pI del monómero B. Como se indica con más detalle más adelante, los cambios de pI de
30 uno o los dos monómeros pueden realizarse retirando o añadiendo un resto cargado (por ejemplo, un aminoácido

neutro se reemplaza por un resto de aminoácido cargado positiva o negativamente, por ejemplo glicina por ácido glutámico), cambiando un resto cargado de positivo o negativo a la carga opuesta (ácido aspártico por lisina) o cambiando un resto cargado por un resto neutro (por ejemplo pérdida de carga, lisina por serina). En las Figuras se muestran varias de estas variantes.

Por consiguiente, esta realización de la presente invención permite crear un cambio suficiente en el pI en al menos uno de los monómeros de tal forma que los heterodímeros puedan separarse de los homodímeros. Como apreciarán los expertos en la materia y como se analiza más adelante adicionalmente, esto puede hacerse usando una región constante de cadena pesada "de tipo silvestre" y una región variante que se haya modificado por ingeniería genética para aumentar o disminuir su pI (wt A-+B o wt A- - B), o aumentando una región y reduciendo la otra región (A+ -B- o A- B+).

De esta manera, en general, un componente de algunas realizaciones de la presente invención son variantes de aminoácido en las regiones constantes de anticuerpos que se dirigen para alterar el punto isoeléctrico (pI) de al menos uno, si no los dos, monómeros de una proteína dimérica para formar "anticuerpos de pI") incorporando sustituciones de aminoácidos ("variantes de pI" o "sustituciones de pI") en uno o los dos monómeros. Como se muestra en el presente documento, la separación de los heterodímeros de los dos homodímeros puede realizarse si los pI de los dos monómeros difieren en una cantidad tan pequeña como 0.1 unidades de pH, encontrando utilidad en la presente invención diferencias de 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 o mayores.

Como apreciarán los expertos en la materia, el número de variantes de pI a incluir en cada uno o los dos monómeros para conseguir una buena separación dependerá en parte del pI de partida de los componentes, por ejemplo en el formato triple F, el pI de partida del scFv y Fab de interés. Es decir, para determinar que monómero modificar por ingeniería genética o en que "dirección" (por ejemplo, más positivo o más negativo), las secuencias de Fv de los dos antígenos diana se calculan y se toma una decisión a partir de esto. Como se conoce en la técnica, los diferentes Fv tendrán diferentes pI de partida que se explotan en la presente invención. En general, como se indica en el presente documento, los pI se modifican por ingeniería genética para dar como resultado una diferencia de pI total de cada monómero de al menos aproximadamente 0.1 log, siendo preferido de 0.2 a 0.5 como se indica en el presente documento.

Además, como apreciarán los expertos en la materia y como se indica en el presente documento, en algunas realizaciones, los heterodímeros pueden separarse de los homodímeros basándose en el tamaño. Como se muestra en las Figuras 1, por ejemplo, varios de los formatos permiten la separación de heterodímeros y homodímeros basándose en el tamaño.

En el caso en el que se usan variantes de pI para conseguir la heterodimerización, mediante el uso de la región o regiones constantes de la cadena o cadenas pesadas, se proporciona un enfoque más modular par diseñar y purificar proteínas biespecíficas, incluyendo anticuerpos. De esta manera, en algunas realizaciones, no se incluyen variantes de heterodimerización (incluyendo

variantes de heterodimerización de sesgo y purificación) en las regiones variables, de tal forma que cada anticuerpo individual debe modificarse por ingeniería genética. Además, en algunas realizaciones, la posibilidad de
5 inmunogenicidad resultante de las variantes de pI se reduce significativamente al importar variantes de pI de diferentes isotipos de IgG de tal forma que el pI se cambia sin introducir una inmunogenicidad significativa. De esta manera, un problema adicional a solucionar es el
10 esclarecimiento de dominios constantes de bajo pI con un alto contenido de secuencia humana, por ejemplo, la minimización o evitación de restos no humanos en cualquier posición particular.

Un efecto beneficioso secundario que puede producirse
15 con esta ingeniería genética de pI es también la extensión de la semivida en suero y el aumento de la unión a FcRn. Es decir, como se describe en USSN 13/194,904 (incorporado por referencia en su totalidad), la reducción del pI de dominios constantes de anticuerpo (incluyendo los
20 encontrados en anticuerpos y fusiones de Fc) pueden conducir a una mayor retención en suero *in vivo*. Estas variantes de pI para aumentar la semivida en suero también facilitan cambios de pI para la purificación.

Además, debe indicarse que las variantes de pI de las
25 variantes de heterodimerización proporcionan un efecto beneficioso adicional para la analítica y el proceso de control de calidad de los anticuerpos biespecíficos, ya que la capacidad de eliminar, minimizar y distinguir cuando están presentes homodímeros es significativa. De forma
30 similar, la capacidad de ensayar de forma fiable la

reproducibilidad de la producción de anticuerpos heterodiméricos es importante.

Variantes de heterodimerización

La presente invención proporciona proteínas
5 heterodiméricas, incluyendo anticuerpos heterodiméricos en una diversidad de formatos, que utilizan variantes heterodiméricas para permitir la formación heterodimérica y/o la purificación de entre los homodímeros.

Hay varios pares adecuados de conjuntos de variantes
10 de sesgo de heterodimerización. Estas variantes vienen en "pares" de "conjuntos". Es decir, un conjunto del par se incorporar en el primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora en el segundo monómero. Debe tenerse en cuenta que estos conjuntos no se comportan necesariamente como
15 variantes de "llave en cerradura", con una correspondencia de uno a uno entre un resto en un monómero y un resto en el otro; es decir, estos pares de conjuntos forman una interfaz entre los dos monómeros que promueve la formación de heterodímeros y reduce la formación de homodímeros, permitiendo que el porcentaje de heterodímeros que se
20 forman espontáneamente en condiciones biológicas sea mayor del 90 %, en lugar del 50 % esperado (25 % homodímero A/A:50 % heterodímero A/B:25 % homodímero B/B).

Variantes estéricas

25 En algunas realizaciones, la formación de heterodímeros puede facilitarse por la adición de variantes estéricas. Es decir, cambiando aminoácidos en cada cadena pesada, es más probable que cadenas pesadas diferentes se asocien para formar la estructura heterodimérica que para
30 formar homodímeros con las mismas secuencias de aminoácidos

de Fc. En la Figura 29 se incluyen variantes estéricas adecuadas.

Un mecanismo se denomina en general en la técnica "llaves y cerraduras", que se refiere a que también puede
5 usarse opcionalmente la modificación por ingeniería genética de aminoácidos que crea influencias estéricas para favorecer la formación heterodimérica y desfavorecer la formación homodimérica; esto se denomina algunas veces "llaves y cerraduras", como se describe en USSN 61/596,846,
10 Ridgway et al., Protein Engineering 9(7): 617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270: 26; Patente de Estados Unidos n.º 8,216,805, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Las Figuras identifican varios pares de
15 "monómero A - monómero B" que se basan en "llaves y cerraduras". Además, como se describe en Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677 (1998), estas mutaciones de "llave y cerradura" pueden combinarse con enlaces disulfuro para desviar la formación hacia la heterodimerización.

20 Un mecanismo adicional que encuentra utilidad en la generación de heterodímeros algunas veces se denomina "dirección electroestática" como se describe en Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25): 19637 (2010), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.
25 Esto algunas veces se denomina en el presente documento "pares de carga". En esta realización, se usan cargas electroestáticas para desviar la formación hacia la heterodimerización. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede tener también un efecto sobre el pI, y
30 por lo tanto sobre la purificación, y de esta manera en algunos casos también podrían considerarse variantes de pI.

Sin embargo, como estas se generaron para forzar la heterodimerización y no se usaron como herramientas de purificación, se clasifican como "variantes estéricas". Estas incluyen pero sin limitación, D221E/P228E/L368E
5 emparejado con D221R/P228R/K409R (por ejemplo, estos son "conjuntos correspondientes a monómeros") y C220E/P228E/368E emparejado con C220R/E224R/P228R/K409R.

Otras variantes de monómero A y monómero B adicionales que pueden combinarse con otras variantes, opcional e
10 independientemente en cualquier cantidad, tales como variantes de pI indicadas en el presente documento u otras variantes estéricas que se muestran en la Figura 37 del documento US 2012/0149876, cuyas figuras y leyendas y SEQ ID NO se incorporan expresamente por referencia en el
15 presente documento.

En algunas realizaciones, las variantes estéricas indicadas en el presente documento pueden incorporarse de forma opcional e independiente con cualquier variante de pI (u otras variantes tales como variantes de Fc, variantes de
20 FcRn etc.) en uno o los dos monómeros, y pueden incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de las proteínas de la invención.

En la Figura 29 se encuentra una lista de variantes de sesgo adecuadas, mostrando la Figura 34 algunos pares de
25 utilidad particular en muchas realizaciones. Son de uso particular en muchas realizaciones los pares de conjuntos que incluyen, pero sin limitación, S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S:
30 S364K/E357Q. En términos de nomenclatura, el par "S364K/E357Q: L368D/K370S" significa que uno de los

monómeros tiene el conjunto doble variante S364K/E357Q y el otro tiene el conjunto doble variante L368D/K370S.

Variantes de pI (punto isoeléctrico) para heterodímeros

5 En general, como apreciarán los expertos en la materia, hay dos categorías generales de variantes de PI: las que aumentan el pI de la proteína (cambios básicos) y las que reducen en pI de la proteína (cambios ácidos). Como se describe en el presente documento, pueden realizarse
10 todas las combinaciones de estas variantes: un monómero puede ser de tipo silvestre, o una variante que no presenta un pI significativamente diferente del tipo silvestre, y el otro puede ser más básico o más ácido. Como alternativa, cada monómero se cambia, uno a más básico y otro a más
15 ácido.

En la Figura 30 se muestran combinaciones preferidas de variantes de pI. Como se indica en el presente documento y se muestra en las figuras, estos cambios se muestran con respecto a IgG1, pero todos los isotipos pueden alterarse
20 de esta manera, así como híbridos de isotipo. En el caso en el que el dominio constante procede de IgG2-4, también puede usarse R133E y R133Q.

Heterodímeros de anticuerpo variantes de cadena ligera

En el caso de heterodímeros basados en anticuerpos, por ejemplo, en los que al menos uno de los monómeros
25 comprende una cadena ligera además del dominio de cadena pesada, también pueden realizarse variante de pI en la cadena ligera. Las sustituciones de aminoácidos para reducir el pI de la cadena ligera incluyen, pero sin limitación K126E, K126Q, K145E, K145Q, N152D, S156E, K169E,
30 S202E, K207E y la adición del péptido DEDE en el extremo c

de la cadena ligera. Los cambios en esta categoría basados en la cadena ligera lambda constante incluyen una o más sustituciones en R108Q, Q124E, K126Q, N138D, K145T y Q199E. Además, también puede aumentarse el pI de las cadenas ligeras.

Variantes isotópicas

Además, muchas realizaciones de la invención se basan en la "importación" de aminoácidos de pI en posiciones particulares de un isotipo de IgG en otro, reduciéndose o eliminándose de esta manera la posibilidad de introducir inmunogenicidad indeseada en las variantes. Se muestran varias de estas en la Figura 21 de la Publicación de Estados Unidos 2014/0370013, incorporada en el presente documento por referencia. Es decir, la IgG1 es un isotipo común para anticuerpos terapéuticos por una diversidad de razones, incluyendo una alta función efectora. Sin embargo, la región constante pesada de IgG1 tiene un mayor pI que la de IgG2 (8.10 frente a 7.31). Mediante la introducción de restos de IgG2 en posiciones particulares en el esqueleto de IgG1, se reduce (o se aumenta) el pI del monómero resultante y presenta adicionalmente una mayor semivida en suero. Por ejemplo, IgG1 tiene una glicina (pI 5.97) en la posición 137, e IgG2 tiene un ácido glutámico (pI 3.22); la importación del ácido glutámico afectará al pI de la proteína resultante. Como se describe más adelante, generalmente se requieren varias sustituciones de aminoácidos para afectar de forma significativa al pI del anticuerpo variante. Sin embargo, debe indicarse como se analiza más adelante que incluso cambios en las moléculas de IgG2 permiten una mayor semivida en suero.

En otras realizaciones, se realizan cambios de aminoácidos no isotópicos, para reducir el estado de carga total de la proteína resultante (por ejemplo, cambiando un aminoácido de mayor pI por un aminoácido de menor pI) o
5 para permitir acomodaciones en la estructura para conseguir estabilidad, etc., como se describe adicionalmente más adelante.

Además, mediante la modificación del pI por ingeniería genética de los dominios constantes tanto ligero como
10 pesado, pueden verse cambios significativos en cada monómero del heterodímero. Como se analiza en el presente documento, si los pI de los dos monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico, u otros
15 métodos sensibles al punto isoeléctrico.

Cálculo del pI

El pI de cada monómero puede depender del pI del dominio constante de cadena pesada variante y el pI del monómero total, incluyendo el dominio constante de cadena
20 pesada variante y el compañero de fusión. De esta manera, en algunas realizaciones, el cambio de pI se calcula basándose en el dominio constante de cadena pesada variante, usando el esquema de la Figura 19 de la Publicación de Estados Unidos 2014/0370013. Como se analiza
25 en el presente documento, cada monómero a modificar por ingeniería genética generalmente se decide por el pI intrínseco de las regiones Fv y armazón. Como alternativa, el pI de cada monómero puede compararse.

Variantes de pI que también confieren mejor unión a
30 FcRn *in vivo*

En el caso en el que la variante de pI reduce el pI del monómero, pueden tener el efecto beneficioso añadido de mejorar la retención en suero *in vivo*.

Aunque aún se está examinando, se cree que las
5 regiones Fc tienen mayores semividas *in vivo*, por que la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma se encuentra la región Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, incorporado en su totalidad por referencia). El compartimento endosómico después recicla el Fc a la
10 superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al espacio extracelular, el mayor pH, ~7.4, induce la liberación de Fc de nuevo a la sangre. En ratones, Dall'Acqua et al. mostraron que mutantes de Fc con mayor unión a FcRn a pH 6 y pH 7.4 realmente tenían concentraciones en
15 suero reducidas y la misma semivida que el Fc de tipo silvestre (Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180, incorporado en su totalidad por referencia). La mayor afinidad de Fc por FcRn a pH 7.4 se cree que impide la liberación del Fc de nuevo a la sangre. Por lo tanto, las
20 mutaciones de Fc que aumentarán la semivida de Fc *in vivo* idealmente aumentarán la unión de FcRn a menor pH mientras que se permite la liberación de Fc a mayor pH. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el intervalo de pH de 6.0 a 7.4. Por lo tanto, no es
25 sorprendente encontrar restos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn.

Recientemente se ha sugerido que anticuerpos con regiones variables que tienen puntos isoeléctricos menores también pueden tener mayores semivida en suero (Igawa et al., 2010 PEDS. 23(5): 385-392, incorporado en su totalidad
30 por referencia). Sin embargo, el mecanismo de esto aún no

se entiende bien. Además, las regiones variables difieren de un anticuerpo a otro. Las variantes de región constante con pI reducido y una semivida prolongada proporcionarían un enfoque más modular para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos, como se describe en el presente documento.

Otras variantes de Fc para una funcionalidad adicional

Además de las variantes de aminoácidos de pI, hay varias modificaciones de aminoácidos de Fc útiles que pueden realizarse por una diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitación, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR, alterar la unión a receptores FcRn, etc.

Por consiguiente, las proteínas de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos, incluyendo las variantes de heterodimerización indicadas en el presente documento, que incluye las variantes de pI y variantes estéricas. Cada conjunto de variantes puede incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de cualquier proteína heterodimérica particular.

Variantes de FcγR

Por consiguiente, hay varias sustituciones de Fc útiles que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Pueden ser útiles sustituciones que den como resultado una mayor unión así como una menor unión. Por ejemplo, se sabe que la mayor unión a Fc RIIIa generalmente da como resultado una mayor ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y

posteriormente producen la lisis de la célula diana). De forma similar, la unión reducida a FcγRIIb (un receptor inhibidor) puede ser beneficiosa también en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que encuentran utilidad en la presente invención incluyen las indicadas en USSN 11/124,620 (particularmente en la Figura 41), 11/174,287, 11/396,495, 11/538,406, todos los cuales se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad y específicamente para las variantes desveladas en el presente documento. Las variantes particulares que encuentran utilidad incluyen, pero sin limitación, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T.

Además, hay sustituciones de Fc adicionales que encuentran utilidad para aumentar la unión al receptor FcRn y aumentar la semivida en suero, como se desvela específicamente en USSN 12/341,769, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad, incluyendo, pero sin limitación 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I o V/434S, 436V/428L y 259I/308F/428L.

Variantes de ablación

De forma similar, otra categoría de variantes funcionales son las "variantes de ablación de FcγR" o "variantes knock out de Fc(FcKO o KO)". En estas realizaciones, para algunas aplicaciones terapéuticas, es deseable reducir o eliminar la unión normal del dominio Fc a uno o más o a todos los receptores de Fcγ (por ejemplo FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar

mecanismos de acción adicionales. Es decir, por ejemplo, en muchas realizaciones, particularmente en el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 de forma monovalente, generalmente es deseable anular la unión a FcγRIIIa para eliminar o reducir significativamente la actividad ADCC, en donde uno de los dominios Fc comprende una o más variantes de ablación del receptor de Fcγ. Estas variantes de ablación se representan en la Figura 31 y cada una puede incluirse o excluirse independiente y opcionalmente, utilizando los aspectos preferidos variantes de ablación seleccionadas del grupo que consiste en G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del. Debe tenerse en cuenta que las variantes de ablación mencionadas en el presente documento anular la unión a FcγR, pero generalmente no anulan la unión a FcRn.

Combinación de variantes heterodiméricas y de Fc

Como apreciarán los expertos en la materia, todas las variantes de heterodimerización mencionadas (incluyendo variantes de sesgo y/o pI) pueden combinarse opcional e independientemente de cualquier manera, siempre que conserven su "capacidad de emparejamiento" o "partición de monómeros". Además, todas estas variantes pueden combinarse en cualquiera de los formatos de heterodimerización.

En el caso de variantes de pI, aunque en las Figuras se muestran realizaciones que encuentran utilidad particular, pueden generarse otras combinaciones, siguiendo

la norma básica de alterar la diferencia de pI entre dos monómeros para facilitar la purificación.

Además, cualquiera de las variantes de heterodimerización, sesgo y pI también se combinan de forma independiente y opcional con variantes de anulación de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como se indica en general en el presente documento.

Formatos útiles de la invención

Como apreciarán los expertos en la materia y analizarán con más detalle más adelante, las proteínas de fusión heterodiméricas de la presente invención pueden tener una amplia diversidad de configuraciones, como se representa en general en las Figuras 1. Algunas figuras representan configuraciones "de un solo extremo", en las que hay un tipo de especificidad en un "brazo" de la molécula y una especificidad diferente en el otro "brazo". Otras figuras representan configuraciones de "doble extremo", en las que hay al menos un tipo de especificidad en la "parte superior" de la molécula y una o más especificidades diferentes en la "parte inferior" de la molécula. De esta manera, la presente invención se dirige a nuevas composiciones de inmunoglobulina que se acoplan conjuntamente a un primer y un segundo antígeno diferente.

Como apreciarán los expertos en la materia, los formatos heterodiméricos de la invención pueden tener diferentes valencias así como pueden ser biespecíficos. Es decir, los anticuerpos heterodiméricos de la invención pueden ser bivalentes y específicos, en donde un antígeno tumoral diana (por ejemplo CD3) se une por un dominio de unión y el otro antígeno tumoral diana (por ejemplo ~~CD20~~, ~~CD19~~, ~~CD38~~, CD123, etc.) se une por un segundo dominio de

unión. Los anticuerpos heterodiméricos también pueden ser trivalentes y biespecíficos, en donde el primer antígeno se une por dos dominios de unión y el segundo antígeno por un segundo dominio de unión. Como se indica en el presente documento, cuando CD3 es uno de los antígenos diana, es preferible que CD3 se una solo de forma monovalente, para reducir los posibles efectos secundarios.

La presente invención utiliza dominios de unión a antígeno anti-CD3 en combinación con dominios de unión a antígeno anti-antígeno tumoral diana (TTA). Como apreciarán los expertos en la materia, puede usarse cualquier colección de anti-CDR de CD3, anti-dominios pesados variables y ligeros variables de CD3, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras (véanse en particular las Figuras 2 a 7, y la Figura 68). De forma similar, puede usarse cualquier de los dominios de unión a antígeno anti-TTA, por ejemplo, los dominios de unión a antígeno ~~anti-CD38 anti-CD20 y anti-CD19 y~~ anti-CD123, ya sean CDR, dominios ligeros variables o dominios pesados variables, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras, opcional e independientemente combinados en cualquier combinación.

Formato de abridor de botella

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato de armazón "triple F" o "abridor de botella" como se muestra en la Figura 1A, A y B. En esta realización, una cadena pesada del anticuerpo contiene un Fv monocatenario ("scFv", como se define más adelante) y la otra cadena pesada es un formato FAb "regular", que comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera. Esta estructura algunas veces

se denomina en el presente documento formato "triple F" (scFv-FAb-Fc) o formato "abridor de botella", debido a la similitud visual general a un abridor de botellas (véase las Figuras 1). Las dos cadenas se juntan mediante el uso de variantes de aminoácido en las regiones constantes (por ejemplo, el dominio Fc, el dominio CH1 y/o la región de bisagra) que promueven la formación de anticuerpos heterodiméricos como se describe con más detalle más adelante.

Hay varias ventajas distintas en el presente formato "triple F". Como se conoce en la técnica, los análogos de anticuerpo que se basan en dos construcciones de scFv con frecuencia tienen problemas de estabilidad y de agregación, que pueden aliviarse en la presente invención mediante la adición de un par de cadena ligera y pesada "regular". Además, a diferencia de los formatos que se basan en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, no hay problemas con el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, emparejamiento pesada 1 con ligera 2, etc.).

Muchas de las realizaciones indicadas en el presente documento se basan en general en el formato de abridor de botella que comprende un primer monómero que comprende un scFv, que comprende un dominio pesado variable y ligero variable, unidos covalentemente usando un enlazador de scFv (cargado, en muchos pero no en todos los casos), donde el scFv está unido covalentemente al extremo N de un primer dominio Fc normalmente a través de un enlazador de dominios (que, como se indica en el presente documento, puede estar sin carga o cargado). El segundo monómero del formato de

abridor de botella es una cadena pesada y la composición comprende además una cadena ligera.

En general, en muchas realizaciones preferidas, el scFv es el dominio que se une al CD3, uniéndose el Fab de las cadenas pesada y ligera al otro TTA. Además, los dominios Fc de la invención generalmente comprenden variantes de sesgo (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en la Figura 29 y Figura 34, seleccionándose las variantes de sesgo particularmente útiles del grupo que consiste en S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q), opcionalmente variantes de ablación (incluyendo las mostradas en la Figura 31), opcionalmente enlazadores de scFv cargados (incluyendo los mostrados en la Figura 33) y la cadena pesada comprende variantes de pI (incluyendo las mostradas en la Figura 30).

La presente invención proporciona formatos de abridor de botella en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD38 en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras, incluyendo las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD19 en los~~

~~que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

Formato mAb-Fv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de una unión C-terminal de un dominio pesado variable "extra" a un monómero y la unión C-terminal de un dominio ligero variable "extra" al otro monómero, formándose así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio de scFv "extra" se une a CD3.

En esta realización, el primer monómero comprende una primera cadena pesada, que comprende un primer dominio pesado variable y un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio de Fc, con un primer dominio ligero variable unido covalentemente al extremo C del primer dominio de Fc usando un enlazador de dominios. El segundo monómero comprende un segundo dominio pesado variable del segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio Fc, y un tercer dominio pesado variable unido covalentemente al extremo C del segundo dominio Fc usando un enlazador de dominios. Los dos dominios variables unidos por el extremo C terminal constituyen un scFv que se une a CD3. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas

pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

mAb-scFv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se

basa en el uso de una unión C-terminal de un scFv a uno de los monómeros, formándose así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. De esta manera, el primer monómero comprende una primera cadena pesada (que comprende un dominio pesado variable y un dominio constante), con un scFv unido covalentemente en el extremo C-terminal que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv
5 que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

10 Central scFv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-scFv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de un dominio scFv insertado
15 formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros, proporcionando así un
20 tercer dominio de unión a antígeno.

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador
25 de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio
30 ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab

idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos Central-scFv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Formato Central-Fv

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato

se basa en el uso de un dominio scFv insertado formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv "extra" se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de los monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde cada monómero contiene un componente del scFv (por ejemplo, un monómero comprende un dominio pesado variable y el otro un dominio ligero variable).

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, y un dominio ligero variable adicional. El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. El otro monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y dominio Fc, y un dominio pesado variable adicional. El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios.

Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos Central-Fv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos Central-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos Central-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Un central-scFv armado

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es un formato central-scFv armado mostrado en la Figura 1. En esta realización, un monómero comprende solo un dominio Fc, mientras que el otro monómero usa un dominio scFv insertado formando así el segundo dominio de unión a antígeno. En este formato, la parte Fab se une a un TTA y el scFv se une a CD3 o viceversa. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros.

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv está
5 unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. El segundo monómero comprende un dominio Fc. Esta realización utiliza además
10 una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con la cadena pesada para formar un Fab. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pI, variantes de
15 ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos central-scFv con un brazo donde las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la
20 Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

~~La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

5 La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Formatos scFv dobles

La presente invención también proporciona formatos scFv dobles como se muestra en la técnica y se muestra en la Figura 1.

15 La presente invención proporciona formatos de scFv dobles en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

~~La presente invención proporciona formatos de scFv dobles en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.~~

~~La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.~~

25 ~~La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.~~

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD123 en los que

las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de ablación como se muestran en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

Antígenos diana

Los anticuerpos biespecíficos de la invención tienen dos dominios de unión al antígeno diferentes: uno que se une a CD3 (generalmente de forma monovalente) y otro que se une a un antígeno tumoral diana (algunas veces denominado en el presente documento "TTA"). Los antígenos tumorales diana adecuados incluyen, pero sin limitación ~~CD20, CD38,~~ CD123; ROR1, ROR2, BCMA; PSMA; SSTR2; SSTR5, ~~CD19,~~ FLT3, CD33, PSCA, ADAM 17, CEA, Her2, EGFR, EGFR-vIII, CD30, FOLR1, GD-2, CA-IX, Trop-2, CD70, ~~CD38,~~ mesotelina, EphA2, CD22, CD79b, GPNMB, CD56, CD138, CD52, CD74, CD30, CD123, RON, ERBB2, y EGFR.

El formato "triple F" es particularmente beneficioso para dirigirse a dos (o más) antígenos distintos. (Como se indica en el presente documento, esta dirección puede ser cualquier combinación de unión monovalente y divalente, dependiendo del formato). De esta manera, las inmunoglobulinas del presente documento preferentemente se acoplan conjuntamente a dos antígenos distintos. La especificidad de cada monómero puede seleccionarse de las listas presentadas en el presente documento. En la Figura 1 se muestran formatos biespecíficos útiles adicionales para uso con un dominio de unión anti-CD3.

Son aplicaciones adecuadas particulares de los anticuerpos heterodiméricos del presente documento pares co-diana para los que es beneficioso o crítico que cada antígeno diana se acople de forma monovalente. Dichos antígenos pueden ser, por ejemplo, receptores inmunitarios que se activan tras la formación de complejos inmunitarios. La activación celular de muchos receptores inmunitarios se produce solo por reticulación, lo que se consigue típicamente por complejos inmunitarios anticuerpo/antígeno, o mediante el acoplamiento de células efectoras a células diana. Para algunos receptores inmunitarios, por ejemplo, el receptor de señalización CD3 en células T, la activación es crítica únicamente tras el acoplamiento con la diana co-acoplada, ya que la reticulación no específica en una situación clínica puede inducir una tormenta de citocinas y toxicidad. Desde el punto de vista terapéutico, mediante el acoplamiento de dichos antígenos de forma monovalente en lugar de en forma multivalente, usando las inmunoglobulinas del presente documento, dicha activación se produce solo en respuesta a la reticulación solo en el microentorno del antígeno diana primario. La capacidad de dirigirse a dos antígenos diferentes con diferentes valencias es un aspecto nuevo y útil de la presente invención. Los ejemplos de antígenos diana para los que puede ser terapéuticamente beneficioso o necesario el co-acoplamiento de forma monovalente incluyen, pero sin limitación, receptores de activación inmunitaria tales como CD3, FcγR, receptores de tipo toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y receptores de quimiocinas. En muchas realizaciones, uno de los sitios de

unión a antígeno se une a CD3 y en algunas realizaciones es el monómero que contiene scFv.

Prácticamente cualquier antígeno puede fijarse como diana por las inmunoglobulinas del presente documento, incluyendo pero sin limitación, proteínas, subunidades, dominios, motivos y/o epítomos que pertenecen a la siguiente lista de antígenos diana, que incluye tanto factores solubles tales como citocinas como factores unidos a la membrana, incluyendo receptores transmembrana: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, A1 Receptor de Adenosina, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPARTIC, Factor natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neutrotrífico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor del complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario(CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L,

Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, 5 CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, ~~CD19~~, ~~CD20~~, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, 10 CD32, CD33 (p67 proteins), CD34, ~~CD38~~, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de Clostridium botulinum, toxina de 15 Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, 20 CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor de aceleración de la Degradación, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 de cerebro), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, 25 ENA, receptor de endotelina, Encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxinal, EpCAM, Efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor IIa, Factor VII, Factor VIIIC, Factor IX, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, 30 FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimuladora del Folículo, Fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3,

FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, 5 GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GITR, Glucagón, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de hormona de crecimiento Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de la envuelta de gB de HCMV, HCMV) 10 glicoproteína de la envuelta de gH, UL de HCMV, factor de crecimiento Hemopoyético (HGF), gp120 de Hep B, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína gB del virus del herpes simple (HSV), glicoproteína gD de HSV, HGFA, antígeno asociado a melanoma 15 de alto peso molecular (HMW-MAA), gp120 de HIV, bucle V3 de gp 120 de HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de 20 IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, cadena A de Insulina, 25 cadena B de Insulina, factor de crecimiento similar a Insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina 30 beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6,, Calicreína 11, Calicreína 12,

Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR, Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1 Latente, TGF-1 bpl Latente, LBP, LDGF, 5 LECT2, Lefty, antígeno Y de Lewis, antígeno relacionado con Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Surfactante pulmonar, hormona Luteinizante, Receptor Beta de Linfotoxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, 10 MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, receptor de MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora 15 Muelleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4 o -6, Neurturina, factor de crecimiento Neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona 20 Paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PlGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, Proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata 25 (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de Relaxina, cadena B de Relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, factores Reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, albúmina Sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, 30 SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína-72 asociada a

tumores), TARC, TCA-3, receptores de células T (por ejemplo, receptor alfa/beta de células T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Específico, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de Timo, hormona estimuladora del Tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Factor Tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (Ligando TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (Ligando TRANCE/RANK ODF, Ligando OPG), TNFSF12 (Ligando TWEAK Apo-3, Ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (Ligando LIGHT HVEM), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (Ligando GITR Ligando AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4

(Ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (Ligando CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Ligando Fas Ligando Apo-1, Ligando APT1), TNFSF7 (Ligando CD27 CD70), TNFSF8 (Ligando CD30 CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1BB Ligando CD137),
5 TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno CA 125 asociado a tumores, antígeno asociado a tumores que expresa carbohidrato relacionado con Y de Lewis, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Uroquinasa, VCAM,
10 VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos Virales, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A,
15 WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Los antígenos ejemplares que pueden fijarse como diana específicamente por las inmunoglobulinas de la invención
20 | incluyen pero sin limitación: ~~CD20, CD19,~~ Her2, EGFR, EpCAM, CD3, FcγRIIIa (CD16), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRI (CD64), receptores de tipo Toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas tales como IL-2, IL-5, IL-13, IL-12, IL-23 y TNFα y receptores de citocinas tales como
25 IL-2R, quimiocinas, receptores de quimiocinas, factores de crecimiento tales como VEGF y HGF y similares. Para formar los anticuerpos biespecíficos de la invención, pueden prepararse anticuerpos contra cualquier combinación de estos antígenos; es decir, cada uno de estos antígenos
30 puede incluirse o excluirse opcional e independientemente

de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención.

Son combinaciones particularmente preferidas para anticuerpos biespecíficos un dominio de unión a antígeno
5 contra CD3 y un dominio de unión a antígeno seleccionado de un dominio que se une a ~~CD19, CD20, CD38 y~~ CD123, cuyas secuencias se muestran en las Figuras.

Ácidos nucleicos de la invención

La invención proporciona además composiciones de
10 ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos biespecíficos de la invención. Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones de ácidos nucleicos dependerán del formato y armazón de la proteína heterodimérica. De esta manera, por ejemplo, cuando el
15 formato requiere tres secuencias de aminoácidos, tal como para el formato triple F (por ejemplo, un primer monómero de aminoácido que comprende un dominio Fc y un scFv, un segundo monómero de aminoácido que comprende una cadena pesada y una cadena ligera), pueden incorporarse tres
20 secuencias de ácido nucleico en uno o más vectores de expresión para la expresión. De forma similar, en algunos formatos (por ejemplo, formatos scFv dobles tales como se desvela en la Figura 1) solo se necesitan dos ácidos nucleicos; de nuevo, pueden ponerse en uno o dos vectores
25 de expresión.

Como se conoce en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la invención pueden incorporarse en vectores de expresión como es conocido en la técnica y dependiendo de las células hospedadoras usadas
30 para producir los anticuerpos heterodiméricos de la invención. En general, los ácidos nucleicos se unen

operativamente a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores de selección, sitios de unión a ribosomas, inductores, etc.). Los vectores de expresión pueden ser extracromosómicos o
5 vectores de integración.

Los ácidos nucleicos y/o vectores de expresión de la invención después se utilizan para transformar cualquier número de tipos diferentes de células hospedadoras como es bien conocido en la técnica, incluyendo células de
10 mamífero, bacterianas, de levadura, de insecto y/o fúngicas, encontrando utilidad las células de mamífero (por ejemplo células CHO) en muchas realizaciones.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican cada monómero y el ácido nucleico opcional que
15 codifica una cadena ligera, según es aplicable dependiendo del formato, están contenidos cada uno dentro de un solo vector de expresión, generalmente bajo controles de promotor diferentes o el mismo control de promotor. En realizaciones de utilidad particular en la presente
20 invención, cada uno de estos dos o tres ácidos nucleicos está contenido en un vector de expresión diferente. Como se muestra en el presente documento y en el documento 62/025,931, incorporado en el presente documento por referencia, pueden usarse diferentes relaciones de vector
25 para dirigir la formación de heterodímeros. Es decir, sorprendentemente, aunque las proteínas comprenden primer monómero:segundo monómero:cadenas ligeras (en el caso de muchas de las realizaciones del presente documento que tienen tres polipéptidos que comprenden el anticuerpo
30 heterodimérico) en una relación 1:1:2, estas no son las

relaciones que proporcionan los mejores resultados. Véase **Error! Reference source not found..**

Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se preparan cultivando células hospedadoras que comprenden el vector o los vectores de expresión como es bien conocido en la técnica. Una vez producidos, se realizan etapas de purificación de anticuerpo tradicionales, incluyendo una etapa de cromatografía de intercambio iónico. Como se analiza en el presente documento, si los pI de los dos monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico. Es decir, la inclusión de sustituciones de pI que alteren el punto isoeléctrico (pI) de cada monómero de forma que cada monómero tenga un pI diferente y el heterodímero también tenga un pI distinto, facilita de esta manera la purificación isoeléctrica del heterodímero "triple F" (por ejemplo, columnas de intercambio aniónico, columnas de intercambio catiónico). Estas sustituciones también ayudan en la determinación y supervisión de cualquier homodímero scFv-Fc doble y mAb después de la purificación (por ejemplo, geles IEF, cIEF y columnas IEX analíticas).

Tratamientos

Una vez fabricadas, las composiciones de la invención encuentran utilidad en varias aplicaciones. ~~CD20, CD38 y CD123 están~~ sin regular ~~todos ellos~~ en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas, por consiguiente, los anticuerpos heterodiméricos de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de cáncer, incluyendo pero sin

limitación todos los linfomas de células B y leucemias, incluyendo pero sin limitación el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide crónica (CML).

Por consiguiente, las composiciones heterodiméricas de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de estos cánceres.

Composiciones de anticuerpo para administración *in vivo*

Las formulaciones de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metilo o propiol parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo

peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos)
proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o
inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como
polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina,
5 glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina;
monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo
glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como
EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o
sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio;
10 complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína)
y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™
o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede
contener más de un compuesto activo cuando sea necesario
15 para la indicación particular a tratar, preferentemente los
que tienen actividades complementarias que no afectan
adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable
proporcionar anticuerpos con otras especificidades. Como
alternativa, o además, la composición puede comprender un
20 agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del
crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Dichas
moléculas están presentes convenientemente en combinación
en cantidades que son eficaces para el fin deseado.

Los principios activos también pueden estar atrapados
25 en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de
coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo,
hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y
microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente,
en sistemas de liberación de fármaco coloidales (por
30 ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina,
microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en

macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles o casi estériles. Estos se
5 consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de
10 polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres hidrogel (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o
15 poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos n.º 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma. etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas
20 inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100
25 días, ciertos hidrogel liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a
30 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Pueden

aconsejarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S--S intermoleculares a través de intercambio tio-
5 disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz poliméricas específicas.

10 Modalidades de administración

Los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un
15 periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa subcutánea del anticuerpo.

20 Modalidades de tratamiento

En los métodos de la invención, se usa terapia para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejora en la
25 enfermedad o afección y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un aumento de la
30 muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas, (5) inhibición (es

decir ralentización en alguna medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral; (6) un aumento de la tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

5 Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada pueden determinarse por criterios de respuesta estandarizados específicos para esa enfermedad o afección. La respuesta del tumor puede evaluarse con respecto a cambios en la morfología tumoral
10 (es decir, carga tumoral total, tamaño del tumor y similares) usando técnicas de exploración por imágenes de resonancia magnética (MRI), exploración por imágenes de rayos x, exploración tomográfica computarizada (CT), formación de imágenes de barrido óseo, endoscopia y toma de
15 muestras de biopsias de tumor incluyendo aspiración de médula ósea (BMA) y recuento de células tumorales en la circulación.

Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia puede experimentar el efecto
20 beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de una enfermedad clínicamente
25 detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF) o proteína monoclonal anormal en caso de mieloma.

Dicha respuesta puede persistir durante al menos 4 a 8
30 semanas, o algunas veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención.

Como alternativa, una mejoría en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos aproximadamente un 50 % de reducción en toda la carga tumoral mediable (es decir, el
5 número de células malignas presentes en el sujeto o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que pueden persistir durante 4 a 8 semanas o 6 a 8 semanas.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención
10 incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los medicamentos usados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado.

15 Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es
20 una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad de
25 estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos.

Como alternativa, esta propiedad de una composición
30 puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular o de inducir apoptosis

mediante ensayos *in vitro* conocidos por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un
5 experto habitual en la materia podría determinar dichas cantidades basándose en factores tales como las dimensiones del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

10 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una sola embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse
15 o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa
20 en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo
25 farmacéutico requerido.

La especificación para las formas de dosificación unitaria de la presente invención se dicta por y es directamente dependiente de (a) las características típicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a
30 conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica

de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos biespecíficos usados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia.

Un intervalo ejemplar y no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz y un anticuerpo biespecífico usado en la presente invención es aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.5, aproximadamente tal como 0.3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o mayor, tal como una dosis de 1 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 5 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 8 mg/kg.

Un profesional médico con experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, un médico o veterinario podría empezar dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/kg tal como de 200 a 400 mg/kg. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión

continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como mayor de 24 horas, si se desea para reducir efectos secundarios incluyendo toxicidad.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, durante hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces cuando sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre después de la administración, por ejemplo, tomando una muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a la región de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico se administra una vez por semana durante 2 a 12 semanas, tal como durante 3 a 10 semanas, tal como durante 4 a 8 semanas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez por semana durante un periodo de 6 meses o mayor.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo biespecífico seguida de una infusión de un

anticuerpo biespecífico conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una dosificación diaria de un anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o, como alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4, o 2 horas o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo biespecífica se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos y doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbacina, metotrexato, mitomicina C y

ciclofosfamida); intercalantes de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercalantes de ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo 5-
5 fluorouracilo, capecitibina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea).

Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y
10 análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (por ejemplo CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasoma (por
15 ejemplo bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluyendo inhibidores de la quinasa I κ B; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y por lo tanto regulan negativamente la replicación celular (por ejemplo trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab) y otros
20 inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que están regulados positivamente, sobreexpresados o activados en cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la
25 invención pueden usarse antes, junto con o después del tratamiento con Velcade® (bortezomib).

Todas las referencias citadas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

30 Aunque anteriormente se han descrito realizaciones particulares de la invención con fines ilustrativos, los

expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

5 **Ejemplos**

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. No debe considerarse que estos ejemplos limitan la presente invención a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Para todas las posiciones
10 de región constante discutidas en la presente invención, la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, incorporada en su
15 totalidad por referencia). Los expertos en la materia de los anticuerpos apreciarán que esta invención consiste en una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de
20 inmunoglobulina. Por consiguiente, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada como se define por el índice EU no corresponderá necesariamente a su secuencia secuencial.

En las Publicaciones US 2015/0307629, 2014/0288275 y
25 WO2014/145806, todas ellas incorporadas expresamente por referencia en su totalidad se indica técnicas científicas generales y específicas, y particularmente para las técnicas indicadas en el presente documento.

EJEMPLOS

30 **EJEMPLO 1: FORMATOS ALTERNATIVOS**

Producción de biespecíficos

En las Figuras 1 se muestran viñetas de biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. En la Figura 39 a Figura 43 se indican secuencias de aminoácidos para biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 de formato alterno. El ADN que codifica las tres cadenas necesarias para la expresión de biespecíficos se generaron por síntesis de genes (Blue Heron Biotechnology, Bothell, Wash.) y se subclonaron usando técnicas de biología molecular convencionales en el vector de expresión pTT5. Se introdujeron sustituciones usando mutagénesis dirigida (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, Tex.) o síntesis de genes adicionales y subclonación. El ADN se introdujo por transfección en células HEK293E para la expresión y las proteínas resultantes se purificaron de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad en proteína A (GE Healthcare) y cromatografía de intercambio catiónico. En la Figura 35 se muestran los rendimientos después de la purificación de afinidad en proteína A. La purificación por cromatografía de intercambio catiónico se realizó usando una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare) con un tampón de lavado/equilibrio de MES 50 mM, pH 6.0 y un tampón de elución de MES 50 mM, pH 6.0 + gradiente lineal de NaCl 1 M (véanse los cromatogramas en la Figura 36).

Citotoxicidad de células T redirigida

Se caracterizaron biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38⁺. Se incubaron 10.000 células RPMI8266 durante 24 h con 500.000 PBMC humanas. La RTCC se midió por fluorescencia LDH como se indica (véase la Figura 37).

EJEMPLO 2

Citotoxicidad de células T redirigida

Se caracterizaron biespecíficos Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38+. Se incubaron 40.000 células RPMI8266 durante 96 h con 400.000 PBMC humanas. La RTCC se midió por citometría de flujo como se indica (véase la Figura 44). También se caracterizaron la expresión de células T CD4+ y CD8+ de CD69, Ki-67 y PI-9 por citometría de flujo y se muestran en la Figura 45.

Modelo en ratón de actividad antitumoral

En cuatro grupos de cinco ratones NOD scid gamma (NSG) se injertaron 5×10^6 células tumorales RPMI8226TrS (mieloma múltiple, que expresa luciferasa) por inyección intravenosa en la vena de la cola el Día 23. El Día 0, en los ratones se injertaron por vía intraperitoneal 10×10^6 PBMC humanas. Después del injerto de PBMC el Día 0, los artículos de ensayo se dosifican semanalmente (Días 0, 7) por inyección intraperitoneal a niveles de dosificación indicados en la Figura 4. El diseño del estudio se resume adicionalmente en la Figura 46. El crecimiento tumoral se controló midiendo el flujo total por ratón usando un sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS®). Tanto XmAb13551 como XmAb15426 mostraron efectos antitumorales sustanciales (véase la Figura 47 y la 48).

Estudios en mono cinomolgus

A monos cinomolgus se les administró una sola dosis de biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. También se incluyó un control de biespecífico anti-RSV x anti-CD3. Los niveles de dosificación fueron: 20 µg/kg XmAb13551 (n=2), 0.5 mg/kg XmAb15426 (n=3), 3 mg/kg XmAb14702 (n=3), o 3 mg/kg XmAb13245 (control anti-RSV x anti-CD3, n=3) (en 3 estudios

independientes). Los biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 redujeron rápidamente las células CD38+ en sangre periférica (véase la Figura 49). Los biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 dieron como resultado una activación de células T como se mide por expresión de CD69 (véase la Figura 50). También se midieron los niveles en suero de IL-6 (véase la Figura 51). Obsérvese que, en comparación con XmAb13551, XmAb15426 tuvo una mayor duración de reducción de células CD38+ y menores niveles de activación de células T de producción de IL-6.

XmAb15426 y XmAb14702 se ensayaron a dosis únicas de 0.5 mg/kg y 3 mg/kg respectivamente. Ambos anticuerpos se toleraron bien a esas dosis superiores, coherente con los niveles moderados de IL6 observados en suero de los monos tratados. Además, XmAb15426, con afinidad CD3 intermedia, redujo más eficazmente las células CD38+ a 0.5 mg/kg en comparación con el XmAb13551 de alta afinidad original dosificado a 2, 5 o 20 µg/kg. La reducción por XmAb15426 fue más sostenida en comparación con la dosis superior de XmAb13551 en el estudio previo (7 frente a 2 días, respectivamente). Debe destacarse que, aunque la reducción de células diana fue mayor en el caso de XmAb15426, la activación de células T (CD69, CD25 e inducción de PD1) fue mucho menor en los monos tratados con XmAb15426 incluso cuando se la dosis fue 25 veces mayor que el grupo de 20 µg/kg de XmAb13551. XmAb14702, con afinidad muy baja por CD3 tuvo poco efecto sobre las células CD38+ y la activación de células T.

Estos resultados demuestran que la modulación de la activación de células T mediante la atenuación de la afinidad por CD3 es un método prometedor para mejorar la

ventana terapéutica de anticuerpos biespecíficos que se acoplan a las células T. Esta estrategia tiene posibilidad de expandir el conjunto de antígenos susceptibles de fijarse como diana en la inmunoterapia de células T al
5 mejorar la la tolerancia y permitir una mayor dosificación para superar el aclaramiento de antígeno con dianas tales como CD38. Los presentes inventores han demostrado que al reducir la afinidad por CD3, XmAb 15426 reduce de forma eficaz las células CD38+ mientras que minimiza los efectos
10 de CRS observados con las dosis comparables de su homólogo de alta afinidad XmAb13551.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la
15 presente descripción de la invención.

20

25

30

Figure 68L

H1.94_L1.47

SEQ ID NO:254

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO:255

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:256

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 257

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68M

H1.96_L1.47

SEQ ID NO: 258

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTV
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 259

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTV
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 260

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 261

QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68N

H1.97_L1.47

SEQ ID NO: 262

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGT¹LVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGV²PARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WY³SNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 263

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGT¹LVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGV²PARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WY³SNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 264

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGT¹LVTVSS

SEQ ID NO: 265

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGV²PARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWY³SNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68O

H1.98_L1.47

SEQ ID NO: 266

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 267

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 268

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 269

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68P

H1.99_L1.47

SEQ ID NO: 270

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 271

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 272

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 273

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68Q

H1.100_L1.47

SEQ ID NO: 274

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFASYSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 275

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFASYSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 276

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFASYSWFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 277

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68R

H1.101_L1.47

SEQ ID NO: 278

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 279

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 280

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 281

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68S

H1.102_L1.47

SEQ ID NO: 282

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIISKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 283

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIISKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 284

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIISKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 285

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68T

H1.103_L1.47

SEQ ID NO: 286

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 287

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 288

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 289

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68U

H1.104_L1.47

SEQ ID NO: 290

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 291

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 292

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 293

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68V

H1.105_L1.47

SEQ ID NO: 294

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFDQYVSWFDYWGQGTTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 295

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFDQYVSWFDYWGQGTTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 296

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFDQYVSWFDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 297

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68W

H1.106_L1.47

SEQ ID NO: 298

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 299

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 300

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 301

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68X

H1.107_L1.47

SEQ ID NO: 302

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 303

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 304

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 305

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68Y

H1.108_L1.47

SEQ ID NO: 306

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 307

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 308

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 309

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 68Z

H1.109_L1.47

SEQ ID NO: 310

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH

SEQ ID NO: 311

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTV
SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 312

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 313

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA
QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Figura 71

XENP15049 Anti-CD19 (4G7_H1.227_L1.199) x Anti-CD3 (H1.30_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 314)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 315)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 316)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLE
PEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 72

XENP15051 Anti-CD19 (4G7_H1.227_L1.199) x Anti-CD3 (H1.31_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 317)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDQGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 318)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 319)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLE
PEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 73

XENP15050 Anti-CD19 (4G7_H1.227_L1.199) x Anti-CD3 (H1.33_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 320)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDQGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 321)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGGQTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 322)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLE
PEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 74

XENP13676 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.30_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 323)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 324)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 325)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 75

XENP14696 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.31_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 326)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 327)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 328)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 76

XENP15629 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.32_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 329)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDQGPNENYKTPPVLDSD
GGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 330)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 331)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 77

XENP15053 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.33_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 332)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 333)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 334)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 78

XENP15630 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.88_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 335)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 336)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGPSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 337)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 79

XENP15631 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.89_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 338)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 339)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 340)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 80

XENP15632 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.90_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 341)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 342)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 343)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 81

XENP15633 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.91_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 344)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 345)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 346)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 82

XENP15634 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.92_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 347)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNHPKSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 348)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 349)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 83

XENP15635 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.93_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 350)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 351)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 352)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 84

XENP15636 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.94_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 353)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 354)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 355)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 85

XENP15638 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.95_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 356)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 357)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 358)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 86

XENP15639 Anti-CD20 (C2B8_H1L1) x Anti-CD3 (H1.96_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 359)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVTITADKSIST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 360)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGLTVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVS
PGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALW
YSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKN
QVKLTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

LC (SEQ ID NO: 361)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY
YCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 87

XENP13677 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.30_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 362)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 363)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 364)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 88

XENP14388 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.31_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 365)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 366)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 367)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 89

XENP14389 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.32_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 368)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 369)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 370)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 90

XENP14390 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.33_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 371)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 372)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 373)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 91

XENP14391 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.88_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 374)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 375)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGPSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 376)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 92

XENP14392 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.89_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 377)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 378)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 379)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 93

XENP14393 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.90_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 380)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 381)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 382)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 94

XENP16366 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.98_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 383)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 384)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 385)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 95

XENP16367 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.99_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 386)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNHPKSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 387)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 388)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 96

XENP16368 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.100_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 389)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 390)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 391)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 97

XENP16369 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.101_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 392)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDQGPNENYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 393)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 394)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 98

XENP16370 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.102_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 395)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 396)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 397)

QIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 99

XENP16371 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.103_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 398)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 399)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRSEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGGTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSTVS
PGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALW
YSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKN
QVKLTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

LC (SEQ ID NO: 400)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 100

XENP16372 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.104_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 401)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 402)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 403)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 101

XENP16373 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.105_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 404)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 405)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFDYWGGTLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPLTVS
PGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALW
YSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKN
QVKLTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

LC (SEQ ID NO: 406)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 102

XENP16374 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.106_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 407)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNHPKSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 408)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 409)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 103

XENP16375 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.107_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 410)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDQGPNENYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 411)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 412)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 104

XENP16376 Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.108_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 413)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 414)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 415)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSIHWFQQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Figura 105

Anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x Anti-CD3 (H1.109_L1.47) Fab-scFv-Fc

HC 1 (Fab-Fc) (SEQ ID NO: 416)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQRLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSAST
AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYMGGDWYFDVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HC 2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 417)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLLTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWY
SNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVKHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQ
VKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

LC (SEQ ID NO: 418)

QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFAQKPGKSPKPLIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQWTHNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 106

>sp/P11836/CD20_HUMAN antígeno CD20 de linfocito B

SEQ ID NO: 419

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNG
LFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMN
SLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKN5PST
QYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQT
EIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

>sp/P26951 | IL3RA__HUMAN subunidad alfa del receptor de interleucina 3 (CD123)

SEQ ID NO: 420

MVLLWLTLILLALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSM
PAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVDFL
SCSWAVGPGAPADVQYDLYLVANRRQYECLEHYKTDAGTRIGCRFDDISRLSSGSQSS
HILVRGRSAAFGIPCTDKFVVSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNKFRYEL
QIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLNPGTYTVQIRARERVYEFSAWSTPQRFECDOEEGAN
TRAWRTSLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIIPMKDPIGDSFQNDKLVVWEAG
KAGLEECLVTEVQVQKT

Figura 121

Alto CD20 C2B8_H1.202_L1.113

Lo que es	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITWVRQAPGORLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSASTAYMELSSL RSEDTAVYYCARSYMMGGDWYFDVWGAGTLVTVSS	421
vhCDR1	SYNIMH	422
vhCDR2	AIYPGNGATSYSQKFQG	423
vhCDR3	SYMMGGDWYFDV	424
Dominio ligero variable (vl)	QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASWSVSYIHWFQQKPGKSPKPLIVATSNLASGVPVRFSGSGSDTYTLTISSLPEDFATYY CQQWTHNPPTIFGGGKVEIK	425
vlCDR1	RASWSVSYIH	426
vlCDR2	ATSNLAS	427
vlCDR3	QQWTHNPPT	428
scFv (incluyendo enlazador cargado)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITWVRQAPGORLEWMGAIYPGNGATSYSQKFQGRVTITADTSASTAYMELSSL RSEDTAVYYCARSYMMGGDWYFDVWGAGTLVTVSSGKPSGKPGSGKPGSQIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASW SVSYIHWFQQKPGKSPKPLIVATSNLASGVPVRFSGSGSDTYTLTISSLPEDFATYYCQQWTHNPPTIFGGGKVEIK	429

Figura 122

Bajo CD20 C2B8_H1L1

Lo que es	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYNMHVVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFGGRVTITADKSISTAY MELSSLRSEDTAVVYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSS	430
vhCDR1	SYNMH	431
vhCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFGG	432
vhCDR3	STYGGDWYFNV	433
Dominio ligero variable (vl)	QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYIHWFQKPKGKPKFLIYATSNLASGVPVRFSGSGGTDYTLTISSIQPEDFATYYC QQWTSNPPTFGGGTKVEIK	434
vlCDR1	RASSSVSYIH	435
vlCDR2	ATSNLAS	436
vlCDR3	QQWTSNPPT	437
scFv (incluyendo enlazador cargado)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYNMHVVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFGGRVTITADKSISTAY MELSSLRSEDTAVVYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTLTVSSGKPGSGGKPGSGGKPGSQIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSSVSYIHWFQKPKGKPKFLIYATSNLASGVPVRFSGSGGTDYTLTISSIQPEDFATYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIK	438

Figura 123

CD123 7G3_H1.109_L1.57

Lo que es	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDYIMKWVKQSHGKSLEWMGDIIPSNNGATFYNQKFKGKATLTVDRSTSTAY MELSSLRSEDTAVVYCARSHLLRASWFAYWGQGTLLTVVSS	439
vhCDR1	DYYMK	440
vhCDR2	DIIPSNNGATFYNQKFKG	441
vhCDR3	SHLLRASWFAY	442
Dominio ligero variable (vl)	DFVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK	443
vlCDR1	KSSQSLNTGNQKNYLT	444
vlCDR2	WASTRES	445
vlCDR3	QNDYSYPYTF	446
scFv (incluyendo enlazador cargado)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDYIMKWVKQSHGKSLEWMGDIIPSNNGATFYNQKFKGKATLTVDRSTSTAY MELSSLRSEDTAVVYCARSHLLRASWFAYWGQGTLLTVVSSGKPGSGKPGSGKPGSGDFVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSLNTGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFG GGTKLEIK	447