

ANTICUERPOS

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con anticuerpos que se unen a 5T4, inclusive anticuerpos biespecíficos que se unen a 5T4 y CD3. La invención provee además
5 composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y el uso de los anticuerpos en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, en particular en terapias contra el cáncer.

Antecedentes

5T4 (también conocida como glicoproteína trofoblástica [TPBG] o factor inhibidor
10 activado por Wnt 1 [WAI1]) es una proteína transmembrana de paso simple de 72 kDa, que contiene 8 repeticiones ricas en leucina (LRR) y 7 sitios potenciales de N-glicosilación (Zhao et al., 2014 *Structure* 22, 612-620).

La expresión de 5T4 es limitada en tejidos de adultos normales, excepto por la placenta (Southall et al., 1990 *Br J Cancer* 61, 89-95). La 5T4 se expresa en muchos
15 cánceres humanos, inclusive en cáncer renal, cervical, de ovario, de pulmón, de próstata y de colon (Stern y Harrop, 2017 *Cancer Immunol Immunother* 66, 415-426; Southall et al., 1990 *Br J Cancer* 61, 89-95). La expresión de 5T4 en las células tumorales dirige el desarrollo tumoral de la siguiente manera: 1) facilita la transición epitelial-a-mesenquimática (Damelin et al., 2011 *Cancer Res* 71, 4236-4246;
20 Carsberg et al., 1996 *Int J Cancer* 68, 84-92), y 2) inhibe la vía de señalización de Wnt/beta-catenina canónica y la activación de la vía Wnt no canónica (Kagermeier-Schenk et al., 2011 *Dev Cell* 21, 1129-1143).

Los anticuerpos dirigidos a 5T4 y las terapias dirigidas a 5T4 tienen actividad clínica en varios tipos de cáncer conocidos por expresar 5T4 (inclusive el cáncer colorrectal,
25 de pulmón y renal). Por ejemplo, el compuesto naptumomab estafenatox es una proteína de fusión recombinante que consiste en la unidad 5T4-Fab fusionada genéticamente a la variante de superantígeno modificado SEA/E-120. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos como una inmunoterapia para cáncer de pulmón

de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de células renales (RCC) y cáncer de páncreas (véase, por ejemplo, Eisen, et al., 2014 *Curr Oncol Rep* 16, 370). Además, TroVax® es un virus vaccinia Ankara modificado que expresa construcciones de 5T4 (MVA-5T4), que provee beneficios clínicos para el cáncer colorrectal, de próstata y renal (véase por ejemplo Stern y Harrop, 2017 *Cancer Immunol Immunother* 66, 415-426; Scurr et al., 2017 *JAMA Oncol* 12, 10). Además, se han descrito anticuerpos anti-5T4 en WO 2007106744, WO 03038098, WO 2011048369, WO 2013041687, WO 2017072207.

Si bien se ha logrado un progreso significativo en la erradicación del cáncer, aún persiste la necesidad de mejoras adicionales de las terapias contra cáncer basadas en anticuerpos.

Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención consiste en proveer un anticuerpo que comprende por lo menos una región de unión al antígeno que se puede unir a la 5T4 (glicoproteína trofoblástica), en donde el anticuerpo puede bloquear la unión a 5T4 de un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 9 [059].

En particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico y además puede comprender una región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a CD3, tal como una CD3ε (épsilon) humana, tal como la CD3ε (épsilon) humana especificada en la SEQ ID N°: 4.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una construcción de ácidos nucleicos que comprende

a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno que se puede unir a la 5T4 definida en la presente, y/o

b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de la cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno que se puede unir a la 5T4 definida en la presente.

5 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un vector de expresión que comprende

a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno que se puede unir a la 5T4 definida en la presente, y/o

10 b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de la cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno que se puede unir a la 5T4 definida en la presente.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una célula que comprende una construcción de ácidos nucleicos o un vector de expresión definidos en la presente.

15 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo definido en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo definido en la presente para usar como un medicamento, tal como para usar en el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno, donde dicho método comprende administrar un anticuerpo, una composición o composición farmacéutica definidos en la presente, a
25 un sujeto que lo necesita.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con métodos para producir un anticuerpo definido en la presente.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit de partes, que comprende un anticuerpo definido en la presente; e instrucciones para usar dicho kit.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo antiidiotípico, que se une a la región de unión al antígeno que se puede unir a 5T4 del anticuerpo
5 definido en la presente.

Descripción Breve de las Figuras

Figura 1: Desplazamiento de anticuerpo de IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-
FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR en combinación con IgG1-5T4-A3-F405L. Se
determinó el desplazamiento de anticuerpo mediante interferometría en biocapa en
10 un instrumento Octet HTX (ForteBio). Se inmovilizó IgG1-5T4-A3-F405L sobre el
biosensor y se cargó con 5T4ECDHis de humano (proteína madura de SEQ ID No.
99). Posteriormente, los biosensores cargados se expusieron a IgG1-5T4-A3-F405L,
IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR o IgG1-5T4-226-
FEAR. En la Figura se muestran las respuestas de asociación (500 s) por la
15 exposición a los segundos anticuerpos. A-C. IgG1-5T4-A3-F405L no mostró unión al
complejo IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis inmovilizado, indicando bloqueo cruzado
(autobloqueo) con IgG1-5T4-A3-F405L. Los anticuerpos IgG1-5T4-H8-FEAR
mostraron un aumento en la masa (indicando unión al complejo IgG1-5T4-A3-F405L-
5T4ECDHis inmovilizado) y por lo tanto ausencia de bloqueo cruzado con IgG1-5T4-
20 A3-F405L. A. IgG1-5T4-059-FEAR, B. IgG1-5T4-207-FEAR y C. IgG1-5T4-226-
FEAR mostraron todos un aumento inicial en la masa (indicando unión de los
anticuerpos al complejo IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis inmovilizado) seguido por
una disminución rápida en la masa. Este comportamiento de los anticuerpos es
indicativo de desplazamiento de anticuerpo (Abdiche YN, y col. (2017) Antibodies
25 Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One
Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535) .

Figura 2: Unión simultánea de anticuerpos anti-5T4 a 5T4 unido a membrana medido
mediante citometría de flujo. Se conjugaron los anticuerpos anti-5T4 IgG1-5T4-H8-
FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR a isotiocianato de fluoresceína
30 (FITC) y se agregaron a una concentración de 2 µg/mL y células SK-OV-3 que

expresaban 5T4 en presencia de IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-b12, IgG1-5T4-207-FEAR o IgG1-5T4-226-FEAR 10 µg/mL sin conjugar. El porcentaje de unión de los anticuerpos marcados con FITC se calculó y se describe como porcentaje de unión promedio $\pm$ desviación estándar (SD).

- 5 Figura 3: Unión de anticuerpos anti-5T4 a células HEK-293 transfectadas con 5T4 de longitud completa de humano y pollo. Las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con el 5T4 de longitud completa de humano (SEQ ID No: 1) (A) o 5T4 de pollo (SEQ ID No: 3) (B) se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR o IgG1-5T4-226-
10 FEAR. Después de la incubación con F(ab')₂ anti-IgG de humano de cabra conjugado con R-Ficoeritrina (PE), se determinó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) mediante citometría de flujo. Como control negativo, se incluyó IgG1-b12-K409R (10 µg/mL).

- Figura 4: Capacidad de internalización de anticuerpos anti-5T4 monovalentes. Se
15 generaron anticuerpos conjugados a toxina biespecíficos que reconocen a 5T4 con un brazo de Fab a la vez que reconocen un antígeno irrelevante (gp120 de HIV-1, que no se expresa en células tumorales) con el segundo brazo de Fab, mediante el intercambio controlado de brazos de Fab de anticuerpos anti-5T4 no conjugados con anticuerpos IgG1-b12 (específico por gp120 de HIV-1) que habían sido conjugados
20 con una molécula de Duostatin-3 por anticuerpo. Las células MDA-MB-468 (A) y HCC1954 (B) se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos, como se indica. La viabilidad celular se midió después de 5 días. Los datos se presentan como porcentaje promedio de células viables de tres experimentos por replicado. Como control negativo, se incluyó a IgG1-b12 monoespecífico divalente conjugado
25 con Duostatin-3 (IgG1-b12-vcDuo3).

- Figura 5(I): Unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 a 5T4 de longitud completa de humano y mono cinomolgo transfectado en células HEK-293. La unión de los anticuerpos anti-5T4 monovalentes y divalentes se analizó utilizando células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con 5T4 de longitud completa de humano (paneles de la izquierda) o de mono cinomolgo (paneles de la derecha). Las
30 células se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos, como se indica.

Después del marcaje secundario con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con FITC, se analizó la unión mediante citometría de flujo. Como anticuerpo control negativo, se incluyó IgG1-b12-K409R (3 µg/mL). Los datos se presentan como valores de intensidad de fluorescencia promedio (MFI) de dos replicados técnicos ± SD. A. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR. B. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR. C. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR. D. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR e IgG1-5T4-H8-FEAR.

10 Figura 5(II): Unión de anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos a 5T4 de mono cinomolgo y humano transfectado en células HEK-293. Se analizó la unión de anticuerpos anti-5T4 mono y divalentes usando células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con 5T4 de humano (paneles de la izquierda) o con 5T4 de mono cinomolgo (paneles de la derecha). Las células se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos, como se indica. Después del marcaje secundario con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con ficoeritrina (PE), se analizó la unión mediante citometría de flujo. A. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR; D. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR; E. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-076-FEAR e IgG1-5T4-076-FEAR; F. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-085-FEAR; G. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR; H. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR; I. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.

30 Figura 6(I): Unión de anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos y 5T4 monoespecíficos a células tumorales de humano positivas para 5T4. Se determinó la unión de anticuerpos anti-5T4 mono y divalentes a células HeLa (paneles de la izquierda) o células MDA-MB-231 (paneles de la derecha) mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos. Después del

marcaje secundario con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con FITC, se determinó la MFI mediante citometría de flujo. A. Unión de anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR a células HeLa (panel de la izquierda) o células MDA-MB-231 (panel de la derecha). B. Unión de anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR a células HeLa (panel de la izquierda) o células MDA-MB-231 (panel de la derecha). C. Unión de anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR a células HeLa (panel de la izquierda) o células MDA-MB-231 (panel de la derecha). Se incluyó IgG1-b12-K409R (3 µg/mL) como control negativo (círculos abiertos).

Figura 6(II): Unión de Anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos y 5T4 monoespecíficos a células HeLa. Se determinó la unión de anticuerpos anti-5T4 mono y divalentes a células HeLa mediante citometría de flujo. Se incubaron células con concentraciones crecientes de anticuerpos. Después del marcaje secundario con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con ficoeritrina (PE), se determinó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) mediante citometría de flujo. A. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR; D. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR; E. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-085-FEAR; F. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR; G. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR; H. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.

Figura 6(III): Unión de anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos y 5T4 monoespecíficos a células MDA-MB-231. Se determinó la unión de anticuerpos anti-5T4 mono y divalentes a células MDA-MB-231 mediante citometría de flujo. Se incubaron células con concentraciones crecientes de anticuerpos. Después del marcaje secundario con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con PE, se determinó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) mediante citometría de flujo. A. Unión de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-

FEAR; B. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR; D. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR; E. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-085-FEAR; F. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR; G. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR; H. Unión de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.

Figura 7(I): Inducción de citotoxicidad in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células MDA-MB-231 utilizando células T purificadas como células efectoras. Se incubaron células MDA-MB-231 con concentraciones crecientes de anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos o monoespecíficos, anticuerpos anti-5T4 bivalentes y células T aisladas como células efectoras en una relación de célula efectora:diana (E:T) de 8:1. Para este experimento se usaron células T purificadas obtenidas de dos donantes diferentes, donante A (paneles de la izquierda) y donante B (paneles de la derecha). Se determinó la citotoxicidad mediante la medida del porcentaje de células MDA-MB-231 viables después de 72 horas de incubación (% de células viables= [absorbancia de la muestra – absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina]/[absorbancia de células diana no tratadas – absorbancia células diana tratadas con estaurosporina] x 100). A. Citotoxicidad inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Citotoxicidad inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Citotoxicidad inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR.

Figura 7(II): Valores de IC50 de citotoxicidad inducida in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células MDA-MB-231 utilizando células T purificadas como células efectoras. Se analizaron los valores de IC50 de la citotoxicidad inducida mediada por células T por bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR,

bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR en células MDA-MB-231 utilizando el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se presentan como valores de IC50 promedio de dos donantes diferentes $\pm$ SD.

- 5 Figura 8(I): Inducción de citotoxicidad por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células MDA-MB-231 utilizando células T como células efectoras in vitro. Se incubaron células MDA-MB-231 con concentraciones crecientes de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 u homodímeros de 5T4 y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 8:1. Para este experimento se usaron
- 10 tres donantes diferentes. Los datos mostrados son % de supervivencia promedio $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los tres donantes ensayados. A. Citotoxicidad mediada por células T (disminución en la supervivencia) inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Citotoxicidad mediada por células T inducida en presencia
- 15 de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Citotoxicidad mediada por células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR; D. Citotoxicidad mediada por células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-huCD3-
- 20 H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR; E. Citotoxicidad mediada por células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR; F. Citotoxicidad mediada por células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.
- 25 Figura 8(II): Valores de IC50 de citotoxicidad inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células MDA-MB-231 usando células T como células efectoras in vitro. Los valores de IC50 de la citotoxicidad mediada por células T inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células MDA-MB-231 se analizaron utilizando el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se
- 30 presentan como valores promedio de IC50 de tres donantes diferentes $\pm$ SD. A. Valores de IC50 de la citotoxicidad mediada por células T inducida por bslgG1-

huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR y bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; B. Valores de IC50 de la citotoxicidad mediada por células T inducida por bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Figura 9(I): Activación de células T in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células MDA-MB-231. Se incubaron células MDA-MB-231 con concentraciones crecientes de anticuerpos CD3x5T4 y biespecíficos mono-específicos, anticuerpos anti-5T4 bivalentes, como se indica, y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 8:1. Se analizó la expresión de tres marcadores de activación de células T (PD1 [paneles superiores], CD25 [paneles centrales] y CD69 [paneles inferiores]) mediante citometría de flujo. Para este experimento se usaron dos donantes diferentes, donante A (símbolos llenos) y donante B (símbolos vacíos). A. Activación de células T inducida en presencia de bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Activación de células T inducida en presencia de bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Activación de células T inducida en presencia de bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR.

Figura 9(II): Valores de EC50 de activación in vitro de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células MDA-MB-231. Se analizaron los valores de EC50 de marcadores de activación in vitro de células T (PD1, CD25 y CD69) inducida por bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR o bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR en presencia de células MDA-MB-231

utilizando el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se presentan como media de dos donantes diferentes $\pm$ SD.

Figura 10(I): Activación *in vitro* de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células MDA-MB-231. Se incubaron células MDA-MB-231

5 con concentraciones crecientes de anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos y homodímeros de 5T4 y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 8:1. La activación de células T se midió por un aumento en el % de células CD69+ en las poblaciones de células T CD4+ (paneles de la izquierda) y CD8+ (paneles de la derecha). Para este experimento se usaron tres donantes diferentes; los datos mostrados son % promedio de sobreexpresión de CD69 $\pm$ SEM de tres donantes ensayados. A. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR; B. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR; C. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR; D. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR; E. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR; F. Activación de células T inducida en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.

Figura 10(II): Valores de EC_{50} de activación *in vitro* de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células MDA-MB-231. Se analizaron los

25 valores de EC_{50} de los marcadores de activación de células T (aumento en el % de CD69+ [A-B], CD25+ [C-D] y PD1+ [E-F], células CD25 y CD69 en las poblaciones de células T CD4+ y CD8+) inducida *in vitro* por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células MDA-MB-231 utilizando el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se presentan como media de tres donantes diferentes $\pm$ SD. A. Valores de EC_{50} de la sobreexpresión de CD69 inducida por

bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR,
bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR,
bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; B.
Valores de EC₅₀ de la sobreexpresión de CD69 inducida por bslgG1-huCD3-H101G-
5 FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-
huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR,
bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-
A3-FEAR. C. Valores de EC₅₀ de la sobreexpresión de CD25 inducida por bslgG1-
huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-
10 huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-
huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; D. Valores de
EC₅₀ de la sobreexpresión de CD25 inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-
207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-
FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-
15 huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.
E. Valores de EC₅₀ de la sobreexpresión de PD1 inducida por bslgG1-huCD3-
FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-
FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-huCD3-
FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; F. Valores de EC₅₀ de
20 la sobreexpresión de PD1 inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-
FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-
FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-
huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Figura 11: Liberación de citoquinas de células T inducida por anticuerpos
25 biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células tumorales positivas para 5T4.

Las células MDA-MB-231 se incubaron con anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4
0,2 µg/mL (bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-
FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-
H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR o bslgG1-
30 huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR) y anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos
(IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR o IgG1-5T4-059-FEAR) y células T
aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 8:1. Se analizó la

liberación de citoquinas mediante el ensayo U-PLEX. A. Concentración de IL-10, IL-13 y TNF en el sobrenadante de cocultivos de células T (derivadas del donante A)-células tumorales, después de 72 horas de incubación con anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 o anticuerpos anti-5T4 mono-específicos. B. Concentración de IL-10, IL-13 y TNF en el sobrenadante de cocultivos de células T (derivadas del donante B)-células tumorales, después de 72 horas de incubación con anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 o anticuerpos anti-5T4 mono-específicos.

Figura 12: Inducción de citotoxicidad in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células SK-OV-3 usando PBMC como células efectoras a relaciones variables de E:T. Las células SK-OV-3 se incubaron con concentraciones crecientes de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (paneles de la izquierda) o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (paneles de la derecha) y PBMC como células efectoras en una proporción de E:T de 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 y 12:1. Se determinó la citotoxicidad por medida del porcentaje de células SK-OV-3 viables después de 72 horas de incubación (% de células viables = [absorbancia de la muestra – absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina]/[absorbancia de células diana no tratadas – absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina] x 100). Para este experimento se usaron PBMC de dos donantes diferentes: A. donante C y B. donante D.

Figura 13: Inducción de citotoxicidad en células SK-OV-3 in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 usando células T como células efectoras a relaciones variables de E:T. Se incubaron células SK-OV-3 con concentraciones crecientes de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (paneles de la izquierda) o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (paneles de la derecha) y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1. La eficacia de la citotoxicidad se determinó por medida del porcentaje de células SK-OV-3 viables después de 72 horas de incubación (% de células viables = [absorbancia de la muestra – absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina]/[absorbancia de células diana no tratadas – absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina] x 100). Para este experimento se usaron células T de dos donantes diferentes: A. donante E y B. donante F.

Figura 14. Actividad antitumoral de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en un modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 en ratones NSG-HIS. A. Tamaño promedio del tumor en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 en ratones NSG-HIS después del tratamiento con PBS (control con vehículo), bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR 0,5 mg/kg o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR 0,5 mg/kg. Se evaluó el tamaño de tumor por medida con calibre. Las barras de error indican el SEM. B. Porcentaje de ratones NSG-HIS inyectados con células MDA-MB-231 con un tamaño de tumor < 500 mm³ después del tratamiento con PBS, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR.

Figura 15: Unión de anticuerpos específicos por 5T4 marcados con FITC de manera directa a variantes de 5T4 de humano con mutaciones de alanina individual en las posiciones 32 a 355 de ECD de 5T4 de humano, determinado mediante citometría de flujo. La unión se expresó como puntaje Z (veces de cambio), como medida del cambio en la unión en comparación con un anticuerpo control específico por 5T4 sin bloqueo cruzado (bslgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC) usado para la normalización. El número en el eje x se refiere a las posiciones de aminoácidos en 5T4 de humano (SEQ ID: 1). Los residuos en los cuales el puntaje Z en la unión fue menor que -1,5 (indicado por la línea punteada) fueron considerados “mutantes con pérdida de unión”. Los residuos con un puntaje Z positivo en la unión son residuos de pérdida de unión para el anticuerpo control específico por 5T4 sin bloqueo cruzado (bslgG1-5T4-A1-67F-F405Lxb12-FEAR-FITC). Los residuos en la posición de aa 38, 45, 49, 51, 54, 62, 64, 66, 68, 71, 72, 77, 91, 104, 108, 110, 112, 118, 121, 122, 135, 137, 155, 161, 167, 171, 201, 202, 205, 208, 218, 231, 269, 279, 298, 300, 303, 323, 324, 340 y 344 no se evaluaron, ya que estas posiciones contenían alaninas o cisteínas endógenas. Los datos mostrados son puntuaciones Z para la unión de (A) bslgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC, (B) bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC, (C) bslgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC, y (D) bslgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC. Se excluyeron los residuos ocultos con una puntaje Z justo por debajo de -1,5 que se predijo que estaban separados espacialmente de la mayoría de los residuos de pérdida de unión expuestos en la superficie (para bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: L281 [Puntaje Z: -1,57] y P326 [Puntaje Z: -1,54]; y para bslgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: L273 [Puntaje Z: -1,58], L281

[Puntaje Z:-1,65], N294 [Puntaje Z:-1,57], L309 [Puntaje Z:-1,63] y P326 [Puntaje Z:-1,67]).

Figura 16(I): Inducción de citotoxicidad in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en células tumorales de diferentes indicaciones usando células T como

- 5 células efectoras. Se incubaron células tumorales con concentraciones crecientes de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR o anticuerpos control (bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR) y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 4:1. Se determinó la citotoxicidad (disminución de la supervivencia) mediante la medida del porcentaje de
- 10 células tumorales viables después de 72 horas de incubación. Los datos mostrados son % promedio de la supervivencia $\pm$ SEM de pocillos por duplicado de un donante representativo de al menos tres donantes ensayados. A. Citotoxicidad (disminución de la supervivencia) inducida en líneas celulares de cáncer de páncreas; B. Citotoxicidad (disminución de la supervivencia) inducida en líneas celulares de
- 15 cáncer de cuello uterino.

Figura 16(II): Valores de IC50 de citotoxicidad inducida in vitro por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en líneas de células tumorales de diferentes indicaciones usando células T como células efectoras. Se analizaron los valores de

- IC50 de la citotoxicidad mediada por células T inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en células tumorales de las indicaciones indicadas utilizando
- 20 el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se presentan como valores promedio de IC50 de al menos tres donantes diferentes (véase la Tabla 10) $\pm$ SD.

Figura 17(I): Activación in vitro de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de células tumorales de diferentes indicaciones. Se

- 25 incubaron células tumorales con concentraciones crecientes de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR o anticuerpos control (bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR y células T aisladas como células efectoras en una proporción de E:T de 4:1 durante 72 horas. Se midió la
- 30 activación de células T por la sobreexpresión de CD69 (% de células CD69+) con poblaciones de células T CD4⁺ (paneles de la izquierda) y CD8⁺ (paneles de la

derecha). Los datos mostrados son % promedio de células CD69+ $\pm$ SD de pocillos duplicados de un donante representativo de al menos tres donantes ensayados. A. Activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de la línea de células de cáncer de páncreas BxPc-3; B. Activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de la línea de células de cáncer de páncreas PANC-1; C. Activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de la línea de células de cáncer de cuello uterino SiHa; D. Activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de la línea de células de cáncer de cuello uterino Ca Ski.

Figura 17(II): Valores de EC50 de activación in vitro de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en presencia de líneas de células tumorales de diferentes indicaciones. Se analizaron los valores de EC50 de la activación de células T (% de células CD69+ en las poblaciones de células T CD4+ y CD8+) inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en cocultivo con líneas de células tumorales de las diferentes indicaciones utilizando el programa de computación GraphPad Prism V7.02. Los datos se presentan como valores promedio de EC50 de por lo menos tres donantes diferentes (véase la Tabla 10) $\pm$ SD. A. Valores de EC50 de la activación de células T CD4+ inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en presencia de las líneas de células tumorales indicadas; B. Valores de EC50 de la activación de células T CD8+ inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en presencia de las líneas de células tumorales indicadas.

Descripción detallada

25 Definiciones

El término “anticuerpo” como se usa en la presente tiene como intención referirse a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse de manera específica a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas y/o específicas de tumor con una vida media de periodos significativos de tiempo, tal

como por lo menos aproximadamente 30 minutos, por lo menos aproximadamente 45 minutos, por lo menos aproximadamente una hora, por lo menos aproximadamente dos horas, por lo menos aproximadamente cuatro horas, por lo menos aproximadamente 8 horas, por lo menos aproximadamente 12 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas o más, por lo menos aproximadamente 48 horas o más, por lo menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro periodo definido de manera funcional relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, aumentar, y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión de anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo sea internalizado). La región de unión (o dominio de unión que se puede usar en la presente, ambos tienen el mismo significado) que interacciona con un antígeno, comprende regiones variables de las cadenas pesada y liviana de la molécula de inmunoglobulina. Las regiones constantes de los anticuerpos (Abs) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos huéspedes o factores, que incluyen diferentes células del sistema inmunológico (tales como células efectoras) y componentes del sistema de complemento tal como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento.

En el contexto de la presente invención, el término “anticuerpo” incluye un anticuerpo monoclonal (mAb), un polipéptido similar a anticuerpo, tal como un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado, así como un “fragmento de anticuerpo” o un “fragmento del mismo” que retiene la capacidad de unirse de manera específica al antígeno (fragmento de unión al antígeno) provisto por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos, y técnicas recombinantes, y que retienen la capacidad de conjugarse a una toxina. Un anticuerpo como se define de acuerdo con la invención puede poseer cualquier isotipo a menos que la divulgación se limite de otra manera en la presente.

Como se indicó precedentemente, el término anticuerpo como se usa en la presente, a menos que el contexto lo indique o contradiga de manera clara, incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar de manera específica, tal como unirse, al antígeno. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser ejercida por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa.

Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en el dominio variable de la cadena liviana (VL), dominio variable de cadena pesada (VH), dominios de región constante de la cadena liviana (CL) y dominio de región constante de la cadena pesada 1 (CH1), o un anticuerpo monovalente como se describe en WO 2007/059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb Ward y col., Nature 341, 544-546 (1989), que consiste esencialmente en un dominio VH y también es llamado anticuerpo dominio Holt y col; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90; (vi) camélidos o nanobodies Revets y col; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24 y (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite armarlos como una cadena proteica individual en la cual el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena individual o Fv de cadena individual (scFv), véase por ejemplo Revets y col; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24 y Bird y col., Science 242, 423-426 (1988). Dichos anticuerpos de cadena individual están abarcados dentro del término anticuerpo a menos que se indique de otra manera o que el contexto lo indique de manera clara. A pesar de que dichos fragmentos en general están incluidos en el significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno de manera independiente son características únicas de la presente invención, que exhiben diferentes propiedades biológicas y utilidades. Estos y otros fragmentos de anticuerpo útiles en el contexto de la presente invención se describen de manera adicional en la presente.

Un anticuerpo se puede producir y recolectar de diferentes sistemas de expresión o producción *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo a partir de células huéspedes modificadas de manera recombinante, de hibridomas o sistemas que usan extractos celulares que apoyan la transcripción y/o traducción *in vitro* de secuencias de ácido nucleico

que codifican para el anticuerpo. Se debe comprender que una multitud de diferentes anticuerpos, siendo los anticuerpos como se define en el contexto de la presente invención, es una que se puede proveer mediante la producción de cada anticuerpo por separado en un sistema de producción como se mencionó
5 precedentemente y la mezcla posterior de los anticuerpos, o por producción de varios anticuerpos en el mismo sistema de producción.

El término “cadena pesada de inmunoglobulina” o “cadena pesada de una inmunoglobulina” como se usa en la presente tiene como intención referirse a una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada típicamente está
10 comprendida por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada (abreviada en la presente como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de la cadena pesada típicamente está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. El término “inmunoglobulina” como se usa en la presente tiene como intención
15 referirse a una clase de glicoproteína relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas livianas (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), potencialmente interconectadas las cuatro por puentes disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada (véase por ejemplo Fundamental Immunology Capítulo 7 (Paul, W.,
20 ed., 2da ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas mediante puentes disulfuro en la llamada “región bisagra”. De manera igual a las cadenas pesadas, cada cadena liviana típicamente está comprendida por varias regiones; una región variable de la cadena liviana (abreviada en la presente como VL) y una región
25 constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana típicamente está comprendida por un dominio, CL. Además, las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que puede ser hipervariable en la secuencia y/o forma de bucles definidos estructuralmente), también llamadas regiones determinantes de complementariedad
30 (CDR), interespaciadas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones esqueleto (FR). Cada VH y VL típicamente está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal en el

siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR se definen de acuerdo a IMGT (véase Lefranc MP. y col., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999] y Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)).

5 Cuando se usan en la presente, los términos “media molécula”, “brazo Fab” y “brazo” se refiere a un par cadena pesada-cadena liviana. Cuando se describe que un anticuerpo biespecífico comprende anticuerpo de media molécula “derivado de” un primer anticuerpo, y un anticuerpo de media molécula “derivado de” un segundo anticuerpo, el término “derivado de” indica que el anticuerpo biespecífico fue generado por recombinación, mediante cualquier método conocido, de dichas
10 medias moléculas de cada uno del primero y del segundo anticuerpos en el anticuerpo biespecífico resultante. En este contexto, “recombinación” no se tiene como intención limitarlo a cualquier método particular de recombinación y por lo tanto incluye todos los métodos para producir anticuerpos biespecíficos descritos en la presente más adelante, que incluye por ejemplo recombinación mediante
15 intercambio de medias moléculas, así como recombinación a nivel del ácido nucleico y/o mediante la coexpresión de dos medias moléculas en las mismas células.

El término “región de unión a antígeno” o “región de unión” como se usa en la presente, se refiere a una región de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse al antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula, tal como un polipéptido, por
20 ejemplo presente en una célula, bacteria, o virión. Los términos “antígeno” y “diana” se pueden usar, a menos que el contexto lo contradiga, como sinónimos en el contexto de la presente invención. Los términos “región de unión a antígeno” y “sitio de unión al antígeno” se pueden usar, a menos que el contexto lo contradiga, como sinónimos en el contexto de la presente invención.

25 El término “bloquea la unión” o “bloquea la unión de un anticuerpo” o “bloqueo de la unión de manera cruzada” o “bloquea de manera cruzada la unión” se refiere a la situación en la cual un anticuerpo unido a un antígeno específico previene la unión del segundo anticuerpo al mismo antígeno y viceversa. En ausencia del otro anticuerpo, cada anticuerpo tiene la capacidad de unirse al antígeno determinado
30 por una respuesta de unión significativa, mientras que uno de los anticuerpos carece de respuesta de unión cuando el anticuerpo está presente. La capacidad de un

anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo se puede determinar por interferometría en biocapa en un formato de ensayo de agrupamiento de epitopes sandwich clásico, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 3 en la presente solicitud y en Abdiche y col. (Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. 5 Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. Anal Biochem. 2009; 386(2): 172-180). Brevemente, en un ensayo de agrupamiento de epitopes sandwich, se ensaya un anticuerpo en solución para la unión a su antígeno específico que primero es capturado mediante un anticuerpo inmovilizado. En el contexto de la presente invención, un anticuerpo no bloquea la unión de otro anticuerpo si tiene la capacidad de “desplazar” al otro anticuerpo, de acuerdo con la 10 definición de “desplazamiento” más adelante. Los términos “bloquea la unión” y “bloqueo de la unión de un anticuerpo” un “bloqueo de la unión de manera cruzada” y “bloquea la unión de manera cruzada” se pueden usar, a menos que el contexto lo contradiga, como sinónimos en el contexto de la presente invención. 15 Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo se determina utilizando anticuerpos de longitud completa.

El término “desplazamiento” o “capacidad para desplazar” o “que desplaza” se refiere a la situación en donde dos anticuerpos perturban la unión del otro a un antígeno por alteración de manera cinética de la unión del otro a su antígeno 20 específico mediante la formación de un complejo trimolecular transitorio, que colapsa rápidamente por retención de un anticuerpo al antígeno y desplazamiento del otro. El desplazamiento de anticuerpo se define en Abdiche y col., 2017 (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, y col. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535). El desplazamiento de anticuerpo se puede determinar mediante interferometría en biocapa utilizando biosensores libres de marca en tiempo real en un formato de ensayo en sandwich clásico como se describe en Abdiche y col. 2017 y en el Ejemplo 4 en la presente solicitud. Preferiblemente, el desplazamiento de anticuerpo se determina utilizando 30 anticuerpos que tienen el formato de IgG.

El término “unión” como se usa en la presente se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno o diana predeterminado, típicamente con una afinidad de unión correspondiente a una K_D de $1E^{-6}$ M o menor, por ejemplo $5E^{-7}$ M o menor, $1E^{-7}$ M o menor, tal como $5E^{-8}$ M o menor, tal como $1E^{-8}$ M o menor, tal como $5E^{-9}$ M o menor, o tal como $1E^{-9}$ M o menor, cuando se determina por interferometría en biocapa utilizando el anticuerpo como el ligando y el antígeno como el analito y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es por lo menos diez veces menor, tal como por lo menos 100 veces menor, por ejemplo por lo menos 1.000 veces menor, tal como por lo menos 10.000 veces menor, por ejemplo por lo menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno relacionado de manera cercana.

El término “ K_D ” (M), como se usa en la presente, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, y se obtiene por división de k_d por k_a .

El término “ k_d ” (seg^{-1}), como se usa en la presente, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también es referido como el valor k_{off} u *off-rate*.

El término “ k_a ” ($\text{M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$), como se usa en la presente, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también es referido como el valor k_{on} u *on-rate*.

El término “5T4” como se usa en la presente, se refiere a la proteína con el título 5T4, que también es referida como glicoproteína trofoblástica, antígeno oncofetal 5T4, glicoproteína trofoblástica oncofetal 5T4, TPBG, WAIF1 y M6P1. Es una proteína transmembrana de entre 72 y 80 kDa con un núcleo con numerosas glicosilaciones en N. En humanos (*Homo sapiens*), la proteína 5T4 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 1 (glicoproteína trofoblástica de humanos: No. de acceso a Uniprot Q13641). En la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 1, los residuos de aminoácidos 1-31 son un péptido señal, y los residuos de aminoácidos 32-420 son el polipéptido maduro. En monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*), la proteína 5T4 tiene la

secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 2 (No. de acceso a Uniprot Q4R8Y9). En la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 2, los residuos de aminoácidos 1-34 son un péptido señal, y los residuos de aminoácidos 35-420 son el polipéptido maduro. En pollos (*Gallus gallus*), la proteína
5 5T4 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 3 (No. de acceso a Uniprot R4GM46). En la secuencia que se muestra en la SEQ ID No: 3, los residuos de aminoácidos 1-27 son un péptido señal, y los residuos de aminoácidos 28-379 son el polipéptido maduro.

El término “CD3” como se usa en la presente, se refiere a la proteína del cúmulo de
10 diferenciación 3 que es parte del complejo proteico correceptor de células T y está compuesto por cuatro cadenas diferentes. El CD3 también se encuentra en otras especies, y por lo tanto, el término “CD3” no se limita a CD3 de humano a menos que el contexto lo contradiga. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3γ (gamma) (cadena CD3γ de humano UniProtKB/Swiss-Prot No P09693, o CD3γ de
15 mono cinomolgo UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7), una cadena CD3δ (delta) (CD3δ de humano UniProtKB/Swiss-Prot No P04234, o CD3δ de mono cinomolgo UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8), dos cadenas CD3ε (épsilon) (CD3ε de humano UniProtKB/Swiss-Prot No P07766; los residuos de aminoácidos 1-22 son de un péptido señal y los residuos de aminoácidos 23-207 son el polipéptido CD3ε maduro,
20 que se identifica en la presente como la SEQ ID No: 4; CD3ε de mono cinomolgo UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5; o CD3ε de mono rhesus UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9), y una cadena CD3ζ-cadena (zeta) (CD3ζ de humano UniProtKB/Swiss-Prot No P20963, CD3ζ de mono cinomolgo UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de células T
25 (TCR) y generan una señal de activación en linfocitos T. Las moléculas de TCR y CD3 comprenden en conjunto el complejo TCR.

El término “región de unión a anticuerpo” se refiere a una región del antígeno, que comprende el epítopo al cual se une el anticuerpo. Una región de unión a anticuerpo se puede determinar mediante agrupamiento de epítopos utilizando interferometría
30 en biocapa, por barrido de alaninas, o mediante ensayo de entremezclado (usando construcciones de antígeno en las cuales las regiones del antígeno se intercambian

con las de otra especie y determinación de si el anticuerpo aún se une al antígeno o no). Los aminoácidos en la región de unión a anticuerpo que están involucrados en la interacción con el anticuerpo se pueden determinar mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio y mediante cristalografía del anticuerpo
5 unido a su antígeno.

El término “epitope” se refiere a un determinante antigénico al que se une de manera específica un anticuerpo. Los epitopes habitualmente consisten en agrupamientos de superficie de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares o una combinación de los mismos y habitualmente tienen características
10 estructurales en tres dimensiones específicas, así como características de carga específicas. Los epitopes conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes. El epitope puede comprender residuos de aminoácidos que están involucrados directamente en la unión, y otros residuos de aminoácidos,
15 que no están involucrados directamente en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están bloqueados o cubiertos de manera eficaz por el anticuerpo cuando se une al antígeno (en otras, el residuo de aminoácido está dentro o muy cercano a la huella del anticuerpo específico).

Los términos "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición del anticuerpo monoclonal", "mAb", o similar, como se usan en la presente se refieren a una
20 preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una especificidad y afinidad de unión únicas por un epitope particular. En consecuencia, el término “anticuerpo monoclonal de humano” se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de
25 unión única que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal. Los anticuerpos monoclonales de humano pueden ser producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén
30 de cadena liviana de humano, fusionados a una célula inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir a partir de células huéspedes

modificadas de manera recombinante, o sistemas que usan extractos celulares que ayudan a la transcripción y/o traducción *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo.

5 El término “isotipo” como se usa en la presente se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM) o cualquier alotipo de la misma, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f)) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena liviana kappa (κ) o lambda (λ).

10 El término “anticuerpo de longitud completa” cuando se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo parental o variante) que comprende uno o dos pares de cadenas pesada y liviana, en donde cada uno contiene todos los dominios constantes y variables de las cadenas pesada y liviana que se encuentran de manera habitual en un par de cadena pesada-cadena liviana de un anticuerpo de tipo salvaje de ese isotipo. En un anticuerpo variante de longitud completa, los

15 dominios constantes y variables de las cadenas pesada y liviana pueden contener en particular sustituciones de aminoácidos que mejoren las propiedades funcionales del anticuerpo cuando se compara con el anticuerpo parental o de tipo salvaje de longitud completa. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención se puede producir por un método que comprende los pasos de (i) clonar

20 las secuencias de CDR en un vector adecuado que comprende la secuencia de la cadena pesada completa y la secuencia de la cadena liviana completa, y (ii) expresar las secuencias completas de las cadena pesada y liviana en sistemas de expresión adecuados. La persona con experiencia sabe cómo producir un anticuerpo de longitud completa cuando se comienza a partir de secuencias CDR o secuencias

25 de región variable completas. Por lo tanto, la persona con experiencia debería saber cómo generar un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención.

El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, tiene como intención incluir anticuerpos que tienen regiones variables y esqueletos derivados de

30 secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana y un dominio constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos de humano de la invención pueden incluir

residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones, inserciones o eliminaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo de humano”, como
5 se usa en la presente, no tiene como intención incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies no humanas, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de esqueleto de humano.

El término “anticuerpo humanizado” como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo no humano modificado genéticamente, que contiene los dominios
10 constantes de anticuerpo de humano y dominios variables no humanos para contener un nivel elevado de homología de secuencia con los dominios variables de humano. Esto se puede lograr mediante el injerto de las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpo no humano, que forman en conjunto el sitio de unión al antígeno, en una región esqueleto aceptora de humano homóloga
15 (FR) (véase WO92/22653 y EP0629240). Con el objetivo de reconstituir por completo la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo parental, se puede requerir la sustitución de residuos esqueleto del anticuerpo parental (es decir el anticuerpo no humano) en las regiones esqueleto de humano (retromutaciones). El modelado de homología estructural puede ayudar a identificar los residuos de
20 aminoácidos en las regiones esqueleto que son importantes para las propiedades de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de CDR no humanas, principalmente regiones esqueleto de humano que comprenden de manera opcional una o más retromutaciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos no humana, y regiones constantes completamente de
25 humano. De manera opcional, se pueden aplicar modificaciones de aminoácidos adicionales, que no necesariamente son retromutaciones, para obtener un anticuerpo humanizado con características preferidas, tal como afinidad y propiedades bioquímicas.

El término “región Fc” como se usa en la presente, se refiere a una región que
30 comprende, en la dirección del extremo N al C terminal del anticuerpo, por lo menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. Una región Fc del anticuerpo

puede mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluye diferentes células del sistema inmunológico (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento.

El término “región bisagra” como se usa en la presente se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo la región bisagra de un anticuerpo IgG1 de humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu como se describe en Kabat, E.A. y col., Sequences of proteins of immunological interest. 5ta Edición – Departamento de Servicios de Salud y Humanos de EE.UU., Publicación de NIH No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991). Sin embargo, la región bisagra también puede ser de cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente.

El término “región CH1” o “dominio CH1” como se usa en la presente se refiere a la región CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo la región CH1 de un anticuerpo IgG1 de humano corresponde a los aminoácidos 118-215 de acuerdo con la numeración Eu como se describe en Kabat (ibídem). Sin embargo, la región CH1 también puede ser de cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente.

El término “región CH2” o “dominio CH2” como se usa en la presente se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo la región CH2 de un anticuerpo IgG1 de humano corresponde a los aminoácidos 231-340 de acuerdo con la numeración Eu como se describe en Kabat (ibídem). Sin embargo, la región CH2 también puede ser de cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente.

El término “región CH3” o “dominio CH3” como se usa en la presente se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo la región CH3 de un anticuerpo IgG1 de humano corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con la numeración Eu como se describe en Kabat (ibídem). Sin embargo, la región CH3 también puede ser de cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente.

El término “funciones efectoras mediadas por Fc”, como se usa en la presente, tiene como intención referirse a funciones que son una consecuencia de la unión de un polipéptido o anticuerpo a su diana o antígeno en una membrana celular en donde la función efectora mediada por Fc se atribuye a la región Fc del polipéptido o anticuerpo. Los ejemplos de funciones mediadas por Fc incluyen (i) unión de C1q, (ii) activación del complemento, (iii) citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), (iv) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), (v) unión al receptor de Fc-gamma (FcγR), (vi) entrecruzamiento de antígeno mediada por FcγR dependiente de anticuerpo, (vii) fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), (viii) citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDCC), (ix) citotoxicidad potenciada por complemento, (x) unión al receptor de complemento de un anticuerpo opsonizado mediada por el anticuerpo, (xi) opsonización, y (xii) una combinación de cualquiera de (i) a (xi).

El término “no reactivo”, “inerte” o “no activante” como se usa en la presente, se refiere a una región Fc que al menos no tiene la capacidad de unirse a cualquier FcγR, inducir entrecruzamiento mediado por Fc de los FcγRs, o inducir entrecruzamiento mediado por FcγR de antígenos diana a través de dos regiones Fc de anticuerpos individuales, o no tiene la capacidad de unirse a C1q. La no reactividad de una región Fc de un anticuerpo, se puede ensayar usando el anticuerpo en un formato monoespecífico o biespecífico.

El término “de longitud completa” cuando se usa en el contexto de un anticuerpo indica que el anticuerpo no es un fragmento, pero contiene todos los dominios del isotipo particular encontrado de manera habitual para ese isotipo en la naturaleza, por ejemplo los dominios VH, CH1, CH2, CH3, bisagra, VL y CL de un anticuerpo IgG1.

El término “anticuerpo monovalente”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula de anticuerpo que puede interactuar con un epítopo específico en un antígeno, solo con un dominio de unión a antígeno (por ejemplo un brazo Fab). En el contexto de un anticuerpo biespecífico, “unión del anticuerpo monovalente” se refiere a la unión del anticuerpo biespecífico a un epítopo

específico en un antígeno solo con un dominio de unión a antígeno (por ejemplo un brazo Fab).

El término “anticuerpo monoespecífico” en el contexto de la presente invención, se refiere a un anticuerpo que tiene especificidad de unión solo por un único epítopo. El
5 anticuerpo puede ser un anticuerpo monovalente monoespecífico (es decir que porta solo una región de unión a antígeno) o un anticuerpo bivalente monoespecífico (es decir un anticuerpo con dos regiones de unión a antígeno idénticas).

El término “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo que tiene dos dominios de unión a antígeno no idénticas, por ejemplo dos brazos Fab no idénticos
10 o dos brazos Fab con regiones CDR no idénticas. En el contexto de esta invención, los anticuerpos biespecíficos tienen especificidad por al menos dos epítopos diferentes. Dichos epítopos pueden estar en el mismo antígeno o diana o diferentes. Si los epítopos están en diferentes antígenos, dichos antígenos pueden estar en la misma célula o en diferentes células, tipos celulares o estructuras, tal como matriz
15 extracelular o vesículas y proteína soluble. Un anticuerpo biespecífico entonces puede tener la capacidad de entrecruzar múltiples antígenos, por ejemplo dos células diferentes.

El término “anticuerpo bivalente” se refiere a un anticuerpo que tiene dos regiones de unión a antígeno, que se unen a epítopos en uno o dos dianas o antígenos o se
20 une a uno o dos epítopos en el mismo antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo bivalente puede ser un anticuerpo bivalente monoespecífico o un anticuerpo bivalente biespecífico.

El término “aminoácido” y “residuo de aminoácido” se pueden usar como sinónimos en la presente, y no se deben interpretar como limitantes. Los aminoácidos son
25 compuestos orgánicos que contienen grupos funcionales amina ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$), junto con una cadena lateral (grupo R) específica para cada aminoácido. En el contexto de la presente invención, los aminoácidos se pueden clasificar en base a la estructura y características químicas. Por lo tanto, las clases de aminoácidos se pueden reflejar en una o ambas de las siguientes tablas:

Clasificación principal en base a la estructura y caracterización química general del grupo R

Clase	Aminoácido
Residuos ácidos	D y E
Residuos básicos	K, R y H
Residuos no cargados hidrofílicos	S, T, N y Q
Residuos no cargados alifáticos	G, A, V, L e I
Residuos no cargados no polares	C, M y P
Residuos aromáticos	F, Y y W

Clasificación física y funcional alternativa de residuos de aminoácidos

Clase	Aminoácido
Residuos que contienen grupos hidroxilo	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W y Y
Residuos hidrofóbicos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W y Y
Residuos con carga negativa	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos con carga positiva	H, K y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos involucrados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

La sustitución de un aminoácido por otro se puede clasificar como una sustitución conservativa o no conservativa. En el contexto de la invención, una “sustitución

5

conservativa” es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene características estructurales y/o químicas similares, dicha sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido de la misma clase como se define en cualquiera de las dos tablas precedentemente: por ejemplo, la leucina se puede sustituir por isoleucina ya que ambos son alifáticos, hidrofóbicos ramificados. De manera similar, el ácido aspártico se puede sustituir por ácido glutámico ya que ambos son residuos con carga negativa, pequeños.

En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como:

aminoácido original – posición – aminoácido sustituyente;

En referencia a la nomenclatura bien reconocida para los aminoácidos, el código de tres letras, o un código de una letra, se usa, incluyendo los códigos “Xaa” o “X” para indicar cualquier residuo de aminoácido. Por lo tanto, Xaa o X típicamente pueden representar cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. El término “de origen natural” como se usa en la presente se refiere a uno cualquiera de los siguientes residuos de aminoácidos; glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, prolina, triptofano, fenilalanina, tirosina, metionina y cisteína. En consecuencia, la notación “K409R” o “Lys409Arg” indica que el anticuerpo comprende una sustitución de Lisina por Arginina en la posición del aminoácido 409. La sustitución de un aminoácido en una posición dada por cualquier otro aminoácido se refiere como:

aminoácido original – posición; o por ejemplo “K409”

Para una modificación en donde el o los aminoácidos originales y/o el o los aminoácidos sustituyentes pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, el o los aminoácidos adicionales pueden estar separados por “,” o “/”. Por ejemplo la sustitución de Lisina por Arginina, Alanina, o Fenilalanina en posición 409 es:

“Lys409Arg,Ala,Phe” o “Lys409Arg/Ala/Phe” o “K409R,A,F” o “K409R/A/F” o “K409 a R, A, o F”.

Dicha designación se puede usar como sinónimo en el contexto de la invención pero tiene el mismo significado y propósito.

Además, el término “una sustitución” abarca una sustitución por uno o los otros diecinueve aminoácidos naturales, o por otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido K en posición 409 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P y 409Y. Es decir, además, equivalente a la designación 409X, en donde la X designa cualquier aminoácido diferente del aminoácido original. Estas sustituciones también se pueden designar K409A, K409C, etc. o K409A,C, etc. o K409A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a cada una y todas las posiciones mencionadas en la presente, para que incluyan de manera específica en la presente cualquiera de dichas sustituciones.

El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede comprender una eliminación de un residuo de aminoácido. Dicha eliminación se puede indicar como “del”, e incluye, por ejemplo, escribirla como K409del. Por lo tanto, en dichas formas de realización, la Lisina en la posición 409 ha sido eliminada de la secuencia de aminoácidos.

El término “célula huésped”, como se usa en la presente, tiene como intención referirse a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión. Se debe comprender que dichos términos tienen como intención referirse a no solo la célula sujeto en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones posteriores debido a mutación o influencias del entorno, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero igual están incluidas dentro del alcance del término “célula huésped” como se usa en la presente. Las células huéspedes recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, células Expi293F, células PER.C6, células NS0, y células linfocíticas, y células procariotas tales como *E. coli* y otros huéspedes eucariotas tales como células vegetales y hongos.

El término “transfectoma”, como se usa en la presente, incluye células huéspedes eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo o un antígeno diana, tales como células CHO, células PER.C6, células NS0, células HEK-293, células Expi293F, células vegetales, u hongos, que incluyen células de levaduras.

5 Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, Trends Genet.
10 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalidad por apertura de brecha de 10, penalidad por extensión de brecha de 0,5, y matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). Se usan los resultados de Needle marcados como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) como el porcentaje de identidad y se calcula como a continuación:

15
$$\frac{(\text{Residuos idénticos} \times 100)}{(\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de no coincidencias en el alineamiento})}.$$

La retención de residuos similares también se puede medir o como alternativa con una puntuación de similitud, determinada por el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible en NCBI utilizando configuraciones estándares
20 BLOSUM62, Brecha abierta =11 y Brecha extendida =1). Las variantes adecuadas típicamente exhiben por lo menos aproximadamente 45%, tal como por lo menos aproximadamente 55%, por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, o más (por ejemplo,
25 aproximadamente 99%) de similitud a la secuencia parental.

El término “internalizado” o “internalización” como se usa en la presente, se refiere a un proceso biológico en donde las moléculas tal como el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, son englobadas por la membrana celular e incorporados al interior de la célula. La internalización también puede ser referida como
30 “endocitosis”.

Anticuerpos

En un primer aspecto, la presente invención provee un anticuerpo que comprende por lo menos una región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 (glicoproteína de trofoblasto), donde el anticuerpo es capaz de bloquear la unión a 5T4 de un

5 anticuerpo que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 5 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 9 [059],
- 10 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 12 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 16 [076],
- c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 19 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 23 [085],
- 15 d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 26 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 30 [106],
- e) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 33 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 37 [127],
- 20 f) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 40 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 44 [207]; y
- g) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 47 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 51 [226].
- 25

En particular, la invención provee un anticuerpo que comprende por lo menos una región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 (glicoproteína de trofoblasto), donde el anticuerpo puede bloquear la unión a 5T4 de un anticuerpo que comprende
30 una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se

establece en la SEQ ID N°: 5, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 9 [059].

En particular, el anticuerpo puede bloquear la unión a 5T4 de un anticuerpo que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 40 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 44 [207],
- 10 b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 47 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 51 [226]; y

un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 5 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 9 [059].

En algunas formas de realización particulares de la invención, el anticuerpo es capaz de bloquear la unión a 5T4 de un anticuerpo que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 20 a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 40 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 44 [207]; y
- 25 b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 47 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 51 [226]

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se caracterizan por tener especificidad por la 5T4 humana (*Homo sapiens*) o la capacidad de unirse a la misma. Por lo

tanto, la 5T4 según se menciona en la presente puede ser en particular la 5T4 humana, como por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 1.

En algunas formas de realización adicionales, los anticuerpos de la invención se caracterizan por tener especificidad por la 5T4 de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) o la capacidad de unirse a la misma, como por ejemplo especificidad por la 5T4 tanto humana como de mono cinomolgo o la capacidad de unirse a las mismas. La 5T4 de mono cinomolgo puede ser en particular el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 2.

En otras formas de realización adicionales, los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen especificidad por la 5T4 de pollo (*Gallus gallus*) o la capacidad de unirse a la misma, como por ejemplo especificidad por la 5T4 humana y 5T4 de pollo o por ejemplo especificidad por la 5T4 humana, de mono cinomolgo y de pollo o la capacidad de unirse a las mismas, donde la 5T4 de pollo en particular puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 3.

Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden tener especificidad o ser capaces de unirse a la 5T4 humana por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 1 y la 5T4 de mono cinomolgo, como por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 2.

Además, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden tener especificidad por o ser capaces de unirse a la 5T4 humana, como por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 1, 5T4 de mono cinomolgo como por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 2 y 5T4 de pollo., como por ejemplo el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 3.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden unir a la 5T4 humana, de mono cinomolgo y/o de pollo, con una afinidad de unión que corresponde a un valor de K_D de $1E-7$ M o menor, como por ejemplo un valor de K_D de aproximadamente $1E-7$ M o menor, $5E-8$ M o menor, aproximadamente $5E-8$ M o menor, $1E-8$ M o menor, aproximadamente $1E-8$ M o menor, $5E-9$ M o menor, aproximadamente $5E-9$ M o menor, como por ejemplo $1E-9$ M o menor o por ejemplo aproximadamente $1E-9$ M o menor, por ejemplo con una afinidad de unión correspondiente a un valor de K_D

que se encuentra dentro del rango entre $1\text{E-}7$ y $5\text{E-}10$ M, por ejemplo dentro del rango entre aproximadamente $1\text{E-}7$ y aproximadamente $5\text{E-}10$ M, por ejemplo entre $1\text{E-}7$ y $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre aproximadamente $1\text{E-}7$ y aproximadamente $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre $5\text{E-}8$ y $5\text{E-}10$ M, por ejemplo entre aproximadamente $5\text{E-}8$ y aproximadamente $5\text{E-}10$ M, por ejemplo entre $5\text{E-}8$ y $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre aproximadamente $5\text{E-}8$ y aproximadamente $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre $1\text{E-}8$ y $5\text{E-}10$ M, por ejemplo entre aproximadamente $1\text{E-}8$ y aproximadamente $5\text{E-}10$ M, por ejemplo entre $1\text{E-}8$ y $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre aproximadamente $1\text{E-}8$ y aproximadamente $1\text{E-}9$ M, por ejemplo entre $1\text{E-}8$ y $5\text{E-}9$ M o por ejemplo entre aproximadamente $1\text{E-}8$ y aproximadamente $5\text{E-}9$ M.

Aunque la capacidad de determinar la afinidad de un anticuerpo de unirse a su blanco se encuentra dentro de la capacidad de aquellos con experiencia en el arte, en particular la afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención con 5T4 se puede determinar mediante interferometría de biocapas, opcionalmente según se establece en el Ejemplo 2 de la presente.

Más específicamente, la afinidad de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar usando un procedimiento, por ejemplo un procedimiento de interferometría de biocapas, que comprende los siguientes pasos:

- I) Inmovilizar el anticuerpo en una cantidad de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ durante 600 segundos en un biosensor de captura de Fc de IgG anti-humano;
- II) Determinar la asociación durante un período de tiempo de 200 segundos y la disociación durante un período de tiempo de 1000 segundos de 5T4ECDHis (proteína madura de la SEQ ID N°: 99) o 5T4 de mono cinomolgo (proteína madura de la SEQ ID N°: 2, o mono cinomolgo proteína 5T4 recombinante (Cusabio; N° de cat. CSB-MP024093MOV), usando series de dilución de 2x dentro del rango entre 100 nM y $1,56\text{ nM}$.

III) Referir los datos a un control de solución amortiguadora de pH (0 nM).

La afinidad de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar en particular usando un anticuerpo según se define en cualquiera de las

reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo monoespecífico bivalente, como por ejemplo un anticuerpo que es una IgG1 de longitud completa.

En algunas formas de realización adicionales de la invención, el anticuerpo reconoce o se une a un epítopo o región de unión al anticuerpo o sitio de unión en 5T4, donde dicho sitio de unión o epítopo o región de unión al anticuerpo es reconocido por cualquiera de los anticuerpos que se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en:

- 10 a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 5 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 9 [059],
- b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 12 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 16 [076],
- 15 c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 19 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 23 [085],
- d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 26 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 30 [106],
- 20 e) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 33 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 37 [127],
- f) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 40 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 44 [207]; y
- 25 g) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 47 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 51 [226].

En otras formas de realización adicionales, el anticuerpo de acuerdo con la invención reconoce o se une a una región de unión al anticuerpo, un sitio de unión o epítopo en 5T4, que no es una región de unión al anticuerpo, un sitio de unión ni un

epitope, o que es diferente de una región de unión al anticuerpo, un sitio de unión al anticuerpo o un epitope, que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 87 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 88 [H8],
- b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 83 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 84 [A1]; y
- c) Un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 85 y una región VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 86 [A3].

En otras formas de realización, la unión a 5T4 del anticuerpo de acuerdo con la invención se bloquea mediante la unión a 5T4 de un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 85 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 86 [A3]. Un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL que se establecen en las SEQ ID N° 85 y 86 respectivamente, es el anticuerpo A3, uno de los tres anticuerpos anti-5T4 murinos que se divulgan en WO2007106744. Reformular: anticuerpo A3 con una sola sustitución de aa. ¿En las secuencias de CDR?

En aún otras formas de realización adicionales, el anticuerpo de acuerdo con la invención muestra el desplazamiento de un anticuerpo unido a 5T4 o al dominio extracelular de 5T4 marcado con His (por ejemplo, 5T4ECDHis/proteína madura de la SEQ ID N°: 99), donde dicho anticuerpo unido a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 85 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 86 [A3]. Este comportamiento de desplazamiento indica que el anticuerpo de la invención se une a un epitope diferente del epitope al que se une el anticuerpo A3, pero que puede ser adyacente o incluso puede estar superpuesto al epitope al que se une A3.

El "desplazamiento" o la capacidad de desplazar un anticuerpo unido se puede determinar en un ensayo de interferometría de biocapas, como por ejemplo en un ensayo que se realiza según se describe en el Ejemplo 4 de la presente solicitud.

5 El "bloqueo cruzado", o la capacidad de un anticuerpo según se lo define de acuerdo con la invención de bloquear la unión a 5T4 de otro anticuerpo se puede determinar utilizando un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), por ejemplo mediante un ensayo realizado según se describe en el Ejemplo 5.

En particular, el "bloqueo cruzado", o la capacidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención de bloquear la unión a 5T4 de otro anticuerpo, se determina como la
10 capacidad de un anticuerpo no conjugado de bloquear la unión de un anticuerpo conjugado, y opcionalmente se determina mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

i) Proveer un conjunto de muestras, donde cada muestra comprende una
15 mezcla de células SK-OV-3 de adenocarcinoma de ovario humano, un anticuerpo que se une a 5T4 y está conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC por las siglas en inglés de *Fluorescein IsoThioCyanate*), y un exceso de anticuerpo no conjugado dirigido hacia 5T4,

ii) Incubar las muestras durante 30 minutos a 4 °C, y posteriormente
20 someter las muestras a centrifugación,

iii) Retirar el sobrenadante de cada muestra y resuspender las células en
solución amortiguadora de pH y determinar la intensidad media de la
fluorescencia (MFI por las siglas en inglés de *Mean Fluorescence Intensity*) de FITC usando un citómetro de flujo; y

iv) Calcular el porcentaje de unión como:
25

*la diferencia de MFI entre células incubadas con una mezcla de anticuerpos conjugados con FITC o con anticuerpos no conjugados y células incubadas sin anticuerpos conjugados con FITC o con anticuerpos no conjugados, multiplicarla por 100 y luego dividir el
30 resultado por la diferencia de MFI entre las células incubadas con una mezcla de anticuerpos conjugados con FITC y anticuerpos IgG-b12 y*

las células incubadas sin anticuerpos conjugados con FITC o con anticuerpos no conjugados.

Aunque aquellos con experiencia en el arte estarán familiarizados con las tecnologías apropiadas para determinar la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a su blanco, o para desplazar otro anticuerpo unido a su blanco, la presente solicitud divulga procedimientos apropiados para determinar el bloqueo de la unión y el desplazamiento. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la capacidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención de bloquear la unión a 5T4 de otro anticuerpo o de desplazar a otro anticuerpo unido a 5T4, se puede determinar usando interferometría de biocapas, por ejemplo una interferometría de biocapas realizada según se describe en el Ejemplo 3.

En particular, la capacidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención de bloquear la unión a 5T4 de otro anticuerpo, o de desplazar otro anticuerpo unido a 5T4 se determina usando interferometría de biocapas mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- i) Inmovilizar un anticuerpo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en una cantidad de 20 µg/ml en una solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM un biosensor de 2ª Generación amino-reactivo activado,
 - ii) Inactivar el biosensor con el anticuerpo inmovilizado en etanolamina a pH 8,5,
 - iii) Sumergir el biosensor con el anticuerpo inmovilizado en una composición que comprende 3,6 µg/ml (100 nM) de la 5T4 ECDHis human (proteína madura de la SEQ ID N°: 99) por un período de tiempo de 500 segundos, y luego
 - iv) Sumergir el biosensor con el anticuerpo inmovilizado y 5T4 ECDHis en una composición que comprende 10 µg/ml del otro anticuerpo dirigido a 5T4 y determinar la respuesta de asociación durante un período de tiempo de 500 segundos;
- donde los pasos i)-iv) se llevan a cabo a una temperatura de 30 °C y con agitación a 1000 rpm.

Los anticuerpos que se proveen en la presente se pueden unir a un epítopo o región de unión al anticuerpo en 5T4 humana que comprende los residuos aminoácidos R73, Y92 y R94; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

- 5 En la presente también se proveen anticuerpos que se unen a un epítopo o región de unión al anticuerpo en 5T4 humana que comprende los residuos aminoácidos S69, R73, Y92 y R94; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

- En la presente también se proveen anticuerpos que se unen a un epítopo o región
10 de unión al anticuerpo en 5T4 humana que comprende los residuos aminoácidos R73, T74, Y92, R94 y N95; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

- En base a los resultados provistos en el Ejemplo 16 de la presente, sin deseos de quedar limitados a una teoría, se expresa la hipótesis de que uno o más de estos
15 residuos aminoácidos (es decir, S69, R73, T74, Y92, R94 y N95) está(n) involucrado(s) directamente con la unión al anticuerpo, por ejemplo mediante interacciones no covalentes; por ejemplo, con residuos aminoácidos dentro de las secuencias de CDR del anticuerpo. La hipótesis está respaldada por el hecho de que en la estructura de 5T4 se identificó a estos residuos expuestos en la superficie
20 (4cnm; provisto en RCSB PDB Protein Data Bank; DOI: 10.2210/pdb4CNM/pdb) según se publicó en Zhao, Y., Malinauskas, T., Harlos, K. y Jones, EY (2014). *Structural insights into the inhibition of Wnt signaling by cancer antigen 5T4/Wnt-activated inhibitory factor 1*. Structure, 22(4), 612–620.

- Uno o más de los siguientes residuos aminoácidos adicionales pueden estar
25 involucrados en la unión al anticuerpo, por ejemplo pueden estar involucrados indirectamente en la unión, por ejemplo influyendo sobre el plegamiento de proteínas y/o el posicionamiento de uno o más residuos aminoácidos involucrados directamente en la unión al anticuerpo: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ
30 ID N°: 1. En particular, L89, F111, L117, F138, L144 se han identificado como parte

de un núcleo hidrofóbico dentro de 5T4 según lo han descrito Zhao y colaboradores, *Structure*, 22 (4), 612–620.

Además, el anticuerpo que se divulga en la presente puede [unirse a] un epítopo o región de unión al anticuerpo en la 5T4 humana en cuyo interior los residuos aminoácidos R73, Y92 y R94 están involucrados directamente en la unión al anticuerpo, y donde uno o más de los residuos aminoácidos F111, F138, L144 y D148 están involucrados indirectamente en dicha unión la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

El anticuerpo que se provee en la presente se puede unir a un epítopo o región de unión al anticuerpo en la 5T4 humana en cuyo interior los residuos aminoácidos S69, R73, Y92 y R94 están involucrados directamente en la unión al anticuerpo, y donde uno o más de los residuos aminoácidos F111, F138 y D148 están involucrados indirectamente en dicha unión la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Además, la presente invención provee anticuerpos que se unen a un epítopo o región de unión al anticuerpo en la 5T4 humana en cuyo interior los residuos aminoácidos R73, T74, Y92, R94 y N95 están involucrados directamente en la unión al anticuerpo, y donde el residuo aminoácido F138 está involucrado indirectamente. En dicha unión la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Los residuos aminoácidos comprendidos por dicho epítopo o región de unión al anticuerpo y, opcionalmente, los uno o más residuos aminoácidos adicionales que están involucrados indirectamente en la unión se pueden identificar mediante barrido de alanina de 5T4 humana con la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID N°: 1. o la secuencia polipeptídica madura de la SEQ ID N°: 1, o mediante barrido de alanina de un polipéptido que comprende los residuos aminoácidos 32-355 de la SEQ ID N°: 1.

El barrido de alanina se puede realizar en particular según se indica en el Ejemplo 16 de la presente o esencialmente según se indica en dicho Ejemplo.

Además, el barrido de alanina se puede realizar mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- 5 i) Expresar polipéptidos mutantes de la 5T4 humana en los cuales todos los residuos de aminoácidos en el dominio extracelular de la 5T4 humana (correspondientes a los residuos de aminoácidos 32-355 de la SEQ ID N°: 1), excepto cisteínas y alaninas, se sustituyen individualmente por alanina, y los polipéptidos de la 5T4 de tipo salvaje (residuos de aminoácidos 32-355 de la SEQ ID N°: 1) se sustituyen individualmente en células de riñón embrionario humano, por ejemplo células HEK 293, de manera tal que por cada 5T4 mutante o de tipo salvaje se provee una muestra que comprende 70-90.000 células, por ejemplo 80.000 células,
- 10 ii) Incubar las células de cada muestra con 20 µl de dicho anticuerpo, que es un anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (3 µg/ml; en solución amortiguadora FACS (solución amortiguadora salina al fosfato [PBS; Lonza, N° de cat. BE17-517] + 0,1% [p/v] de BSA [Roche, N° de cat. 10735086001] + 0,02% [p/v] de azida sódica [NaN₃; EMELCA Bioscience, N° de cat. 41920044-3]) y volver a suspender las células de cada muestra en 30 µl de solución amortiguadora FACS,
- 15 iii) Determinar, para cada muestra, la cantidad promedio de anticuerpo unido por célula como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (gMFI) para la población de células individuales, viables, en dicha muestra y normalizar los datos para cada anticuerpo de prueba contra la intensidad de unión de un anticuerpo control de bloqueo no cruzado específico de 5T4 usando la siguiente ecuación:
- 20

$$\text{gMFI normalizada}_{\text{posición aa}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{gMFI}_{\text{Ab de prueba}}}{\text{gMFI}_{\text{Ab control}}} \right)$$

25

donde la 'posición aa' se refiere a la posición que fue mutada por una alanina,

donde el puntaje Z se calcula para expresar la pérdida o el aumento de unión del anticuerpo, de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$\text{Puntaje Z (cambio)} = \frac{\text{gMFI normalizada}_{\text{posición aa}} - \mu}{\sigma}$$

5 donde μ y σ son la media y la desviación estándar, respectivamente, del valor de gMFI normalizado calculado a partir de todos los mutantes,

donde los datos se excluyen del análisis si el valor de gMFI del anticuerpo control para un mutante 5T4 particular es menor que el valor promedio de $\text{gMFI}_{\text{Ab Control}} - 2,5 \times \text{DE}$ del valor promedio de $\text{gMFI}_{\text{Ab Control}}$ (de todos los mutantes); y opcionalmente

10 donde se excluyen los datos del análisis si un residuo se une con un puntaje Z justo por debajo de -1,5 (por ejemplo, entre -1,5 y -1,8, tal como entre -1,5 y -1,7 o tal como entre -1,5 y -1,6) y se predice que dicho residuo está enterrado y separado espacialmente de la mayoría de los residuos, predichos para estar expuestos en la superficie y para los
15 cuales se determina una pérdida de unión o una unión reducida.

Un anticuerpo de control específico de 5T4 sin bloqueo cruzado apropiado para usar en el paso iii) es un anticuerpo biespecífico que comprende:

- una región de unión al antígeno, que comprende una secuencia de la VH según se establece en la SEQ ID N°: 83 y una secuencia de la VL según
20 se establece en la SEQ ID N°: 84 [A1]; y
- una región de unión al antígeno, que comprende una secuencia de la VH según se establece en la SEQ ID N°: 97 y una secuencia de la VL según se establece en la SEQ ID N°: 98 [B12].

La presente invención provee anticuerpos que se unen a 5T4 de manera tal que
25 haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de

los residuos aminoácidos R73, Y92 y R94 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

En particular, los anticuerpos se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de los
5 residuos aminoácidos S69, R73, Y92 y R94 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Adicionalmente, los anticuerpos se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de los
10 residuos aminoácidos R73, T74, Y92, R94 y N95 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Además, los anticuerpos que se divulgan aquí se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera
15 de los residuos aminoácidos: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Adicionalmente, los anticuerpos se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de los
20 residuos aminoácidos R73, Y92, R94, F111, F138, L144 y D148 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

Los anticuerpos se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de los residuos aminoácidos
25 S69, R73, Y92, R94, F111, F138, y D148 es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

En otras formas de realización, los anticuerpos de la invención se pueden unir a 5T4 de manera tal que haya una pérdida de unión o que la unión se reduzca si uno o más cualesquiera de los residuos aminoácidos R73, T74, Y92, R94, N95 y F138

es(son) sustituido(s) por alanina; donde la numeración de cada residuo aminoácido se refiere a su posición en la SEQ ID N°: 1.

El efecto de cualquiera de las sustituciones por alanina provistas anteriormente se puede determinar mediante barrido de alanina de un polipéptido que comprende los
5 residuos aminoácidos 32-355 de la SEQ ID N°: 1.

En particular, el efecto de las sustituciones por alanina se puede determinar mediante un procedimiento según se establece en el Ejemplo 16 de la presente o esencialmente según se establece en dicho Ejemplo.

La pérdida de unión se puede definir como un puntaje Z de unión inferior a 1,5; el
10 puntaje Z se calcula opcionalmente según se establece en el Ejemplo 16 de la presente o esencialmente según se establece en dicho Ejemplo.

El efecto de cualquiera de las sustituciones por alanina se puede determinar mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

i) Expresar polipéptidos mutantes de la 5T4 humana en los cuales todos
15 los residuos de aminoácidos en el dominio extracelular de la 5T4 humana (correspondientes a los residuos de aminoácidos 32-355 de la SEQ ID N°: 1), excepto cisteínas y alaninas, se sustituyen individualmente por alanina, y los polipéptidos de la 5T4 de tipo salvaje se sustituyen individualmente en células de riñón embrionario humano, por ejemplo células HEK 293, de
20 manera tal que por cada 5T4 mutante o de tipo salvaje se provee una muestra que comprende 70-90.000 células, por ejemplo 80.000 células,

ii) Incubar las células de cada muestra con 20 µl de dicho anticuerpo, que es un anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (3 µg/ml; en solución amortiguadora FACS), durante 40 minutos a temperatura ambiente, y luego lavar cada muestra dos veces en 150-180 µl de solución amortiguadora FACS (solución amortiguadora salina al fosfato [PBS; Lonza, N° de cat. BE17-517] + 0,1% [p/v] de BSA [Roche, N° de cat. 10735086001] + 0,02% [p/v] de azida sódica [NaN₃; EMELCA Bioscience, N° de cat. 41920044-3]) y volver a suspender las células de cada muestra en 30 µl de
25 solución amortiguadora FACS,
30 solución amortiguadora FACS,

- 5 iii) Determinar, para cada muestra, la cantidad promedio de anticuerpo unido por célula como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (gMFI) para la población de células individuales, viables, en dicha muestra y normalizar los datos para cada anticuerpo de prueba contra la intensidad de unión de un anticuerpo control de bloqueo no cruzado específico de 5T4 usando la siguiente ecuación:

$$\text{gMFI normalizada}_{\text{posición aa}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{gMFI}_{\text{Ab de prueba}}}{\text{gMFI}_{\text{Ab control}}} \right)$$

donde la 'posición aa' se refiere a la posición que fue mutada por una alanina,

- 10 donde el puntaje Z se calcula para expresar la pérdida o el aumento de unión del anticuerpo, de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$\text{Puntaje Z (cambio)} = \frac{\text{gMFI normalizada}_{\text{posición aa}} - \mu}{\sigma}$$

donde μ y σ son la media y la desviación estándar, respectivamente, del valor de gMFI normalizado calculado a partir de todos los mutantes,

- 15 donde los datos se excluyen del análisis si el valor de gMFI del anticuerpo control para un mutante 5T4 particular es menor que el valor promedio de $\text{gMFI}_{\text{Ab Control}} - 2,5 \times \text{DE}$ del valor promedio de $\text{gMFI}_{\text{Ab Control}}$ (de todos los mutantes); y opcionalmente

- 20 donde se excluyen los datos del análisis si un residuo se une con un puntaje Z justo por debajo de -1,5 (por ejemplo, entre -1,5 y -1,8, tal como entre -1,5 y -1,7 o tal como entre -1,5 y -1,6) y se predice que dicho residuo está enterrado y separado espacialmente de la mayoría de los residuos, predichos para estar expuestos en la superficie y para los cuales se determina una pérdida de unión o una unión reducida.

Un anticuerpo de control específico de 5T4 sin bloqueo cruzado apropiado en el paso iii) del procedimiento anterior es un anticuerpo biespecífico que comprende:

- una región de unión al antígeno, que comprende una secuencia de la VH según se establece en la SEQ ID N°: 83 y una secuencia de la VL según se establece en la SEQ ID N°: 84 [A1]; y
- una región de unión al antígeno, que comprende una secuencia de la VH según se establece en la SEQ ID N°: 97 y una secuencia de la VL según se establece en la SEQ ID N°: 98 [B12].

El anticuerpo de acuerdo con la invención se puede caracterizar por tener una capacidad de internalización reducida según lo muestra una citotoxicidad reducida cuando se conjuga con una unidad citotóxica en comparación con un anticuerpo conjugado de manera similar que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 87 y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 88 [H8]. Un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL que se establecen en las SEQ ID N°: 87 y 88 respectivamente, puede ser anticuerpo murino anti-5T4 mAb5T4, que también se denomina anticuerpo H8, (Shaw y colaboradores (2002), Biochem. J. 363: 137-45, WO98/55607). En WO06/031653 se divulgan diversas versiones quiméricas o humanizadas del anticuerpo H8.

La citotoxicidad o internalización de anticuerpos anti-5T4 que se unen a 5T4 de manera monovalente se puede determinar usando un procedimiento según se establece en el Ejemplo 7 de la presente solicitud. En particular, la citotoxicidad se puede determinar en un ensayo que comprende los siguientes pasos:

- i) Proveer un anticuerpo biespecífico conjugado con toxina que se une a 5T4 de manera monovalente, que comprende un primer brazo Fab de un anticuerpo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un segundo brazo Fab capaz de unirse a la proteína viral gp120 del VIH (VIH-1 gp120), donde el brazo Fab específico de la gp120 del VIH-1 está conjugada con Duostatin-3,

- ii) Incubar células de cáncer de mama MDA-MB-468 (clon HTB-132 de la ATCC) o HCC1954 (clon CRL-1338 de la ATCC) positivas para 5T4 con dicho anticuerpo biespecífico que se une a 5T4 de manera monovalente durante 5 días a 37 °C; y

- 5 iii) Determinar la viabilidad de las células.

La IgG-b12 es un anticuerpo específico para gp120 del VIH-1 (Barbas, CF. J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230 (3): 812-23). Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena liviana (VL) se dan en las SEQ ID N°: 97 y 98, respectivamente.

- 10 En ciertas formas de realización del anticuerpo de la invención, dicha región de unión a antígeno que es capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que se selecciona entre el grupo que consiste en:
 - a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 6, 7 y 8 [059],
 - 15 b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 13, 14 y 15 [076],
 - c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 20, 21 y 22 [085],
 - d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 27, 28 y 29 [106],
 - 20 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 34, 35 y 36 [127],
 - f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43 [207],
 - 25 g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50 [226]; y
 - h) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde dichas secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 comprenden en total, como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o como
 - 30 máximo 10 sustituciones de aminoácidos, en comparación con las

secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 según se definen en cualquiera de a) a g).

En otras formas de realización, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de

5 la cadena pesada (VH) que se selecciona entre el grupo que consiste en:

a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 6, 7 y 8 [059],

b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43 [207];

10 c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50 [226]; y

d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, donde dichas secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 comprenden en total, como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o como

15 máximo 10 sustituciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 según se definen en cualquiera de a) a c).

En particular, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena
20 pesada (VH) que comprende secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 6, 7 y 8 [059].

Como alternativa, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que se selecciona entre el grupo que consiste en: una región
25 variable de la cadena pesada (VH) que comprende a las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43 [207].

Además, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que se selecciona entre el grupo que consiste en: una región variable
30 de la cadena pesada (VH) que comprende a las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50 [226].

En otras formas de realización, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL) que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 6, 7 y 8, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 10, AAS y de la SEQ ID N°: 11, respectivamente [059],
- 10 b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 13, 14 y 15, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 17, DAS y de la SEQ ID N°: 18, respectivamente [076],
- 15 c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 20, 21 y 22, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 24, DAS y de la SEQ ID N°: 25, respectivamente [085],
- 20 d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 27, 28 y 29, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 31, DVS y de la SEQ ID N°: 32, respectivamente [106],
- 25 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 34, 35 y 36, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 38, DAS y de la SEQ ID N°: 39, respectivamente [127],
- 30 f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que

comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 45, DAS y de la SEQ ID N°: 46, respectivamente [207],

5 g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N°: 52, DAS y de la SEQ ID N°: 53, respectivamente [226], y

10 h) una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL), donde cada región comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, donde dichas secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 comprenden en total, como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o como máximo 10 sustituciones de aminoácidos, en comparación con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas en cualquiera de a) a g).

15 El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo en el cual las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región o regiones de unión al antígeno capaces de unirse a 5T4 comprenden, en total, como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o como máximo 10 sustituciones de aminoácidos, en comparación con:

20 i) las secuencias de CDR de las SEQ ID N°: 6, 7, 8, 10, AAS y de la SEQ ID N°: 11 [059],

ii) las secuencias de CDR de las SEQ ID N°: 41, 42, 43, 45, DAS y de la SEQ ID N°: 46 [207]; o

iii) las secuencias de CDR de las SEQ ID N°: 48, 49, 50, 52, DAS y de la SEQ ID N°: 53 [226].

25 Preferiblemente 1, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de dichas sustituciones de aminoácidos es/son sustituciones conservativas de aminoácidos.

El anticuerpo puede comprender en particular una o dos regiones variables de la cadena pesada en las cuales la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) comprende seis residuos aminoácidos consecutivos de la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 102 (YYGMDV) [059, 207, 226]. Estos seis residuos

30

aminoácidos consecutivos pueden ser los residuos aminoácidos más cercanos al extremo C-terminal dentro de la CDR3.

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo en el cual dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una o dos regiones variables de la cadena pesada (VH) que comprende(n) la secuencia CDR1 de la SEQ ID N°: 41 (GGSFSGYY), la secuencia CDR2 de la SEQ ID N°: 103 (IDHSX₁ST), y la secuencia CDR3 de la SEQ ID N°: 104 (AX₂WFGELX₃X₄YYYGMDV), y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia CDR1 de la SEQ ID N°: 105 (QSVSSX₅), la secuencia CDR2 DAS, y la secuencia CDR3 de la SEQ ID N°: 46 (QQRSNWPLT), y donde X₁ es G o E, X₂ es A o G, X₃ es W o Y, X₄ es D o H y X₅ es Y o F [207, 226].

En el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión al antígeno puede ser capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 6, 7, y 8, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 10, AAS y SEQ ID N°: 11, respectivamente [059].

Como alternativa, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 45, DAS y SEQ ID N°: 46, respectivamente [207].

adicionalmente, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 52, DAS y 53, respectivamente [226].

En algunas formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo en el cual dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 5 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 5 [059],
- 10 b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 12 [076],
- 15 c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 19 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 19 [085],
- 20 d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 26 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 26 [106],
- 25 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 33 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 33 [127],
- 30 f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 40 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 40 [207]; y
- g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 47 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 47 [226].

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser en particular un anticuerpo en el cual dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 5 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%,
5 o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 5 [059].

Además, en el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 40 o una secuencia con
10 por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 40 [207].

Adicionalmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo en el cual dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una
15 región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 47 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 47 [226].

En otras formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un
20 anticuerpo en el cual dicha región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL) se selecciona entre el grupo que consiste en:

- a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 5 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos
25 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 5, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 9 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con
30 la secuencia de la SEQ ID N°: 9 [059],

- 5 b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 12, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 16 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 16 [076],
- 10 c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 19 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 19, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 23 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 23 [085],
- 15 d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 26 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 26, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 30 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 30 [106],
- 20 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 33 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 33, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 37 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 37 [127],
- 25
- 30

- 5 f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 40 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 40, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 44 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 44 [207],
- 10 g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 47 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 47, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 51 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 51 [226].

20 En una forma, la por lo menos una región de unión comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL) que tiene como máximo 10 mutaciones o sustituciones, como máximo 5 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 4 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 3 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 2 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 1 mutación o sustitución, a través de dicha región variable de la cadena pesada (VH) y dicha región variable de la cadena liviana (VL) se seleccionan entre el grupo que consiste en:

- 25 a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 5, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 9 [059],
- 30 b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 12, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 16 [076],

- c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 19, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 23 [085],
- 5 d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 26, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 30 [106],
- e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que
10 consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 33, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 37 [127],
- f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que
15 consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 40, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 44 [207],
- g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que
20 consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 47, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 51 [226].

En algunas formas de realización de la presente invención, las como máximo 10 mutaciones o sustituciones, como máximo 5 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 4 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 3 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 2 mutaciones o sustituciones,
25 por ejemplo como máximo 1 mutación o sustitución se permiten a través de la longitud completa de la región variable de la cadena pesada y toda la región variable de la cadena liviana. En otras formas de realización, las como máximo 10 mutaciones o sustituciones, como máximo 5 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 4 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 3
30 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 2 mutaciones o sustituciones, por ejemplo como máximo 1 mutación o sustitución pueden no encontrarse en el

interior de ninguna de las 6 CDR secuencias de dichas regiones variable de la cadena pesada y variable de la cadena liviana.

Las hasta 10 mutaciones o sustituciones pueden estar distribuidas en toda la longitud de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana de cada región de unión. Algunas de las mutaciones o sustituciones o todas ellas pueden ser sustituciones conservativas en las cuales un residuo aminoácido se ha sustituido por un residuo aminoácido de la misma clase que se indicó anteriormente en la presente en la definición de "aminoácido"; por ejemplo, un aminoácido ácido sustituido por otro residuo aminoácido ácido, y un residuo aromático puede ser sustituido por otro residuo aromático. Puede ser preferible que 35% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 92% o más, 93% o más o 94% o más de las sustituciones en la variante sean sustituciones conservadoras de residuos aminoácidos.

En particular, algunas de las mutaciones o sustituciones o todas ellas pueden ser por residuo(s) aminoácido(s), cada uno de los cuales tiene las mismas propiedades físicas o funcionales que el respectivo residuo aminoácido al que sustituyen. Los residuos aminoácidos que comparten propiedades físicas y funcionales se han provisto anteriormente en la presente bajo la definición de "aminoácido"; por ejemplo, bajo la definición anterior de "aminoácido"; por ejemplo, un residuo hidrofóbico se puede sustituir por otro residuo aminoácido hidrofóbico o un residuo asociado a cicloalqueno se puede sustituir por otro residuo asociado a cicloalqueno.

Los anticuerpos que comprenden sustituciones o mutaciones según se describieron anteriormente pueden ser en particular variantes funcionales de las regiones VL, regiones VH o una o más CDR definidas anteriormente con referencia a los identificadores de secuencias. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de los anticuerpos de la presente invención aún permite que el anticuerpo retenga por lo menos una proporción sustancial (por lo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) de la afinidad y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original y, en algunos casos, dicho

anticuerpo anti-5T4 puede estar asociado incluso a una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

En formas de realización adicionales de la invención, dicha región de unión al antígeno del anticuerpo que es capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL) que se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 10 a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 5, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 9 [059],
- b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 12, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 16 [076],
- 15 c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 19, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 23 [085],
- d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 26, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 30 [106],
- 20 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 33, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 37 [127],
- 25 f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 40, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 44 [207]; y
- 30 g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 47, y una región variable de la

cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID N°: 51 [226].

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa, como por ejemplo un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

- 5 Además, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monovalente. Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo bivalente.

En otras formas de realización, el anticuerpo que provee la presente invención es un anticuerpo monoespecífico.

- 10 Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico.

Además, dentro del alcance de la presente divulgación existe la capacidad de proveer un anticuerpo según se definió anteriormente, donde el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a CD3, por ejemplo a CD3 ϵ humana (epsilon), por ejemplo a CD3 ϵ humana (epsilon) según se especifica en la SEQ ID N°: 4.

- En particular, la presente invención provee un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión al antígeno de un anticuerpo según se describió anteriormente, y una segunda región de unión que se une a CD3, por ejemplo a CD3 humana según se definió anteriormente.

- Algunos ejemplos de moléculas de anticuerpos biespecíficos que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero de manera no taxativa, a (i) un solo anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión al antígeno, (ii) un anticuerpo de cadena única que tiene especificidad para dos epitopes diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem por un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de Doble Dominio Variable (DVD-IgTM), donde cada cadena liviana y cada cadena pesada contiene dos dominios variables dispuestos en tándem mediante un enlace peptídico corto (Wu y colaboradores, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, en: Antibody Engineering, Springer Berlín Heidelberg (2010); (iv) un fragmento

biespecífico (Fab')₂ unido químicamente; (v) un Tandab®, que es una fusión de dos *diabodies* de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos blanco; (vi) un *flexibody*, que es una combinación de scFv con un *diabody* que da como
5 resultado una molécula multivalente; (vii) la denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo" (*Dock-and-Lock*®), basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada
10 molécula "escorpión", que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un *diabody*.

En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un *diabody*, un *cross-body*, por ejemplo CrossMabs, o un anticuerpo biespecífico que se obtiene mediante un intercambio de brazos Fab controlado (según se
15 describe en WO 2011/131746).

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero de manera no taxativa, a (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de doble direccionamiento de tipo IgG recombinante, en las cuales cada uno de los dos lados
20 de la molécula contiene el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de por lo menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión con IgG, en las cuales los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan con un fragmento Fab adicional o con partes del fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión con Fc, en las cuales las moléculas Fv de cadena sencilla o los *diabodies* estabilizados se fusionan con
25 dominios constantes de la cadena pesada, con regiones Fc o con partes de los mismos; (v) moléculas de fusión con Fab, en las cuales se fusionan diferentes fragmentos Fab entre sí, se fusionan con dominios constantes de la cadena pesada, con regiones Fc o con partes de las mismas; y (vi) ScFv y anticuerpos basados en *diabodies* y de cadena pesada (por ejemplo, anticuerpos de dominio, *Nanobodies*®)
30 en los que se fusionan diferentes moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes *diabodies* o diferentes anticuerpos de cadena pesada (por ejemplo, anticuerpos de

dominio, *Nanobodies*®) entre sí o con otra proteína o molécula portadora fusionada con dominios constantes de la cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas.

Algunos ejemplos de moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios incluyen, pero de manera no taxativa, a Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO/2002/020039), Knobs-into-Holes ["*botón en ojal*"] (Genentech, WO9850431;), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) y los compatibles electrostáticamente [electrostatically-matched] (Amgen, EP1870459 y WO2009089004, Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body y PIG-body (Pharmabcine), Strand Exchange Engineered Domain body [dominio modificado por intercambio de cadena] (SEEDbody)(EMD Serono, WO2007110205), Biclonics (Merus), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/015792), IgG1 e IgG2 biespecíficas (Pfizer/Rinat, WO11143545), andamiaje Azymetric (Zymeworks/Merck, WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), anticuerpos bivalentes biespecíficos (Roche WO 2009/080254) y moléculas DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746).

Algunos ejemplos de moléculas de doble direccionamiento similares a IgG recombinantes incluyen, pero de manera no taxativa, a: Ig de doble direccionamiento (DT por las siglas en inglés de *Dual Targeting*) Ig-DT (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech), mAbs reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), enfoques con cadena liviana común (Crucell/Merus, US 7.262.028), κλBodies (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Algunos ejemplos de moléculas de fusión con IgG incluyen, pero de manera no taxativa, a: (DVD)-Ig™ [DVD por las siglas en inglés de *Dual Variable Domain*, es decir Doble Dominio Variable] (Abbott, US 7.612.181), anticuerpos de doble dominio y de doble cabeza (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Biespecíficos similares a IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusión scFv (Novartis), fusión scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) y TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Los ejemplos de moléculas de fusión con Fc incluyen, pero de manera no taxativa, a: fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent

BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnología de redireccionamiento de doble actividad (Fc-DART™) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010/080538) y Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine – China).

Algunos ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión con Fab incluyen, entre
5 otros, F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), de doble acción o Bis-Fab (Genentech), *Dock-and-Lock*® (DNL) (ImmunoMedics), bivalentes biespecíficos (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

Algunos ejemplos de anticuerpos de dominio y basados en diabodies y scFv incluyen, entre otros, acopladores de células T biespecíficas (BiTE® por las siglas en
10 inglés de *Bispecific T cell Engager*) (Micromet, Tandem *Diabody* (Tandab™) (Affimed), Tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (DART por las siglas en inglés de *Dual Afinidad Retargeting Technology*) (MacroGenics), Diabodies de cadena simple (Academic), Anticuerpos similares a TCR (AIT, ReceptorLogics), Fusión de ScFv y albúmina de suero humano (Merrimack) y COMBODY (Epigen
15 Biotech), *Nanobodies*® de direccionamiento doble (Ablynx), anticuerpos que solo tienen dominios de la cadena pesada de direccionamiento doble.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser, en particular, un anticuerpo en el cual la región de unión al antígeno que se une a CD3 comprende:

una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las
20 secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 54, 55 y 56, respectivamente; [huCD3-H1L1] (WO2015001085 (Genmab A/S));

y, opcionalmente

una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 58, GTN y 59, respectivamente
25 [huCD3-H1L1].

También se describen anticuerpos en los que la región de unión al antígeno que se une a CD3 comprende:

una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 57, o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos
30 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 57 [huCD3-H1L1];

y, opcionalmente

una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 60 o una secuencia con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID N°: 60, [huCD3-H1L1].

La presente invención provee además un anticuerpo en el cual

la región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 6, 7 y 8, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 10, AAS y 11, respectivamente [059];

y

la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen en las SEQ ID N°: 54, 55 y 56, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN, y la secuencia según se establece en la SEQ ID N°: 59 [huCD3-H1L1], respectivamente.

Además, la invención provee un anticuerpo en el cual

la región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 41, 42 y 43, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 45, DAS y 46, respectivamente [207];

y

la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen en las SEQ ID N°: 54, 55 y 56, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen

en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN, y la secuencia según se establece en la SEQ ID N°: 59 [huCD3-H1L1], respectivamente.

Además, la invención provee un anticuerpo en el cual

5 la región de unión al antígeno capaz de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de las SEQ ID N°: 48, 49 y 50, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID N°: 52, DAS y SEQ ID N°: 53, respectivamente [226 - VH + VL CDR1, secuencias -2 y -3];

10 y

la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen en las SEQ ID N°: 54, 55 y 56, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
15 comprende a CDR1, CDR2, y CDR3 con las secuencias que se establecen en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN, y la secuencia según se establece en la SEQ ID N°: 59 [huCD3-H1L1], respectivamente.

La región de unión al antígeno que se une a CD3, se puede unir con un constante de disociación en el equilibrio K_D dentro del rango entre 200 – 1000 nM, por ejemplo
20 dentro del rango entre 300 – 1000 nM, dentro del rango entre 400 – 1000 nM, dentro del rango entre 500 – 1000 nM, dentro del rango entre 300 – 900 nM dentro del rango entre 400 – 900 nM, dentro del rango entre 400 – 700 nM, dentro del rango entre 500 – 900 nM, dentro del rango entre 500 – 800 nM, dentro del rango entre 500 – 700 nM, dentro del rango entre 600 – 1000 nM, dentro del rango entre 600 –
25 900 nM, dentro del rango entre 600 – 800 nM, o tal como dentro del rango entre 600 – 700 nM.

En algunas formas de realización adicionales, el anticuerpo que se divulga en la presente tiene una afinidad de unión a CD3ε humana que es más baja que la de un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno que comprende una secuencia

de la VH según se establece en la SEQ ID N°: 57, y una secuencia de la VL según se establece en la SEQ ID N°: 60 [huCD3-H1L1], preferiblemente donde dicha afinidad es por lo menos 2 veces menor, por ejemplo por lo menos 5 veces menor, por ejemplo por lo menos 10 veces menor, por ejemplo por lo menos 20 veces menor, por lo menos 30 veces menor, por lo menos 40 veces menor, por lo menos 45 veces menor, por lo menos 50 veces menor, por lo menos 55 veces menor, o por ejemplo por lo menos 60 veces menor.

En particular, la región de unión al antígeno que se une a CD3 se puede unir con un constante de disociación en el equilibrio K_D dentro del rango entre 1 – 100 nM, por ejemplo dentro del rango entre 5 – 100 nM, dentro del rango entre 10 – 100 nM, dentro del rango entre 1 – 80 nM, dentro del rango entre 1 – 60 nM dentro del rango entre 1 – 40 nM, dentro del rango entre 1 – 20 nM, dentro del rango entre 5 – 80 nM, dentro del rango entre 5 – 60 nM, dentro del rango entre 5 – 40 nM, dentro del rango entre 5 – 20 nM, dentro del rango entre 10 – 80 nM, dentro del rango entre 10 – 60 nM, dentro del rango entre 10 – 40 nM, o tal como dentro del rango entre 10 – 20 nM.

La afinidad con la que el anticuerpo de acuerdo con la invención se une a CD3 se puede determinar mediante interferometría de biocapas, usando una modificación del procedimiento descrito anteriormente o según se establece en el Ejemplo 2 de la presente, donde el anticuerpo se inmoviliza en un biosensor de captura de Fc de IgG humana. y se determina la asociación con el anticuerpo inmovilizado de CD3E27-GSKa (proteína madura de la SEQ ID N°: 101) y la disociación. Además, la afinidad con la que el anticuerpo de acuerdo con la invención se une a CD3 se puede determinar mediante interferometría de biocapas según se provee en el Ejemplo 9 de la presente.

En WO 2017/009442 se proveen anticuerpos que se unen a CD3, en particular a la CD3 humana, con afinidad reducida, y se debe entender que cualquiera de estos anticuerpos puede servir como base para generar anticuerpos de acuerdo con la presente invención que, además de la capacidad de unirse a la 5T4 también tienen

la capacidad de unirse a la CD3 con afinidad reducida. Por lo tanto, en otras formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo en el cual:

- 5 la región de unión al antígeno que se une a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia CDR1, una secuencia CDR2 y una secuencia CDR3,
- 10 en comparación con una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 57, la región variable de la cadena pesada (VH), tiene una sustitución de un aminoácido en una de las secuencias CDR, donde la sustitución está en una posición que se selecciona entre el grupo que consiste en: T31, N57, H101, G105, S110 y Y114, donde las posiciones están numeradas de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID N°: 57; y
- 15 la región variable de la cadena liviana (VL) de tipo salvaje comprende a las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que se establecen en las SEQ ID N°: 58, GTN y SEQ ID N°: 59, respectivamente.

Se prefiere que las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) de la región de unión al antígeno que se une a CD3 comprendan, en total, como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia que se establece en la SEQ ID N°: 57.

- 20 Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) de la región de unión al antígeno que se une a CD3 pueden tener por lo menos un 95% de identidad de secuencia, por ejemplo por lo menos un 96% de identidad de secuencia, por lo menos 97 % de identidad de secuencia, por lo menos 98% de identidad de secuencia o por lo menos 99% de identidad de
- 25 secuencia con las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) de tipo salvaje, donde la identidad de secuencia se calcula en base a la alineación de una secuencia de aminoácidos que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) de la región de unión al antígeno que se une a CD3 con una secuencia de

aminoácidos que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) de tipo salvaje.

En particular, la región de unión al antígeno que se une a CD3 puede comprender una mutación que se selecciona entre el grupo que consiste en: T31M, T31P, N57E,
5 H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V, donde las posiciones están numeradas de acuerdo con la secuencia de referencia de la SEQ ID N°: 57.

En ciertas formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo en el cual, cuando dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico no tiene
10 o tiene una función efectora mediada por Fc reducida (anticuerpo “inerte”), y comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a CD3, entonces el anticuerpo:

- a) puede mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración contra las células SK-OV-3, cuando se usan PBMC o células T purificadas como células
15 efectoras, por ejemplo cuando se evalúa como se describe en el Ejemplo 14 en la presente,
- b) puede mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración contra las células MDA-MB-231, cuando se usan células T purificadas como células efectoras, por ejemplo cuando se evalúa como se describe en el Ejemplo 13
20 en la presente,
- c) puede activar células T *in vitro* en presencia de células tumorales MDA-MB-231; por ejemplo cuando se evalúa como se describe en el Ejemplo 13 en la presente,
- d) puede activar células T *in vitro* en presencia de células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski y/o SiHa; por ejemplo cuando se evalúa como se describe
25 en el Ejemplo 17 en la presente,
- e) puede inducir citotoxicidad contra células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski y/o SiHa cuando se usan células T purificadas como células efectoras, por ejemplo cuando se evalúa como se describe en el Ejemplo 17 en la
30 presente; y/o

- f) muestra actividad antitumoral, tal como una extensión demorada del tumor, en un modelo de xenoinjerto en ratón de reconstitución de células madre hematopoyética inmunes humanizadas, tales como NOD.*Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* inoculadas con células tumorales MDA-MB-231 humanas; por ejemplo cuando se determina como se describe en el Ejemplo 15 y

Además, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo que, cuando se evalúa mediante citometría de flujo o ELISA, no se une a los FcγR de leucocitos y no induce la reticulación de CD3 mediada por FcγR dependiente del anticuerpo CD3 en ausencia de las células tumorales específicas de (5T4) blanco por unión a C1q.

- 10 A continuación se puede ver una descripción más detallada de los anticuerpos con función efectora reducida o sin función efectora mediada por Fc (anticuerpos "inertes").

La capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración contra células SK-OV-3 se determina en un ensayo de citotoxicidad *in*

- 15 *vitro* que comprende los pasos de:

- i) aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células T de capas leucocitarias de donantes humanos sanos,
- ii) proveer:

- 20 un primer conjunto de muestras, donde cada muestra comprende PBMC y células SK-OV-3 de adenocarcinoma de ovario humano, y donde las relaciones de PBMC:células SK-OV-3 en dichas muestras son de 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 y 12:1; y

- 25 un segundo conjunto de muestras, donde cada muestra comprende células T y células SK-OV-3 de adenocarcinoma de ovario humano y donde las relaciones de células T:células SK-OV-3 en dichas muestras son de 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1

- agregar el anticuerpo a cada conjunto de muestras a concentraciones que varían en un rango entre 0,0128 ng/ml y 1000 ng/ml e incubar las muestras durante 72 horas a 37 °C; y luego

- 30 iv) evaluar la viabilidad de las células SK-OV-3 usando Resazurin (10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona).

La capacidad de activar células T *in vitro* en presencia de células tumorales MDA-MB-231 se determina en un ensayo que comprende los pasos de:

- i) aislar células T de capas leucocitarias de donantes humanos sanos,
- ii) proveer un conjunto de muestras, donde cada muestra comprende células T y células MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano y donde la relación de células T:células MDA-MB-231 en dichas muestras es de 8:1,
- iii) agregar el anticuerpo al conjunto de muestras a concentraciones que varían en un rango entre 0,0128 ng/ml y 1000 ng/ml e incubar las muestras durante 72 horas a 37 °C,
- iv) teñir las células T con anticuerpos marcados con fluorescencia contra marcadores de activación de células T, tales como los anticuerpos CD69-APC, CD25-PE-Cy7 y CD279/PD1-BV604, mediante incubación con dichos anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C; y
- v) analizar las muestras mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos anti-CD69 humano de APC (CD69-APC) se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de BioLegend (Nº de cat. 310909 y 310910). El anticuerpo monoclonal CD25, PE-Cianine7 (CD25-PE-Cy7) también se puede obtener comercialmente, por ejemplo, de ThermoFisher Scientific (Nº de cat. 25-0259-42) y de BD Biosciences (Nº de cat. 557741). Por último, los anticuerpos CD279/PD 1-BV 604 se pueden obtener comercialmente de Genscript (Nº de cat. A01828).

La activación de células T *in vitro* en presencia de células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski y/o SiHa se puede determinar mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- i) proveer células T aisladas de capas leucocitarias de donantes humanos sanos,
- ii) proveer un conjunto de muestras, donde cada muestra comprende dichas células T y células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski o SiHa, y donde la relación de células T:células tumorales en dichas muestras es de 4:1,

- iii) agregar el anticuerpo al conjunto de muestras a concentraciones que varían en un rango entre 0,0128 ng/ml y 5000 ng/ml (tal como diluciones 5X) e incubar las muestras durante 72 horas a 37 °C,
- iv) recolectar de cada muestra 110 µl de sobrenadante que contiene células T y teñir las células T con anticuerpos marcados con fluorescencia contra marcadores de células T, tales como CD3-eFluor450, CD4-APC-eFluor780, DC8-AF700, y con anticuerpos contra marcadores de células T, tales como los anticuerpos 69-APC, CD25-PE-Cy7 y CD279/PD1-BV604, mediante incubación con dichos anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C; y
- v) analizar las muestras mediante citometría de flujo.

La capacidad de inducir la citotoxicidad contra las células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski y/o SiHa se puede determinar mediante un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- i) proveer células T aisladas de capas leucocitarias de donantes humanos sanos,
- ii) proveer un conjunto de muestras de prueba y muestras control, donde cada muestra comprende dichas células T y células tumorales BxPC-3, PANC-1, Ca Ski o SiHa que se habían dejado adherir al fondo de una placa para cultivo tisular de 96 pocillos y donde la relación de células T:células tumorales en dichas muestras es de 4:1,
- iii) agregar el anticuerpo al conjunto de muestras de prueba a concentraciones que varían en un rango entre 0,0128 ng/ml y 5000 ng/ml (tal como diluciones 5X), en tanto las muestras control permanecen sin tratar o se incuban con estaurosporina 5 µM, e incubar todas las muestras durante 72 horas a 37 °C,
- iv) incubar las células adherentes en 10% (p/p) de 10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona (Resazurin) en medio RPMI-1640 suplementado con 10% (p/p) de suero bovino donante con hierro y penicilina/estreptomicina a 37 °C durante 4 horas,

v) medir la absorbancia de las células; definir la absorbancia de las células incubadas con estaurosporina como 0% de viabilidad y las células no tratadas como 100% de viabilidad y calcular el porcentaje de células viables de la siguiente manera

$$\text{x100\% células viables} = \left(\frac{[\text{absorbancia de la muestra} - \text{absorbancia de células tratadas con estaurosporina}]}{[\text{absorbancia de células sin tratar} - \text{absorbancia de células tratadas con estaurosporina}]} \right)$$

5

El anticuerpo de la invención puede ser, en particular, un anticuerpo en el cual la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3 comprende:

- 10 a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 61, 55 y 56 [VH CDR1-T31P + VH CDR 2,3 de tipo salvaje], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
- 15 o
- b) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 63, 55 y 56 [VH CDR1-T31M + VH CDR 2,3 de tipo salvaje], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
- 20 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
- o
- c) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las
- 25 CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 65 y 56 [VH CDR-N57E + VH CDR 1,3 de tipo salvaje], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se

muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],

o

5 d) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 67 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-H101G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
10 respectivamente;

e) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 69 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-H101N], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
15 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje], respectivamente;

f) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 71 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-G105P], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
20 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
25 respectivamente;

g) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 73 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-S110A], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
30 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se

muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje], respectivamente; o

5 h) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 75 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-S110G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
10 respectivamente;

i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 77 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-Y114V], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
15 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje], respectivamente; o

j) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 79 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-Y114M], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que
20 comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje],
25 respectivamente; o

k) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias que se muestran en las SEQ ID N°: 54, 55 y 81 [VH CDR 1,2 de tipo salvaje + VH CDR3-Y114R], respectivamente, y una
30 región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID N°: 58, la secuencia GTN y

la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 59, respectivamente [VL CDR 1,2,3 de tipo salvaje], respectivamente.

En determinadas formas de realización, la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 incluye una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en las SEQ ID Nos: 54, 55 y 67 [CDR 1,2 de VH de tipo salvaje + VH CDR3-H101G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en la SEQ ID No: 58, la secuencia GTN, y la secuencia como se describe en la SEQ ID No: 59, respectivamente [CDR 1,2,3 de VL de tipo salvaje], respectivamente.

Además, la presente invención provee un anticuerpo como se define precedentemente, en donde

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID No.: 6, 7 y 8, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID No: 10, AAS y SEQ ID No: 11, respectivamente [059];

y

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en las SEQ ID Nos: 54, 55 y 67 [CDR 1,2 de VH de tipo salvaje + VH CDR3-H101G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en la SEQ ID No: 58, la secuencia GTN, y la secuencia como se describe en la SEQ ID No: 59, respectivamente [CDR 1,2,3 de VL de tipo salvaje], respectivamente.

Además, la invención provee un anticuerpo como se define precedentemente, en donde

5 la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID No.: 41, 42 y 43, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID No: 45, DAS y 46, respectivamente [207];

10 y
la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en las SEQ ID Nos: 54, 55 y 67 [CDR 1,2 de VH de tipo salvaje + VH CDR3-H101G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en la SEQ ID No: 58, la secuencia GTN, y la secuencia como se describe en la SEQ ID No: 59, respectivamente [CDR 1,2,3 de VL de tipo salvaje], respectivamente.

Además, la invención provee un anticuerpo como se define precedentemente, en donde

20 la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID No.: 48, 49 y 50, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID No: 52, DAS y 53, respectivamente [226];

25 y
la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se describe en las SEQ ID Nos: 54, 55 y 67 [CDR 1,2 de VH de tipo salvaje + VH CDR3-H101G], respectivamente, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias como se

30

describe en la SEQ ID No: 58, la secuencia GTN, y la secuencia como se describe en la SEQ ID No: 59, respectivamente [CDR 1,2,3 de VL de tipo salvaje], respectivamente.

5 En el anticuerpo de acuerdo con la invención, la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 de humano puede comprender una secuencia VH y una secuencia VL seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 62 [VH T31P] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- 10 b) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 64 [VH T31M] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- c) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 66 [VH N57E] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- d) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 68 [VH H101G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- 15 e) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 70 [VH H101N] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- f) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 72 [VH G105P] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- g) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 74 [VH S110A] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- 20 h) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 76 [VH S110G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- i) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 78 [VH Y114V] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60,
- 25 j) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 80 [VH Y114M] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60; y
- k) una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 82 [VH Y114R] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60.

30 En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo, en donde la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 de humano

comprende una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 68 [VH H101G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60.

En algunas formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es uno, en donde

5 la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID No: 5 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID No: 5 [059];

10 y

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 de humano comprende una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 68 [VH H101G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60.

En otras formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es uno, en

15 donde

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID No: 40 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID No: 40 [207];

20

y

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 de humano comprende una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 68 [VH H101G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60.

25 En aún otras formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es uno, en donde

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID No: 47 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de la SEQ ID No: 47 [226];

30

y

la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 de humano comprende una secuencia VH como se describe en la SEQ ID No: 68 [VH H101G] y una secuencia VL como se describe en la SEQ ID No: 60.

- 5 Tal como conoce la persona con experiencia, cada región de unión a antígeno de un anticuerpo en general comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL), y cada una de las regiones variables comprende tres secuencias de CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y cuatro secuencias esqueleto, FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Esta
- 10 estructura también se puede encontrar en los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Además, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden comprender dos regiones constantes de la cadena pesada (CH), y dos regiones constantes de la cadena liviana (CL).

- En formas de realización particulares, el anticuerpo de acuerdo con la invención
- 15 comprende una primera y segunda cadena pesada, tal como una primera y segunda cadena pesada en donde cada una comprende por lo menos una región bisagra, una región CH2 y CH3 . Se pueden obtener anticuerpos heterodiméricos estables con alto rendimiento por ejemplo mediante el llamado intercambio con brazo Fab como se provee en WO 2008/119353 y WO 2011/131746, en base a dos proteínas
- 20 iniciales homodiméricas que contiene solo unas pocas mutaciones asimétricas en las regiones CH3. Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende una primera cadena pesada en donde se ha sustituido por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y
- 25 K409 en una cadena pesada de IgG1 de humano, y una segunda cadena pesada en donde se ha sustituido por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 de humano, en donde dichas sustituciones de dichas primera cadena pesada y dicha segunda
- 30 cadena pesada no están en las mismas posiciones, y en donde las posiciones de los aminoácidos están numeradas de acuerdo con numeración Eu.

En formas de realización particulares, la invención provee un anticuerpo, en donde el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 de humano es R en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 de humano es L en dicha
5 segunda cadena pesada, o viceversa.

En algunas formas de realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende, además de las regiones de unión a antígeno, una región Fc que consiste en las secuencias Fc de las dos cadenas pesadas. La primera y la segunda de las secuencias Fc pueden ser cada una de cualquier isotipo, incluyendo
10 cualquier isotipo de humano, tal como un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, o IgA o un isotipo mezclado. Preferiblemente, la región Fc es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 de humano o un isotipo mezclado, tal como un isotipo IgG1 de humano.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender
15 modificaciones en la región Fc para hacerlo inerte al anticuerpo, o anticuerpo no activante. Por lo tanto, en los anticuerpos descritos en la presente, una o ambas cadenas pesadas se pueden modificar de manera que el anticuerpo induce la función efectora mediada por Fc en menor medida en relación a un anticuerpo que es idéntico, excepto porque comprende la primera y la segunda de las cadenas
20 pesadas no modificadas. La función efectora mediada por Fc se puede medir por determinación de la expresión de CD69 mediada por Fc en células T (es decir la expresión de CD69 como resultado del entrecruzamiento de CD3 dependiente del receptor Fcγ mediado por anticuerpo dirigido contra CD3), por unión a receptores Fcγ, por unión a C1q, o por inducción de entrecruzamiento mediado por Fc de
25 FcγRs. En particular, las secuencias constantes de la cadena pesada se puede modificar de manera que la expresión de CD69 mediada por Fc se reduce en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 99% o 100% cuando se compara con un anticuerpo de tipo salvaje (no modificado), en donde dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en una ensayo
30 funcional basado en PBMC, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 3 de WO2015001085. Las modificaciones de las secuencias constantes de la cadena

pesada y liviana también pueden generar una reducción en la unión de C1q a dicho anticuerpo. En comparación a un anticuerpo no modificado la reducción puede ser de por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o 100% y la unión de C1q se puede determinar por ELISA. Además,

5 la región Fc que se puede modificar de manera que dicho anticuerpo medie la proliferación de células T mediada por Fc en comparación con un anticuerpo no modificado en por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 99% o 100%, en donde dicha proliferación de células T se mide en un ensayo funcional en base a PBMC.

10 Los ejemplos de posiciones de aminoácidos que se pueden modificar, por ejemplo en un anticuerpo de isotipo IgG1, incluyen las posiciones L234 y L235. Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una primera y una segunda cadena pesada, y en donde en la primera y la segunda de las cadenas pesadas, los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las

15 posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 de humano de acuerdo con numeración Eu son F y E, respectivamente.

Además, una sustitución de aminoácido D265A puede disminuir la unión a todos los receptores Fcγ y prevenir la ADCC (Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604). Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una

20 primera y una segunda cadena pesada, en donde en la primera y la segunda de las cadenas pesadas, el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 de humano de acuerdo con numeración Eu es A. Otras formas de realización de la invención proveen anticuerpos en donde, en por lo menos una, tal como en ambas, de la primera y la

25 segunda de las cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 de humano, son F, E y A, respectivamente. Los anticuerpos de la presente solicitud, que tienen la combinación de tres sustituciones de aminoácido L234F, L235E y D265A y además la mutación K409R o la F405L descritas en la presente

30 precedentemente se denominan con el sufijo “FEAR” o “FEAL”, respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo salvaje se identifica en la presente como la SEQ ID No: 89. Consistente con las formas de realización descritas precedentemente, el anticuerpo de la invención puede comprender una región constante de la cadena pesada de IgG1 que porta la sustitución F405L y que tiene la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID No: 90 y/o una región constante de la cadena pesada de IgG1 que porta la sustitución K409R y que tiene la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID No: 94.

La secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 que porta las sustituciones L234F, L235E y D265A se identifica en la presente como la SEQ ID No: 91. La secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 que porta las sustituciones L234F, L235E, D265A y F405L se identifica en la presente como la SEQ ID No: 92. La secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 que porta las sustituciones L234F, L235E, D265A y K409R se identifica en la presente como la SEQ ID No: 93.

La presente invención además provee un anticuerpo, en donde

- a) la región o regiones de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 está o están humanizadas, y/o
- b) la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3, si está presente, está humanizada.

Además, la invención provee un anticuerpo, en donde

- a) la región o regiones de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 es o son humanas, y/o
- b) la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3, si está presente, es humana.

Además, la invención provee un anticuerpo, en donde

- a) la región o regiones de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 está o están humanizadas, y/o
- b) la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3, si está presente, es quimérica.

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena liviana kappa (κ). La secuencia de formas de realización particulares de la invención que conciernen a anticuerpos biespecíficos, la cadena liviana kappa comprende las secuencias CDR1, -2 y -3 de una cadena liviana del anticuerpo
5 contra 5T4 como se describe precedentemente.

En otras formas de realización de la invención, el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena liviana lambda (λ). En formas de realización particulares de la invención que conciernen a anticuerpos biespecíficos, la cadena liviana lambda
10 comprende las secuencias de CDR1, -2 y -3 de una cadena liviana de anticuerpo contra CD3 como se describe precedentemente, en particular las secuencias de CDR1, -2 y -3 de un anticuerpo contra CD3 que tiene afinidad reducida por CD3 como se describe precedentemente. La secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana kappa se incluye en la presente como la SEQ ID No:
15 95 y la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana lambda se incluye en la presente como la SEQ ID No: 96.

En formas de realización particulares, el anticuerpo comprende una cadena liviana lambda (λ) y una cadena liviana kappa (κ); por ejemplo un anticuerpo con una cadena pesada y una cadena liviana lambda que comprenden la región de unión con
20 capacidad de unirse a CD3, y una cadena pesada y una cadena liviana kappa que comprenden la región de unión con capacidad de unirse a 5T4.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la invención provee un inmunoconjugado o conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende el anticuerpo definido precedentemente,
25 y un grupo terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico, una citoquina, un inmunosupresor, antibiótico, o un radioisótopo. En general, la persona con experiencia tendrá a su disposición varios agentes citotóxicos, fármacos quimioterapéuticos, citoquinas, inmunosupresores, antibióticos y radioisótopos, la selección óptima de la parte terapéutica que depende de la
30 aplicación deseada del inmunoconjugado. Para determinadas aplicaciones el agente

citotóxico preferido puede ser un agente que altera los microtúbulos, tal como un Duostatin, por ejemplo Duostatin-3.

Construcciones de ácido nucleico

Otro aspecto de la invención provee una construcción de ácido nucleico que comprende

- 5 a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 como se define precedentemente en la presente, y/o
- 10 b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 como se define precedentemente en la presente.

La construcción de ácido nucleico además puede comprender

- 15 a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define precedentemente en la presente; y/o
- 20 b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define precedentemente en la presente.

Vectores de expresión

Otro aspecto de la invención provee un vector de expresión que comprende

25 secuencias de ácido nucleico que codifican para las secuencias de la cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo de acuerdo con la invención. En particular, el vector de expresión puede comprender:

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a

antígeno con capacidad de unirse a 5T4 como se define precedentemente en la presente, y/o

- 5 b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4 como se define precedentemente en la presente.

El vector de expresión además puede comprender:

- 10 a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define precedentemente en la presente; y/o
- 15 b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define precedentemente en la presente.

En otra forma de realización, el vector de expresión además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la región constante de una cadena liviana, una cadena pesada o ambas cadenas liviana y pesada de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal IgG1, κ de humano.

- 20 Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, que incluye vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto de adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos,
- 25 baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una forma de realización, un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo anti-5T4 está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe por ejemplo en Sykes and Johnston,
- 30 Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe por ejemplo en US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal

como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico miniaturizado "midge" (como se describe por ejemplo en Schakowski y col., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO₄ (como se describe por
5 ejemplo en WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler y col., Cell 14, 725 (1978), y Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la materia (véase por ejemplo US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una forma de realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo
10 anti-5T4 en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN de Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares.

Un vector de expresión también o como alternativa puede ser un vector adecuado
15 para la expresión en un sistema de levaduras. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levaduras. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisión en: F. Ausubel y col., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley
20 InterScience Nueva York (1987), y Grant y col., Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)).

Una construcción de ácido nucleico y/o vector también puede comprender una
25 secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de secreción/localización, que puede estar dirigida a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplasmático o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la materia, e incluyen señales líderes de secreción o peptídicas, secuencias de direccionamiento a organelas (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito de cloroplastos), secuencias de
30 localización/anclaje en membranas (por ejemplo, secuencias de transferencia de detención, secuencias de anclaje a GPI), y similares.

En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo anti-5T4 pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor adecuado, potenciador, y otros elementos facilitadores de la expresión. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de la expresión fuertes (por ejemplo, 5 promotor/potenciador IE CMV de humano así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV, y HIV LTR), secuencias de terminación poli(A) eficaces, un origen de replicación para la producción de plásmidos en E. coli, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección, y/o un sitio de clonado conveniente (por ejemplo, un policonector). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un 10 promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE CMV (la persona con experiencia reconocerá que dichos términos son en verdad descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

En una forma de realización, el vector de expresión que codifica para el anticuerpo anti-5T4 se puede posicionar en y/o ser provisto a una célula huésped o animal 15 huésped mediante un vector viral.

Células y células huéspedes

En un aspecto adicional, la invención provee una célula que comprende una construcción de ácido nucleico como se define en la presente precedentemente, o un vector de expresión como se define en la presente precedentemente. Se debe 20 comprender que la célula se puede obtener mediante la transfección de una célula huésped con dicha construcción o vector de expresión de ácido nucleico, tal como una célula huésped recombinante.

La célula huésped puede ser de origen humano, tal como una célula de riñón embrionario de humano (HEK), tal como una célula HEK/Expi. Como alternativa, 25 puede ser de origen roedor, tal como una célula de ovario de hámster chino, tal como una célula CHO/N50. Además, la célula huésped puede ser de origen bacteriano.

La célula puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de la invención o partes del mismo integradas de manera estable en el 30 genoma celular. Como alternativa, la célula puede comprender un ácido nucleico no

integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, el cual comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo anti-5T4 de la invención o una parte del mismo. En particular, la célula huésped puede comprender un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, el cual comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo anti-5T4 o una parte del mismo.

Composiciones

Un aspecto adicional de la invención provee una composición que comprende un anticuerpo; por ejemplo un anticuerpo biespecífico o un inmunoconjugado como se define en la presente precedentemente. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, anticuerpo biespecífico o inmunoconjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con el vehículo, excipiente y/o diluyente así como cualquier otro componente adecuado para composiciones farmacéuticas, que incluye adyuvantes conocidos, de acuerdo con técnicas convencionales tales como aquellas descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier adyuvante y excipiente conocido deben ser adecuados para el anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la presente invención y el modo elegido de administración. Lo adecuado de los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en base a la falta de impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o composición farmacéutica de la presente invención (por ejemplo, menos de un impacto sustancial [10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición relativa, etc.] en la unión del antígeno).

Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir diluyentes, rellenos, sales, soluciones amortiguadoras, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejido, solubilizantes, y/u otros materiales adecuados para la inclusión en una composición farmacéutica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar de manera de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para obtener la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particulares, sin
5 ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o la amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros
10 fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, género, peso, condición, salud general e historia clínica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en el arte de la medicina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno cualquiera y todos los
15 solventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las
20 composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de algodón, y aceite de sésamo, soluciones coloidales de
25 carboximetilcelulosa, goma tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, y/o diferentes soluciones amortiguadoras. Otros vehículos son bien conocidos en el arte farmacéutico.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones
30 o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Salvo que

cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención está contemplado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tal como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la ruta elegida de administración tales como conservantes, agentes de humectación, agentes emulsificantes, agentes de dispersión, conservantes o soluciones amortiguadoras, que pueden mejorar la vida útil o eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, gliceril monoestearato, gliceril diestearato, polímeros biodegradables biocompatibles tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la materia. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones en general son conocidos por aquellos con experiencia en la materia, véase por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En una forma de realización, los compuestos de la presente invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación
5 extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Salvo que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención está contemplado. También se pueden incorporar otros
10 compuestos activos o terapéuticos en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas para inyección típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada. El vehículo puede
15 ser un solvente o medio de dispersión acuoso o uno no acuoso que contiene por ejemplo agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal
20 como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante la inclusión
25 en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes por ejemplo como se enumera precedentemente, según se requiera, seguido por microfiltración para
30 esterilizar. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos por ejemplo de aquellos enumerados

precedentemente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento (liofilización) que proveen un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado de una solución filtrada en esterilidad
5 previamente.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados precedentemente, según se requiera, seguido por microfiltración para esterilizar. En general, las dispersiones se preparan
10 mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados precedentemente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento (liofilización) que proveen un polvo del
15 ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado de una solución filtrada en esterilidad previamente.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo, anticuerpo biespecífico o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención, una combinación de un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o
20 ADC de acuerdo con la invención con otro compuesto terapéutico, o una combinación de compuestos de la presente invención.

La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier ruta y modo adecuados. Las rutas adecuadas para administra un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidos en la materia y pueden ser
25 seleccionados por aquellas personas con experiencia en la materia.

En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral; es decir por un modo de administración diferente de la administración entérica y tópica; habitualmente mediante inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal,
30 intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea,

intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal. En particular, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Usos y aplicaciones terapéuticas

- 5 La presente invención también provee un anticuerpo, tal como un anticuerpo
bienespecífico, o un inmunoconjugado o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) como se
define en la presente para usar como un medicamento. Los anticuerpos o
inmunoconjugados anti-5T4 de la presente invención se pueden usar en el
tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que involucra células que
10 expresan 5T4. En particular, los anticuerpos bienespecíficos de acuerdo con la
invención; es decir anticuerpos que comprenden regiones de unión a antígeno con
capacidad de unirse a 5T4 y CD3 pueden ser útiles en situaciones terapéuticas en
las cuales se desea el direccionamiento específico y la muerte mediada por células
T de células que expresan 5T4, y pueden ser más eficaces en comparación a un
15 anticuerpo anti-5T4 regular en dichas ciertas indicaciones y situaciones.

- En una forma de realización, el anticuerpo, tal como el anticuerpo bienespecífico, o
inmunoconjugado o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención
se describe en la presente para usar en el tratamiento de cáncer. El anticuerpo, tal
como el anticuerpo bienespecífico, o el inmunoconjugado o conjugado anticuerpo-
20 fármaco (ADC) se puede usar en particular para el tratamiento de un cáncer, en
donde el cáncer se caracteriza por la expresión de 5T4 en por lo menos parte de las
células tumorales.

- El cáncer se puede seleccionar en particular del grupo que consiste en cáncer de
riñón/renal, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de
25 ovario, cáncer de vejiga, cáncer uterino/de endometrio/de cuello uterino, cáncer de
pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de
tiroides, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia mieloide aguda.

- Además, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de acuerdo con la
invención para la elaboración de un medicamento, tal como un medicamento para el
30 tratamiento de cáncer, por ejemplo un cáncer seleccionado del grupo que consiste

en cáncer de riñón/renal, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer uterino/de endometrio/de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia mieloide aguda.

- 5 En un aspecto adicional, la invención provee método para tratar una enfermedad, en donde el método comprende la administración de un anticuerpo, un inmunoconjugado, una composición, tal como una composición farmacéutica o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de acuerdo con la invención a un sujeto que lo requiere.
- 10 En formas de realización particulares de la invención, dicho método es para el tratamiento de un cáncer. El método de la invención puede comprender en particular los pasos de:
- a) seleccionar un sujeto que padece de un cáncer que comprende células tumorales que expresan 5T4 y/o un cáncer que se conoce que expresa 5T4;
 - 15 y
 - b) administrar al sujeto el anticuerpo, tal como el anticuerpo biespecífico, la composición farmacéutica o el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención.

El cáncer se puede seleccionar en particular del grupo que consiste en cáncer de
20 riñón/renal, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer uterino/de endometrio/de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, leucemia mieloide aguda.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos precedentes se
25 ajustan para proveer la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar de manera proporcional según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en una forma
30 unitaria de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos dependen de la enfermedad o condición a tratar y pueden ser determinadas por las personas con experiencia en la materia. Un rango ejemplificativo, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es

5 aproximadamente entre 0,001 y 10 mg/kg, tal como aproximadamente entre 0,001 y 5 mg/kg, por ejemplo aproximadamente entre 0,001 y 2 mg/kg, tal como aproximadamente entre 0,001 y 1 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 o aproximadamente 10 mg/kg. Otro rango ejemplificativo no limitante para una

10 cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención es aproximadamente entre 0,1 y 100 mg/kg, tal como aproximadamente entre 0,1 y 50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente entre 0,1 y 20 mg/kg, tal como aproximadamente entre 0,1 y 10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5, aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3,

15 aproximadamente 5, o aproximadamente 8 mg/kg.

Un médico con experiencia ordinaria en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis del anticuerpo empleadas en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos para obtener el

20 efecto terapéutico deseado y aumentar de manera gradual la dosificación hasta obtener el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un anticuerpo de la presente invención será la cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración por ejemplo puede ser parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea. En una forma de

25 realización, los anticuerpos se pueden administrar mediante infusión en una dosificación semanal calculada por mg/m². Dichas dosificaciones se pueden basar, por ejemplo, en las dosificaciones de mg/kg provistas precedentemente de acuerdo con lo siguiente: dosis (mg/kg) x 70: 1,8. Dicha administración se puede repetir, por ejemplo, 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración se puede realizar

30 mediante infusión continua durante un periodo de entre 2 y 24 horas, tal como entre 2 y 12 horas. En una forma de realización, los anticuerpos se pueden administrar

mediante infusión continua lenta durante un periodo largo, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una forma de realización, los anticuerpos se pueden administrar en una dosificación semanal calculada como una dosis fija hasta en 8 veces, tal como entre 5 4 y 6 veces cuando se da una vez por semana. Dicho régimen se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. Dichas dosificaciones fijas pueden estar basadas, por ejemplo, en las dosificaciones en mg/kg provistas precedentemente, con un peso corporal estimado de 70 kg. La dosificación se puede determinar o ajustar por medida de la cantidad de anticuerpo 10 de la presente invención en la sangre luego de la administración por ejemplo tomando una muestra biológica y utilizando anticuerpos anti-idiotipo que están dirigidos contra la región de unión a antígeno contra el antígeno 5T4 de los anticuerpos de la presente invención.

En una forma de realización, los anticuerpos se pueden administrar como terapia de 15 mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez por semana durante un periodo de 6 meses o más.

También se puede administrar un anticuerpo de manera profiláctica para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar el inicio de la aparición de un evento en la progresión del cáncer, y/o reducir la recurrencia cuando un cáncer está en remisión.

20 Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar en una terapia combinada, es decir, combinada con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o condición a tratar. En consecuencia, en una forma de realización, el medicamento que contiene el anticuerpo es para combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como un agente citotóxico, quimioterapéutico o 25 antiangiogénico.

Producción de anticuerpo

En la presente también se provee un método para producir el anticuerpo, tal como el anticuerpo biespecífico de la invención. En particular, se provee un método para producir el anticuerpo de la invención, que comprende los pasos de

- a) cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión como se define en la presente;
- b) y purificar dicho anticuerpo a partir del medio de cultivo.

5 En formas de realización de la invención, en donde el anticuerpo comprende una región de unión con capacidad de unirse a 5T4 y una región de unión con capacidad de unirse a CD3, se puede producir el anticuerpo utilizando un método que comprende los pasos de

10 a) proveer un anticuerpo con capacidad de unirse a 5T4 mediante el cultivo de una célula huésped que comprende un vector de expresión como se define en la presente en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo con capacidad de unirse a 5T4, y purificar el anticuerpo con capacidad de unirse a 5T4 del medio de cultivo;

b) Proveer un anticuerpo con capacidad de unirse a CD3 mediante el cultivo de una célula huésped que comprende vector de expresión que comprende

15 I) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define en la presente precedentemente; y

20 II) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de cadena liviana de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a CD3 como se define en la presente precedentemente;

25 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo con capacidad de unirse a CD3, y purificar el anticuerpo con capacidad de unirse a CD3 del medio de cultivo;

c) incubar dicho anticuerpo con capacidad de unirse a 5T4 junto con dicho anticuerpo con capacidad de unirse a CD3 en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra sufran una isomerización de enlace disulfuro, y

30 d) obtener dicho anticuerpo.

Kits

La invención además provee un kit de partes que comprende un anticuerpo como se describe precedentemente, tal como un kit para usar como diagnóstico asociado/para identificar dentro de una población de pacientes, aquellos pacientes
5 que tienen una propensión a responder al tratamiento con un anticuerpo como se define en la presente precedentemente o un inmunoconjugado o conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) como se define en la presente precedentemente, o para predecir la eficacia o actividad antitumoral de dicho anticuerpo o inmunoconjugado o ADC cuando se usa en el tratamiento de un paciente, en donde el kit comprende un
10 anticuerpo como se define precedentemente; e instrucciones para usar dicho kit.

Anticuerpos anti-idiotipo

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-idiotipo que se une a un anticuerpo que comprende por lo menos una región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4, es decir un anticuerpo de acuerdo con la invención
15 como se describe en la presente. En formas de realización particulares, el anticuerpo anti-idiotipo se une a la región de unión a antígeno con capacidad de unirse a 5T4.

Un anticuerpo anti-idiotipo (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos en general asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo anti-Id se puede preparar mediante la inmunización de un animal de la
20 misma especie y tipo genético que la fuente de un anticuerpo anti-5T4 monoclonal con el anticuerpo monoclonal contra el cual se prepara un anti-Id. El animal inmunizado típicamente puede reconocer y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante mediante la producción de un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Dichos anticuerpos se describen por
25 ejemplo en US 4.699.880. Dichos anticuerpos son características adicionales de la presente invención.

También se puede usar un anticuerpo anti-Id como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunológica en aún otro animal, produciendo un llamado anticuerpo anti-anti-Id. Un anticuerpo anti-anti-Id puede ser idéntico según los epitopes al
30 anticuerpo monoclonal original, que indujo el anticuerpo anti-Id. Por lo tanto, el uso

de los anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los anticuerpos anti-Id se pueden derivar (produciendo de esta manera variantes del anticuerpo anti-Id) y/o derivatizar mediante cualquier técnica adecuada,

5 tales como las que se describen en alguna otra parte de la presente con respecto a los anticuerpos específicos contra 5T4 de la presente invención. Por ejemplo, se puede acoplar un anticuerpo anti-Id monoclonal a un vehículo tal como la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) y usarse para inmunizar ratones BALB/c. El suero de estos ratones típicamente contendrá anti-anticuerpos anti-Id

10 que tendrán propiedades de unión similares, o idénticas, a un anticuerpo anti-5T4 original/parental.

Secuencias

SEQ ID No:	Nombre	Dominio	Secuencia
1	5T4 de humano	ORF	MPGGCSRGPAAAGDGRLRLARLALVLLG WVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQ PPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLT EVPTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAF ARRPPLAELAAALNLSGSRLDEVRAFAFE HPLSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNA SVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSE GMVVAALLAGRALQGLRRLELASNHFLY LPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVS FRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAEL QGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVT WLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVL LELNSADLDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLA LIGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACR DHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV

2	5T4 de mono cinomolgo	ORF	MPGGCSRGAAGDGRLRLARLALVLLG WVSSSSSTSSASSSSSSAPFLASAASQA PPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLT EVPTDLPLYVRNFLTGNQLAVLPAGAF ARRPPLAELAALNLSGSRLDEVRRGAFE HLPSLRQLDLSHNPLAYLSPFAFSGSNA SISAPSPLVELILNHIVPPDDKRQNRSE GMVAAALVAGRALQGLHLELASNHFLY LPRDVLALQPSLRYLDLSNNSLVSLTYVS FRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAEL QGLPHVRVFLDNNPWVCDCHMADMVT WLKQTGVVQGKDRLTCAFPEKMRNRVL LELNSADLDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLA LIGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACR DHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV
3	5T4 de pollo	ORF	MPGREAERRGALCLGLLLHALLGCGSA QPPAACPAPECECSEAARTVKCVNKNLTE VPPDLPPYVRNLFITGNRLGRLPAGALS APRLAELGSLNLSGNHLRAVEAGALAAL PALRQLDLGGNPLAELSPLAFGRASPLE ELALRGALREQGALLGLADLLQAGALRN LSRLELADNGLLLLPTGMLGALPALRHLD LSNNSLVGLRNVSFQGLVRLQSLNLSN SLGVLRNGTLAQWRGLPALRRISLSHNT WVCDCAIEDMVAWLKESDQVEGKEALS CAFPEKMAGRALLKLNTSELNCSAPVDV PSQLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNR KGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEI NADPRLTNLSSNSDV
4	CD3ε (épsilon) humano maduro	Proteína madura	QDGNEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCP QYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSD EDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPE DANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIV IVDICITGGLLLLVEYWSKNRKAKAKPVT RGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYE PIRKGQRDLYSGLNQRRRI
5	HC_5T4-059	VH	QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAVSGF TFSSYDMNWVRQAPGKGLEWVTFISYD GSNKNYNADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDYSRSWYGDY YGMDVWGQGTTVTVSS
6	HC_5T4-059	VH_CD R1	GFTFSSYD
7	HC_5T4-059	VH_CD R2	ISYDGSNK
8	HC_5T4-059	VH_CD R3	ARDSYSRSWYGDYYGMDV

9	LC_5T4-059	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGI</u> <u>SSW</u> LAWYQQKPEKAPKSLIYA <u>AASSLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQYNSYPLTFGGGGTKVEIK
10	LC_5T4-059	VL_CDR 1	QGISSW
	LC_5T4-059	VL_CDR 2	AAS
11	LC_5T4-059	VL_CDR 3	QQYNSYPLT
12	HC_5T4-076	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTRTAYM ELRSLRSDDTAVYYC <u>ARDPGYFDWLYG</u> DYWGQGTLVTVSS
13	HC_5T4-076	VH_CD R1	GYTFTSYG
14	HC_5T4-076	VH_CD R2	ISAYNGNT
15	HC_5T4-076	VH_CD R3	ARDPGYFDWLYGDY
16	LC_5T4-076	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGI</u> <u>SSA</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>DASSLESG</u> VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQFN <u>SYPR</u> TFGGGGTKVEIK
17	LC_5T4-076	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-076	VL_CDR 2	DAS
18	LC_5T4-076	VL_CDR 3	QQFN <u>SYPR</u> T
19	HC_5T4-085	VH	EVQLLES <u>GGGLVQPGGSLRL</u> SCAAS <u>G</u> <u>F</u> <u>TFSSYAM</u> SWVRQAPGKGLEWVSAIS <u>G</u> <u>S</u> <u>GGSTYN</u> ADSVKGRFTIFRDNSKNTLYLH MNSLRAEDTAVYYC <u>ARDPGYNNVEYLD</u> HWGQGTLVTVSS
20	HC_5T4-085	VH_CD R1	GFTFSSYA
21	HC_5T4-085	VH_CD R2	ISGSGGST
22	HC_5T4-085	VH_CD R3	ARDPGYNNVEYLDH
23	LC_5T4-085	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGI</u> <u>SSA</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>DASSLESG</u> VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQFN <u>SYPL</u> TFGGGGTKVEIK

24	LC_5T4-085	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-085	VL_CDR 2	DAS
25	LC_5T4-085	VL_CDR 3	QQFNSYPLT
26	HC_5T4-106	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYR FTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGD SDARYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTGMYYCARSVLFDYWGQGTL VTVSS
27	HC_5T4-106	VH_CD R1	GYRFTSYW
28	HC_5T4-106	VH_CD R2	IYPGDSDA
29	HC_5T4-106	VH_CD R3	ARSVLFDY
30	LC_5T4-106	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGI SSALAWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLESG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQFNSYPHTFGQGTKLEIK
31	LC_5T4-106	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-106	VL_CDR 2	DVS
32	LC_5T4-106	VL_CDR 3	QQFNSYPHT
33	HC_5T4-127	VH	EVQLLESRGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNSSKKTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDWGSGSYPAEY FQHWGQGTLLTVSS
34	HC_5T4-127	VH_CD R1	GFTFSSYA
35	HC_5T4-127	VH_CD R2	ISGSGGST
36	HC_5T4-127	VH_CD R3	AKDWGSGSYPAEYFQH
37	LC_5T4-127	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAV YYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIK
38	LC_5T4-127	VL_CDR 1	QSVSSY
	LC_5T4-127	VL_CDR 2	DAS

39	LC_5T4-127	VL_CDR 3	QQRSNWLMYT
40	HC_5T4-207	VH	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGG</u> <u>SFSGYYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHSE</u> <u>STNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS</u> <u>VTAADTAVYYCAGWFGELYHYYYGMDV</u> WGQGTTVTVSS
41	HC_5T4-207	VH_CD R1	GGSFSGYY
42	HC_5T4-207	VH_CD R2	IDHSEST
43	HC_5T4-207	VH_CD R3	AGWFGELYHYYYGMDV
44	LC_5T4-207	VL	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV</u> <u>SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT</u> <u>GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV</u> <u>YYCQQRSNWPLTFGGG</u> TKVEIK
45	LC_5T4-207	VL_CDR 1	QSVSSY
	LC_5T4-207	VL_CDR 2	DAS
46	LC_5T4-207	VL_CDR 3	QQRSNWPLT
47	HC_5T4-226	VH	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGG</u> <u>SFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHS</u> <u>GSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLS</u> <u>SVTAADTAVYYCAAWFGELWDYYYGMD</u> <u>VWGQGTTVTVSS</u>
48	HC_5T4-226	VH_CD R1	GGSFSGYY
49	HC_5T4-226	VH_CD R2	IDHSGST
50	HC_5T4-226	VH_CD R3	AAWFGELWDYYYGMDV
51	LC_5T4-226	VL	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV</u> <u>SSFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG</u> <u>IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV</u> <u>YCQQRSNWPLTFGQG</u> TRLEIK
52	LC_5T4-226	VL_CDR 1	QSVSSF
	LC_5T4-226	VL_CDR 2	DAS
53	LC_5T4-226	VL_CDR 3	QQRSNWPLT
54	VH_huCD3- H1L1_CDR1	VH_CD R1	GFTFNTYA

55	VH_huCD3-H1L1_CDR2	VH_CD R2	IRSKYNNYAT
56	VH_huCD3-H1L1_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAY
57	VH_huCD3-H1L1	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTTLVTVSS
58	VL_huCD3-H1L1_CDR1	VL_CDR 1	TGAVTTSNY
	VL_huCD3-H1L1_CDR2	VL_CDR 2	GTN
59	VL_huCD3-H1L1_CDR3	VL_CDR 3	ALWYSNLWV
60	VL_huCD3-H1L1	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQAD DESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
61	VH CDR1-T31P HC_T31P CDR1	VH_CD R1	GFTFNPYA
62	VH T31P secuencia de longitud completa HC_T31P	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNPYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTTLVTVSS
63	VH CDR1-T31M HC_T31M CDR1	VH_CD R1	GFTFNMYA
64	VH T31M secuencia de longitud completa HC_T31M	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNMYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTTLVTVSS
65	VH CDR2-N57E HC_N57E CDR2	VH_CD R2	IRSKYNEYAT
66	VH N57E secuencia de longitud completa HC_N57E	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNEYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTTLVTVSS

67	VH_huCD3-H1L1-H101G_CDR3 HC_H101G_CDR3	VH_CD R3	VRGGNFGNSYVSWFAY
68	VH_huCD3-H1L1-H101G HC_H101G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYV <u>SWFAYWGQGT</u> LTVTSS
69	VH CDR3-H101N HC_H101N_CDR3	VH_CD R3	VRNGNFGNSYVSWFAY
70	VH H101N secuencia de longitud completa HC_H101N	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRNGNFGNSYV <u>SWFAYWGQGT</u> LTVTSS
71	VH CDR3-G105P HC_G105P_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFPNSYVSWFAY
72	VH G105P secuencia de longitud completa HC_G105P	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFPNSYV <u>SWFAYWGQGT</u> LTVTSS
73	VH CDR3-S110A HC_S110A_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVAWFAY
74	VH S110A secuencia de longitud completa HC_S110A	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV <u>AWFAYWGQGT</u> LTVTSS
75	VH CDR3-S110G HC_S110G_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVGWFAY
76	VH S110G secuencia de longitud completa HC_S110G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV <u>GW</u> FAYWGQGT

77	VH CDR3-Y114V HC_Y114V CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAV
78	VH Y114V secuencia de longitud completa HC_Y114V	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV <u>SWFAVWGQGT</u> LTVTSS
79	VH CDR3-Y114M HC_Y114M CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAM
80	VH Y114M secuencia de longitud completa HC_Y114M	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV <u>SWFAMWGQGT</u> LTVTSS
81	VH CDR3-Y114R HC_Y114R CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAR
82	VH Y114R secuencia de longitud completa HC_Y114R	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYV <u>SWFARWGQGT</u> LTVTSS
83	HC_5T4-A1	VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNFGMNWVKQGPGEGLKWMGWINTNT</u> <u>GEPRYAEEFKGRFAFSLETTASTAYLQIN</u> NLKNEDTATYFCARDWDGAYFFDYWG QGTTTLTVSS
84	LC_5T4-A1	VL	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSV <u>SNDVAWYQQKPGQSPKLLINFATNRYT</u> GVPNRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLA LYFCQQDYSSPWTFGGGKLEIK
85	HC_5T4-A3	VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK SNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRQWDYDVRA <u>MNYWGQGT</u> SVTVSS
86	LC_5T4-A3	VL	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQD <u>VDTAVAWYQQKPGQSPKLLIWASTRLT</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA DYFCQQYSSYPYTFGGGKLEIK

87	HC_5T4-H8	VH	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKAS <u>GYS</u> <u>FTGY</u> YMHVVKKQSHGKSLEWIGRI <u>NPN</u> <u>GV</u> TLYNQKF KDK AILTVDKSSTTAYMEL RSLTSEDSAVYYC <u>AR</u> STMITNYVMDY <u>W</u> GQVTSVTVSS
88	LC_5T4-H8	VL	SIVMTQTPTFLLVSAGDRVITICKAS <u>QSV</u> <u>SND</u> VAWYQQKPGQSPTLLISY <u>TSS</u> RYA GVPDRFIGSGYGTDFFTISTLQAEDLAV YFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK
89	IgG1-Fc	Constan te	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	IgG1- Fc_F405L	Constan te	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	IgG1-Fc_FEA	Constan te	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

92	IgG1-Fc_FEAL	Constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	IgG1-Fc_FEAR	Constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	IgG1-Fc_K409R	Constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	Kappa	Constante	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
96	Lambda	Constante	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

97	b12_VH	VH	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGY</u> <u>RFSNFIHWVRQAPGQRFWMGWINPY</u> <u>NGNKEFSAKFQDRVTFADTSANTAYM</u> <u>ELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSP</u> <u>QDNYMDVWGKGTTVIVSS</u>
98	b12_VL	VL	<u>EIVLTQSPGTLSSLSPGERATFSCRSSH</u> <u>RSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRA</u> <u>SGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFA</u> <u>LYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK</u>
99	5T4ECDHis	ORF	<u>MPGGCSRGAAGDGRLRLARLALVLLG</u> <u>WVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQ</u> <u>PPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLT</u> <u>EVPTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAF</u> <u>ARRPPLAELALNLSGSRLDEVRAFAFE</u> <u>HLP SLRQLDL SHNPLADLSPFAFSGSNA</u> <u>SVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSE</u> <u>GMVVAALLAGRALQGLRRLELASNHFLY</u> <u>LPRDVL AQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVS</u> <u>FRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAEL</u> <u>QGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVT</u> <u>WLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVL</u> <u>LELNSADLDCDPILPPSLQTSHHHHHHH</u> <u>H</u>
100	5T4ECD91- FcRbHis	ORF	<u>MPGGCSRGAAGDGRLRLARLALVLLG</u> <u>WVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQ</u> <u>PPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLT</u> <u>EVPTDLP AAPSTCSKPTCPPPELLGGPS</u> <u>VFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ</u> <u>DDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQ</u> <u>FNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKV</u> <u>HNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMG</u> <u>PPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE</u> <u>WEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGSYFLY</u> <u>SKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSISRSPGKHHHHHHHHH</u>
101	CD3E27- GSKa	ORF	<u>MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWAQDGNE</u> <u>EMGGITQTPYKVISGTTVILTGGGGSG</u> <u>GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERA</u> <u>TLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL</u> <u>LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT</u> <u>SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGT</u> <u>RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS</u> <u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY</u> <u>EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u>

102	HC_574-059 HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR3 C-term	YYGMDV
103	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR-2	IDHSX ₁ ST; X ₁ es G o E
104	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR-3	AX ₂ WFGELX ₃ X ₄ YYYGMDV; X ₂ es A o G, X ₃ es W o Y, X ₄ es D o H
105	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VL- CDR-1	QSVSSX ₅ ; X ₅ es Y o F

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos anti-5T4 y materiales de cribado

Expresión de construcciones para 5T4

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de diversas variantes de 5T4 de longitud completa: 5T4 de humano (*Homo sapiens*) (No. de acceso a Uniprot Q13641), 5T4 de mono cinomolgo (10 *Macaca fascicularis*) (No. de acceso a Uniprot Q4R8Y9), y 5T4 de pollo (*Gallus gallus*) (No. de acceso a Uniprot R4GM46). Además, se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para diversas variantes de dominio extracelular (ECD) de 5T4: el ECD de 5T4 de humano (aa 1-355 del No. de acceso a Uniprot Q13641) con un rótulo His C terminal (5T4ECDHis) (SEQ ID No: 99), y el (15 ECD de 5T4 de humano (aa 1-91) fusionado al dominio Fc de conejo y a rótulo His C terminal (5T4ECD91-FcRbHis). En la SEQ ID No: 99, los residuos de aminoácidos 1-31 son un péptido señal; por lo tanto, la proteína 5T4ECDHis madura corresponde a los residuos de aminoácidos 32-363 de la SEQ ID No: 99. De forma similar, los residuos de aminoácidos 1-31 de la SEQ ID No: 100 son un péptido señal y la (20 proteína 5T4ECD91-FcRbHis madura corresponde a los residuos de aminoácidos 32-327 de la SEQ ID No: 100.

Las construcciones contuvieron sitios de restricción adecuados para el clonado y una secuencia de Kozak óptima (GCCGCCACC) (Kozak, M., Gene 1999;234(2):187-

208). Las construcciones con codones optimizados de 5T4 de longitud completa de humano y 5T4 de mono cinomolgo se clonaron en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.3 (Invitrogen). Las construcciones con codones optimizados de 5T4 de pollo de longitud completa se clonaron en pSB, un vector de expresión en mamíferos que contiene las repeticiones terminales invertidas Sleeping Beauty flanqueando un casete de expresión que consiste en un promotor de CMV y la señal de poliA de HSV-TK.

Generación de líneas celulares HEK-293F que expresan de manera transitoria la 5T4 de longitud completa humana, de cinomolgo o de pollo

Se obtuvieron las células Freestyle™ 293-F (un subclón de HEK-293 adaptado a cultivo en suspensión y medio Freestyle químicamente definido [HEK-293F]) de Invitrogen (no. de cat. R790-07) y se transfectaron con las construcciones con codones optimizados que se describieron anteriormente, usando 293fectin (Invitrogen, no. de cat. 12347-019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15

Purificación de 5T4 con rótulo His

Se expresó la 5T4ECDHis (proteína madura de SEQ ID No: 99) en las células HEK-293F como se describió anteriormente. Se expresó la 5T4ECD91-FcRbHis usando la plataforma de expresión Expi293F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU., no. de cat. A14527) esencialmente tal como lo describe el fabricante.

20

El rótulo His permite la purificación por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. En este proceso, se carga un quelante fijado a la resina cromatográfica con cationes Co^{2+} . Los sobrenadantes que contenían la proteína marcada con His se incubaron con la resina en modo de lotes (es decir, en solución). La proteína marcada con His se une fuertemente a las esferas de resina, mientras que las otras proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo no se unen, o lo hacen en forma débil en comparación con las proteínas con rótulos His. Después de la incubación, se recogieron las esferas del sobrenadante y se empaquetaron en una columna. Se lavó la columna para eliminar las proteínas débilmente unidas. Luego se eluyeron las proteínas con rótulos His fuertemente unidas con una solución amortiguadora que

25

30

contenía imidazol, el cual compite por la unión de His al Co^{2+} . Se eliminó el eluyente mediante intercambio con solución amortiguadora en una columna de desalado.

Inmunización

- 5 Para la generación de los anticuerpos IgG1-5T4-207 e IgG1-5T4-226, se inmunizaron ratones transgénicos HCo17-BalbC (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY, EE.UU.) alternativamente por vía intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) con 20 μg de la proteína 5T4ECDHis en sistema adyuvante Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU., no. de cat. S6322) con un intervalo de 14 días. En total, se llevaron a cabo 8 inmunizaciones: 4 IP y 4 SC.
- 10 Para la generación de los anticuerpos IgG1-5T4-076 e IgG1-5T4-059, se inmunizaron ratones transgénicos HCo12-BalbC (IgG1-5T4-076) y HCo20-BalbC (IgG1-5T4-059), (Bristol-Myers Squibb) en forma alternativa IP y SC con 20 μg de la proteína 5T4ECDHis en sistema adyuvante Sigma con un intervalo de 14 días. En total, se llevaron a cabo 8 inmunizaciones: 4 IP y 4 SC.
- 15 Para la generación del anticuerpo IgG1-5T4-085, se inmunizaron ratones transgénicos HCo17-BalbC en forma alternativa IP y SC con 20 μg de la proteína 5T4ECDHis y 20 μg de la proteína madura 5T4ECD91-FcRbHis en sistema adyuvante Sigma con un intervalo de 14 días. En total, se llevaron a cabo 8 inmunizaciones: 4 IP y 4 SC.
- 20 Para la generación de los anticuerpos IgG1-5T4-106 e IgG1-5T4-127, se inmunizaron ratones transgénicos HCo12-BalbC (IgG1-5T4-106) y HCo17-BalbC (IgG1-5T4-127) en forma alternativa IP y SC con 20 μg de la proteína madura 5T4ECD91-FcRbHis en sistema adyuvante Sigma con un intervalo de 14 días. En total, se llevaron a cabo 8 inmunizaciones: 4 IP y 4 SC.
- 25 Los ratones con por lo menos dos títulos secuenciales de anticuerpo específico anti-5T4 en el cribado específico de antígeno Fluorometric Micro volume Assay Technology (FMAT) como se describe más adelante, se reforzaron con 10 μg de 5T4ECDHis o 10 μg de 5T4ECD91-FcRbHis (en PBS inyectado por vía intravenosa) y se fusionaron los esplenocitos y las células de ganglio linfático de estos ratones
- 30 entre 3 y 4 días más tarde.

Ensayo homogéneo de cribado específico de antígeno

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-5T4 en el suero de ratones inmunizados o sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma de HuMAb (anticuerpo monoclonal humano) mediante ensayos homogéneos de cribado
5 específico de antígeno usando FMAT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para esto, se usó una combinación de 4 ensayos basados en células.

Se analizaron los sueros de los ratones inmunizados o muestras de sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma para ver la unión de los anticuerpos humanos a las células HEK-293F que expresan de manera transitoria 5T4 de humano, células
10 HEK-293F que expresan de manera transitoria 5T4 de mono cinomolgo, partículas de poliestireno recubiertas con estreptavidina (0,5% p/v; 6,7 µm; Spherotech, Lake Forest, IL, EE.UU., no. de cat. SVP-60-5) recubiertas con 5T4ECD91-FcRBHis, y células HEK-293 de tipo salvaje (control negativo).

Se agregaron las muestras a las células para permitir la unión a 5T4.
15 Posteriormente, se detectó la unión de HuMAb usando un conjugado fluorescente (AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647; Jackson ImmunoResearch, no. de cat. 109-605-098). Se usó IgG1-5T4-H8-F405L como control positivo y se usó ChromPure Human IgG, molécula completa (Jackson ImmunoResearch, no. de cat. 009-000-003) como control negativo. Se escanearon
20 las muestras usando un equipo ImageXpress Velos (Molecular devices, LLC, Sunnyvale, CA, EE.UU.) y se usó la fluorescencia total como lectura final. Las muestras se consideraron como positivas cuando las cuentas fueron mayores de 50 y las cuentas x fluorescencia resultó al menos tres veces mayor en comparación con el control negativo.

25 Generación de hibridomas de HuMAb

Se sacrificaron los ratones HuMAb con un desarrollo suficiente de título específico contra el antígeno (descrito precedentemente) y se recolectaron el bazo y los ganglios linfáticos que flanqueaban la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de los esplenocitos y las células de ganglio linfático a una línea celular de mieloma de
30 ratón (células SP2.0 cells) se hizo por electrofusión usando un sistema CytoPulse

CEEF 50 Electrofusion System (Cellecstis, París, Francia), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, se subclonaron los pocillos primarios positivos para antígeno usando el sistema ClonePix (Genetix, Hampshire, R.U.). Para este fin, se sembraron los hibridomas de los pocillos primarios específicos en medio semisólido elaborado con 40% de CloneMedia (Genetix, Hampshire, R.U.) y 60% de medio completo HyQ 2x (Hyclone, Waltham, EE.UU.). Se volvieron a ensayar los clones para evaluar la unión a 5T4 de acuerdo con el ensayo de unión específico de antígeno como se describió precedentemente y se escanearon usando el sistema IsoCyte (Molecular Devices). Se midieron los niveles de IgG usando un sistema Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.) con el objetivo de seleccionar el clon de mejor producción por cada pocillo primario para su expansión adicional. Se realizó la expansión adicional y se cultivaron los hibridomas de HuMAb resultantes en base a protocolos estándares (por ejemplo como se describe en Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Análisis de secuencia de los dominios variables de anticuerpo anti-5T4 y clonado en vectores de expresión

Se preparó el ARN total a partir de entre 2 y 5×10^6 células de hibridoma y ADN complementario (ADNc) por 5'-RACE a partir de 100 ng de ARN total, usando el kit SMART RACE cDNA Amplification (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificaron las regiones codificantes VH y VL por PCR y se clonaron directamente, en marco, en los vectores de expresión p33G1f y p33Kappa (vectores basados en pcDNA3.3 con dominios constantes de IgG1m(f) y Kappa humanos con codones optimizados, respectivamente), mediante clonado independiente de ligación (Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74). Los dominios variables de estos vectores de expresión se secuenciaron y se anotaron las CDR de acuerdo con las definiciones de IMGT (Lefranc MP. y col., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 and Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). Se expresaron los clones con un Marco Abierto de Lectura (ORF) correcto y se ensayaron para estudiar su unión al antígeno. Se ordenó un panel líder en forma de secuencias con codones optimizados (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) y se

produjo con el sistema de expresión Expi293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Los anticuerpos de estos sobrenadantes se purificaron y usaron para caracterización funcional. Las secuencias de los clones líderes resultantes se muestran en la tabla anterior.

5 *Anticuerpos anti-5T4 control*

En algunos de los Ejemplos se usaron anticuerpos de comparación contra 5T4 (IgG1-5T4-H8, IgG1-5T4-A3 e IgG1-5T4-A1) que se habían descrito previamente en WO2007/106744. Se sintetizaron las secuencias codificantes de los anticuerpos con codones optimizados y se clonaron en vectores de expresión pCDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific).

Anticuerpo IgG1-b12

En algunos de los Ejemplos, se usó el anticuerpo b12, un anticuerpo específico anti-gp120 de HIV-1 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23) como control negativo. Se sintetizaron las secuencias codificantes de anticuerpo con codones optimizados para este anticuerpo control y se clonaron en vectores de expresión pCDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific). La secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) y la secuencia de la región variable de cadena liviana (VL) se incluyen en la presente como las SEQ ID Nos.: 97 y 98, respectivamente.

Ejemplo 2 – Determinación de las afinidades de unión de los anticuerpos específicos para 5T4 usando interferometría en biocapa

Se determinaron las afinidades de los anticuerpos anti-5T4 para la proteína recombinante 5T4 usando interferometría en biocapa libre de marcadores en un instrumento Octet HTX (ForteBio, Portsmouth, R.U.). Se inmovilizaron los anticuerpos anti-5T4 (1 µg/mL) durante 600 segundos en biosensores de captura anti-Fc de IgG humana (ForteBio). Después de una medida basal (100 s), se determinó la asociación (200 s) y la disociación (1000 s) de 5T4ECDHis de humano (proteína madura de SEQ ID No: 99) o la proteína recombinante 5T4 de mono cinomolgo (Cusabio; no. de cat. CSB-MP024093MOV) en Diluyente de Muestras (ForteBio) usando una serie de diluciones al medio (en el rango entre 100 nM y 1,56 nM) comenzando a 3,58 µg/mL (100 nM) de 5T4ECDHis de humano o 3,99 µg/mL

(100 nM) de 5T4 de cinomolgo, agitando a 1000 rpm a 30°C. Se analizaron los datos con el programa de computación Data Analysis Software v9.0.0.12 (ForteBio). Se sustrajeron los valores de los pocillos de referencia, los cuales contenían solamente Diluyente de Muestras durante los pasos de asociación y disociación, de los valores de los pocillos que contenían antígeno, para cada anticuerpo por separado. Se alineó el eje Y a los últimos 10 s de la línea de base y se aplicó un alineamiento de Corrección Entre Pasos a la disociación, así como también un filtrado de Savitzky-Golay. Las respuestas < 0,05 nm se excluyeron del análisis. Se ajustaron los datos usando el modelo 1:1 y un ajuste completo global con 200 s de tiempo de asociación y 1000 s o 50 s de tiempo de disociación como Ventana de Interés. El ajuste con el tiempo de disociación completo (1000 s) como Ventana de Interés se usó como valor por omisión. En base al valor de R^2 y a una inspección visual del ajuste, se usó un tiempo de disociación de 50 s como Ventana de Interés para IgG1-5T4-127-FEAR.

En la Tabla 1 se muestra la constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms), la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) y la constante de disociación en equilibrio K_D (M) de los anticuerpos anti-5T4 para 5T4ECDHis de humano determinadas por interferometría en biocapa. El rango de afinidades de los anticuerpos contra 5T4 de humano medido estuvo en el rango entre $1,3 \times 10^{-9}$ y $2,7 \times 10^{-8}$ M. La respuesta de IgG1-5T4-085-FEAR fue menor que 0,05 nm, lo que impidió el ajuste apropiado de los datos (bajos valores de R^2 para estos ajustes). Más aún, la respuesta de IgG1-5T4-076-FEAR no se pudo ajustar en forma apropiada. Estos datos se muestran con letras en *itálica*.

En la Tabla 2 se muestra la constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms), la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) y la constante de disociación en equilibrio K_D (M) para 5T4 de mono cinomolgo, determinadas por interferometría en biocapa. El rango de afinidades de los anticuerpos anti-5T4 de mono cinomolgo se midió en el rango entre $1,1 \times 10^{-9}$ y $4,1 \times 10^{-8}$ M. Las respuestas de IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-H8-FEAR fueron menores que 0,05 nm, lo que impidió el ajuste apropiado de los datos (bajos valores de R^2 para estos ajustes). Más aún, la respuesta de IgG1-5T4-076-FEAR no se pudo ajustar en forma apropiada. Estos datos se muestran con letras en *itálica*.

Tabla 1: Afinidades de unión de anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes al dominio extracelular de 5T4 de humano determinadas por interferometría en biocapa libre de marcadores.

Anticuerpo	k_a de velocidad de asociación (1/Ms)	k_d de velocidad de disociación (1/s)	K_D (M)
IgG1-5T4-059-FEAR	2,1E+05	3,2E-04	1,5E-09
<i>IgG1-5T4-076-FEAR</i>	<i>Si ajuste</i>		
<i>IgG1-5T4-085-FEAR</i>	<i>Respuesta <0,05 nm</i>		
IgG1-5T4-106-FEAR	2,1E+05	1,2E-03	5,5E-09
IgG1-5T4-127-FEAR	5,8E+05	1,6E-02	2,7E-08
IgG1-5T4-207-FEAR	2,7E+05	6,8E-04	2,6E-09
IgG1-5T4-226-FEAR	3,3E+05	8,1E-04	2,5E-09
IgG1-5T4-H8-FEAR	2,2E+05	2,9E-04	1,3E-09

- 5 Tabla 2: Afinidades de unión de anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes al dominio extracelular de 5T4 de mono cinomolgo determinadas por interferometría en biocapa libre de marcadores.

Anticuerpo	k_a de velocidad de asociación (1/Ms)	k_d de velocidad de disociación (1/s)	K_D (M)
IgG1-5T4-059-FEAR	1,6E+05	2,8E-04	1,8E-

			09
<i>IgG1-5T4-076- FEAR</i>	<i>Sin ajuste</i>		
<i>IgG1-5T4-085- FEAR</i>	<i>Respuesta <0,05 nm</i>		
<i>IgG1-5T4-106- FEAR</i>	<i>Respuesta <0,05 nm</i>		
IgG1-5T4-127- FEAR	3,7E+05	1,5E-02	4,1 E- 08
IgG1-5T4-207- FEAR	1,4E+05	8,7E-04	6,3 E- 09
IgG1-5T4-226- FEAR	1,4E+05	1,5E-03	1,1 E- 08
<i>IgG1-5T4-H8- FEAR</i>	<i>Respuesta <0,05 nm</i>		

Ejemplo 3 – Bloqueo cruzado de anticuerpos anti-5T4 determinado por interferometría en biocapa

- Se llevó a cabo un análisis de bloqueo cruzado de anticuerpos (agrupamiento de epitopes) usando interferometría en biocapa en un instrumento Octet HTX (ForteBio). Se inmovilizaron los anticuerpos anti-5T4 (20 µg/mL en solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM pH 6.0, ForteBio) sobre biosensores Reactivos a Amina de 2da Generación (AR2G) (ForteBio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una medida basal (100 s) en Diluyente de
- 5 Muestras (ForteBio), se cargaron los biosensores que contenían anticuerpos inmovilizados durante 500 s con 5T4ECDHis de humano (proteína madura de SEQ ID No: 99) 100 nM (3,6 µg/mL). Luego, se determinó la respuesta de asociación de un segundo anticuerpo anti-5T4 (10 µg/mL) durante 500 s. Se regeneraron los biosensores mediante exposición de 3 veces por 5 s a glicina 10 mM, pH 2,5,
- 10

seguido por Diluyente de Muestras, y se repitió la medida con un nuevo conjunto de segundos anticuerpos anti-5T4, comenzando desde el paso basal. Se usó cada biosensor cuatro veces. Las medidas se llevaron a cabo a 30°C usando una velocidad de agitación de 1000 rpm. Se analizaron los datos usando el programa de

5 computación Data Analysis Software v9.0.0.12 (ForteBio). Se alineó el eje Y al paso de asociación y se aplicó un filtrado de Savitzky-Golay. Se sustrajo la respuesta del Diluyente de Muestras durante el paso de asociación de la respuesta de asociación del segundo anticuerpo con el objetivo de corregir la disociación del 5T4ECDHis desde el anticuerpo inmovilizado. Se graficaron las respuestas de asociación

10 corregidas en un formato de matriz. En general, las respuestas $> 0,1$ nm se consideraron como pares de anticuerpos no bloqueantes (color blanco), mientras que las respuestas entre $-0,1$ y $0,1$ nm se consideraron como pares de anticuerpos bloqueantes (color gris oscuro). Para algunos pares de anticuerpos, el segundo anticuerpo mostró una respuesta inicial positiva, seguido por una disminución de la

15 señal. Esto se consideró como un desplazamiento de anticuerpo (color gris claro), es decir el segundo anticuerpo desplazando la interacción entre el primer anticuerpo y el antígeno (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, y col. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535). En algunos casos, las curvas de datos

20 necesitaron una inspección visual por parte de un experto para asignar propiedades de bloqueo, no bloqueo o desplazamiento a los pares de anticuerpos.

Los experimentos de bloqueo cruzado se llevaron a cabo para los anticuerpos IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-076-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR,

25 IgG1-5T4-127-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, y para los anticuerpos del arte previo IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L e IgG1-5T4-A3-F405L. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Ninguno de los anticuerpos (excepto por el mismo IgG1-5T4-A1-F405L) bloqueó la unión de IgG1-5T4-A1-F405L a 5T4ECDHis. Los anticuerpos IgG1-5T4-076-FEAR,

30 IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-127-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR (así como también el mismo

IgG1-5T4-H8-FEAR) bloquearon la unión de IgG1-5T4-H8-FEAR a 5T4ECDHis. Los anticuerpos IgG1-5T4-076-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR, e IgG1-5T4-127-FEAR (así como también el mismo IgG1-5T4-A3-F405L) también bloquearon la unión de IgG1-5T4-A3-F405L a 5T4ECDHis, mientras que los anticuerpos IgG1-5T4-106-FEAR e
5 IgG1-5T4-H8-FEAR no bloquearon la unión de IgG1-5T4-A3-F405L a 5T4ECDHis. Los anticuerpos IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR presentaron un desplazamiento de anticuerpo en combinación con el IgG1-5T4-A3-F405L, lo cual se describe en forma más detallada en el Ejemplo 4.

10 Tabla 3: bloqueo cruzado de anticuerpos determinado por interferometría en biocapa.

En la primera columna se presentan los anticuerpos inmovilizados y en la primera fila se presentan los anticuerpos en solución. Se muestran las respuestas de asociación corregidas de los anticuerpos en solución. El bloqueo cruzado de los anticuerpos se indica mediante un color gris oscuro, las combinaciones de
15 anticuerpos con desplazamiento se indican con color gris claro y un asterisco. Las combinaciones de anticuerpos sin bloqueo están sin marcar (fondo transparente).

	A1	A3	076	085	127	106	H8	059	207	226
A1	- 0,01	0,76	0,36	0,72	0,87	0,85	0,89	0,91	0,86	0,86
A3	0,69	0,01	0,00	0,00	0,01	0,57	0,50	*	*	*
076	0,04	0,00	- 0,01	- 0,02	- 0,02	- 0,02	0,00	- 0,02	0,05	0,05
085	0,07	- 0,01	- 0,01	- 0,01	0,00	- 0,01	- 0,01	- 0,04	0,08	0,07
127	0,15	- 0,01	- 0,02	- 0,01	- 0,01	- 0,01	- 0,02	- 0,05	0,16	0,16
106	0,79	0,56	- 0,03	- 0,04	- 0,02	- 0,02	- 0,02	- 0,03	- 0,03	- 0,02
H8	0,64	0,49	- 0,02	- 0,02	- 0,01	- 0,01	0,00	- 0,02	- 0,01	- 0,01
059	0,96	*	0,00	- 0,02	- 0,10	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
207	1,29	*	1,22	1,03	1,29	- 0,01	- 0,01	- 0,02	- 0,02	- 0,02
226	1,56	*	1,47	1,35	1,51	- 0,02	- 0,01	- 0,02	- 0,02	- 0,02

Ejemplo 4 - Desplazamiento de anticuerpo de IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-
FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR en combinación con IgG1-5T4-A3-F405L

- 5 Se demostró el desplazamiento de anticuerpo usando interferometría en biocapa en un instrumento Octet HTX (ForteBio). Se inmovilizó el IgG1-5T4-A3-F405L (20 µg/mL en solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM pH 6,0, ForteBio) sobre biosensores Reactivos a Amina de 2da Generación (AR2G) (ForteBio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una medida basal (100 s)
- 10 en Diluyente de Muestras (ForteBio), se cargaron los biosensores que contenían los

anticuerpos IgG1-5T4-A3-F405L inmovilizados durante 500 s con 5T4ECDHis de humano (proteína madura de SEQ ID No: 99) 100 nM (3,6 µg/mL). Luego, se determinó la respuesta de asociación de un segundo anticuerpo anti-5T4(IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR o IgG1-5T4-226-FEAR; 10 µg/mL) o Diluyente de Muestras (solución amortiguadora control) durante 500 s. El experimento se llevó a cabo a 30°C usando una velocidad de agitación de 1000 rpm. Se analizaron los datos usando el programa de computación Data Analysis Software v9.0.0.12 (ForteBio). Se sustrajo la respuesta de la solución amortiguadora control de las respuestas de los anticuerpos secundarios para corregir en función de la disociación del 5T4ECDHis de humano y el IgG1-5T4-A3-F405L inmovilizado, se alineó el eje Y al paso de asociación y se aplicó un filtrado de Savitzky-Golay.

Como se muestra en la Figura 1, el IgG1-5T4-A3-F405L no mostró unión, lo que indica un bloqueo cruzado (auto bloqueo) con el IgG1-5T4-A3-F405L. El IgG1-5T4-H8-FEAR presentó unión a 5T4ECDHis y por lo tanto no mostró bloqueo cruzado con IgG1-5T4-A3-F405L. El IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR inicialmente mostraron una respuesta positiva (lo que indica su unión al complejo IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis en lugar de un bloqueo cruzado con IgG1-5T4-A3-F405L), seguido por una disminución de la respuesta que cayó por debajo de la respuesta de auto bloqueo del IgG1-5T4-A3-F405L. Esto demuestra una pérdida de masa del complejo IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis, lo que indica que IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR inducen una disociación de 5T4ECDHis de humano y IgG1-5T4-A3-F405L ante la unión al complejo. Este fenómeno se ha descrito como un desplazamiento de anticuerpo e indica que los epitopes son estrechamente adyacentes o mínimamente superpuestos (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, y col. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535)). Esto indica que los anticuerpos IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR se unen a un epítopo diferente sobre 5T4, en comparación con el IgG1-5T4-A3-F405L.

Ejemplo 5 - Unión simultánea de anticuerpos anti-5T4 a 5T4 unida a membrana por medida mediante citometría de flujo

Se evaluó la unión de los anticuerpos IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR a 5T4 unida a membrana en presencia de IgG1-5T4-A1-F405L e IgG1-5T4-A3-F405L mediante citometría de flujo. Se conjugaron IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron células SK-OV-3 (50.000 células por condición), las cuales expresan aproximadamente 20.000 5T4 moléculas/célula, con mezclas de 10 µg/mL de anticuerpos anti-5T4 no conjugados (IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-b12, IgG1-5T4-207-FEAR o IgG1-5T4-226-FEAR) y 2 µg/mL de anticuerpos anti-5T4 conjugados con FITC (IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC, IgG1-5T4-207-FEAR-FITC e IgG1-5T4-226-FEAR-FITC). En la Tabla 4 se muestra un resumen de las combinaciones ensayadas. Después de 30 min de incubación a 4°C, se centrifugaron las células a 1200 RPM durante 5 min, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 100 µL de solución amortiguadora para FACS suplementada con 1:4000 Topro-3-iodo (Molecular Probes). Se midió la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) de la señal del FITC usando un citómetro de flujo (FACS Fortessa, BD Biosciences). Se calculó el porcentaje de unión mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{([MFI \text{ de células con Ab-FITC y Ab no conjugado} - MFI \text{ de células sin Ab-FITC o Ab no conjugado}] * 100)}{(MFI \text{ de células con Ab-FITC y control de isotipo} - MFI \text{ de células sin Ab-FITC o Ab no conjugado})}$$

En la Figura 2 se muestra que la unión de IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC, IgG1-5T4-207-FEAR-FITC e IgG1-5T4-226-FEAR-FITC se bloqueó en presencia de su contraparte no conjugada. Sin embargo, aún se pudo observar la unión de IgG1-5T4-207-FEAR-FITC e IgG1-5T4-226-FEAR-FITC a 5T4 unida a membrana en presencia de IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L o IgG1-b12 no conjugados, y la misma fue comparable a la unión de IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC a 5T4 unida a membrana en presencia de IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L o IgG1-b12 no conjugados. Esto demuestra que los anticuerpos IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR e

IgG1-5T4-226-FEAR se unen a un epítopo distinto sobre 5T4, en comparación con los anticuerpos IgG1-5T4-A1-F405L e IgG1-5T4-A3-F405L.

Tabla 4: Resumen de las combinaciones de anticuerpos que se usaron en el experimento por citometría de flujo.

	Anticuerpo conjugado con FITC (2 µg/mL)	Anticuerpo no conjugado (10 µg/mL)
1	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
2	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
3	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR
4	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
5	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
6	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-b12
7	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
8	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
9	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR
10	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
11	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
12	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-b12
13	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
14	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
15	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR
16	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
17	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
18	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-b12

5 Ejemplo 6 - Unión de anticuerpos anti-5T4 a células HEK-293 transfectadas con 5T4 de humano o de pollo

Se analizó la unión de los anticuerpos anti-5T4 a las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con la 5T4 de longitud completa de humano o de pollo (generada como se describió en el Ejemplo 1) mediante citometría de flujo. Se incubaron las células (5×10^4 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner bio-one, no. de cat. 650180) con diluciones seriadas de los anticuerpos anti-5T4 (rango entre 0,01 y 10 µg/mL en pasos de diluciones al tercio) en 50 µL de PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de tinción) a 4°C durante 30 min. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción, se incubaron las células con 50 µL de R-F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con ficoeritrina (PE) (1:500 en solución amortiguadora de tinción; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove,

PA, no. de cat. 109-116-098) a 4°C durante 30 min. Se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción, se resuspendieron en 20 µL de solución amortiguadora de tinción y se analizaron en un cribador iQue (Intellicyt Corporation, EE.UU.). Se analizaron las curvas de unión por regresión no lineal (respuesta a
5 dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

En la Figura 3A se muestra la unión dependiente de la dosis de IgG1-5T4-207-
FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-A3-F405L a las
células HEK-293 transfectadas con 5T4 de humano de longitud completa. En la
10 Figura 3B se muestra que, aunque se observó una unión dependiente de la dosis de IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de pollo longitud completa, el IgG1-5T4-A3-F405L
presentó una unión mínima a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de pollo
longitud completa. El anticuerpo control negativo, IgG1-b12-K409R, no presentó
15 unión a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de longitud completa de humano
o de pollo a una concentración de 10 µg/mL.

Ejemplo 7 – Capacidad de internalización de los anticuerpos anti-5T4 en células tumorales

Se llevaron a cabo experimentos para caracterizar la capacidad de internalización de
20 los anticuerpos anti-5T4 monovalentes. La administración de carga intracelular y la citotoxicidad resultante se usaron como evidencias de la internalización de los anticuerpos anti-5T4 ante la unión a la diana. Se generaron anticuerpos
bienespecíficos conjugados a toxina que reconocen a 5T4 con un brazo Fab, a la vez
que reconocen a un antígeno irrelevante (gp120 de HIV-1, que no se expresa en las
25 células tumorales) con el segundo brazo Fab, mediante intercambio controlado de
brazos Fab de anticuerpos no conjugados anti-5T4 con anticuerpos IgG1-b12
(específicos para gp120 de HIV-1) que se habían conjugado con el agente de
disrupción de microtúbulos Duostatin-3. Los anticuerpos bienespecíficos resultantes
conjugados con Duostatin-3 portan 1 molécula de toxina por anticuerpo (proporción
30 fármaco a anticuerpo de 1). Se agregaron diluciones seriadas (entre 0,00152 y 10
µg/mL, al tercio) de los anticuerpos bienespecíficos conjugados con Duostatin-3 que se

unen en forma monovalente a 5T4, a células MDA-MB-468 (línea celular de cáncer de mama, ATCC, clon HTB-132) o HCC1954 (línea celular de cáncer de mama, ATCC, clon CRL-2338) sembradas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo (5.000 células/pocillo; Greiner-bio-one, Países Bajos, no. de cat. 655180). Se incubaron las células durante 5 días a 37°C, después de lo cual se ensayó la viabilidad celular usando un ensayo CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, EE.UU., no. de cat. G7570) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron las curvas de citotoxicidad usando una regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

En la Figura 4 se muestra la capacidad citotóxica de los anticuerpos biespecíficos conjugados con Duostatin-3 que se unen en forma monovalente a 5T4 en células MDA-MB-468 (A) o HCC1954 (B). El BslgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3 tuvo una alta capacidad de inducción de citotoxicidad, lo que indica una capacidad de internalización eficaz del anticuerpo. Por el contrario, el bslgG1-5T4-076-FEARxb12-vcDuo3, bslgG1-5T4-085-FEARxb12-vcDuo3 y bslgG1-5T4-127-FEARxb12-vcDuo3 no indujeron ninguna citotoxicidad; las curvas de respuesta a dosis fueron similares a las del anticuerpo control sin unión IgG1-b12-vcDuo3. Esto indica una baja internalización de aquellos anticuerpos ante la unión a 5T4 unida a membrana. El BslgG1-5T4-059-FEARxb12-vcDuo3, el bslgG1-5T4-106-FEARxb12-vcDuo3, el bslgG1-5T4-207-FEARxb12-vcDuo3 y el bslgG1-5T4-226-FEARxb12-vcDuo3 indujeron una citotoxicidad intermedia en ambas líneas celulares ensayadas, lo que indica que estos anticuerpos anti-5T4 monovalentes indujeron la internalización, pero en una menor extensión, en comparación con el bslgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3.

Ejemplo 8 – Anticuerpos anti-CD3 humanizados para la generación de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4

La generación del anticuerpo humanizado IgG1-huCD3-H1L1 se describe en el Ejemplo 1 de WO2015/001085. El IgG1-huCD3-H1L1 se denomina en la presente 'IgG1-huCD3'. El anticuerpo IgG1-huCD3-H1L1-FEAL es una variante del mismo

con sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc que impiden las interacciones con los receptores Fc de la IgG (receptores Fc gamma [FcγR]) y el complemento, además de una mutación que permite la generación de los anticuerpos biespecíficos a través de intercambio controlado de brazos Fab: L234F, L235E, D265A y F405L, como se describió en la presente precedentemente. Previamente se ha demostrado que esta mutación no tiene ningún efecto sobre la unión a la diana de los anticuerpos en los cuales se introduce (véase, por ejemplo, US 2015/0337049)

La generación del anticuerpo humanizado IgG1-huCD3-H1L1-H101G se describe en el Ejemplo 2 de WO2017/009442. El IgG1-huCD3-H1L1-H101G se denominará 'IgG1-huCD3-H101G'. El anticuerpo IgG1-huCD3-H101G-FEAL es una variante del mismo con las sustituciones de aminoácido L234F, L235E, D265A y F405L, como se describió en la presente precedentemente.

Ejemplo 9 – Determinación de la afinidad de unión a CD3 usando interferometría en biocapa

Se determinaron las afinidades de unión de anticuerpos anti-CD3 seleccionados, incluyendo a IgG1-huCD3 e IgG1-huCD3-H101G, como se describe en el Ejemplo 7 de WO2017/009442.

En resumen, se determinaron las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CD3 seleccionados en un formato de IgG1-huCD3-FEAL contra CD3ε soluble recombinante (CD3E27-GSKa) (proteína madura de SEQ ID No: 101) usando interferometría en biocapa en un ForteBio Octet HTX (ForteBio). Se cargaron los biosensores de captura anti-Fc humana (ForteBio, no. de cat. 18-5060) durante 600 s con hIgG (1 mg/mL). Después de una medida basal (200 s), se determinó la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de CD3E27-GSKa, usando un rango de concentraciones de CD3E27-GSKa entre 27,11 µg/mL y 0,04 µg/mL (entre 1000 nM y 1,4 nM) con pasos de diluciones al tercio (diluyente de muestras, ForteBio, no. de cat. 18-5028). Para los cálculos, se usó la masa molecular teórica de CD3E27-GSKa en base a la secuencia de aminoácidos, es decir 27,11 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo agitando a 1000 rpm y a 30°C. Se ensayó cada anticuerpo en por lo menos dos experimentos independientes. Se analizaron los datos con el programa de computación ForteBio Data Analysis Software v8.1, usando el modelo 1:1 y un

ajuste global completo con 1000 s de tiempo de asociación y 100 s de tiempo de disociación. Se corrigieron las trazas de los datos mediante la sustracción de una curva de referencia (anticuerpo sobre el biosensor, medida con diluyente de muestras solo), se alineó el eje Y a los últimos 10 s de la línea de base, y se aplicó una corrección entre pasos, así como también un filtrado de Savitzky-Golay. Las trazas de datos con una respuesta <0,05 nm se excluyeron del análisis.

En la Tabla 5 se muestra la constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms), la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) y la constante de disociación en equilibrio K_D (M) para CD3 ϵ recombinante determinadas por interferometría en biocapa. El IgG1-huCD3-FEAL mostró una afinidad de unión relativamente alta (K_D : 15 nM) a CD3 ϵ recombinante en comparación con el IgG1-huCD3-H101G-FEAL (K_D : 638 nM).

Tabla 5: Afinidades de unión de anticuerpos anti-CD3 monoespecíficos, bivalentes a CD3 ϵ recombinante determinadas por interferometría en biocapa libre de marcadores

Anticuerpo	Velocidad de asociación k_a (1/Ms)	Velocidad de disociación k_d (1/s)	K_D (nM)
IgG1-huCD3-FEAL	2.7E+05	4.0E-03	15
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	3.0E+04	2.0E-02	683

Ejemplo 10 - Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

Se generaron anticuerpos biespecíficos *in vitro* usando la tecnología de la plataforma DuoBody®, es decir un intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA como se describe en WO2011147986, WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab) y Labrijn y col. (Labrijn y col., PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer y col., MAbs 2013, 5: 962-973). Para permitir la producción de los anticuerpos biespecíficos mediante este método, se generaron moléculas IgG1 que portaban una mutación individual en el

dominio CH3: en un anticuerpo IgG1 parental, la mutación F405L (es decir los anticuerpos anti-CD3), en el otro anticuerpo IgG1 parental, la mutación K409R (es decir los anticuerpos anti-5T4 o control, específicos para gp120 de HIV-1). Además de estas mutaciones, los anticuerpos IgG1 parentales incluyeron sustituciones que
5 resultan en un dominio Fc que es incapaz de interactuar con los receptores Fc de IgG (receptores Fc gamma) y el complemento: L234F, L235E, D265A (FEA).

Para generar los anticuerpos biespecíficos, se mezclaron los dos anticuerpos parentales en iguales cantidades de masa en solución amortiguadora de PBS (Solución Salina Amortiguada con Fosfato; HPO_4^{2-} 8,7 mM, H_2PO_4^- 1,8 mM, Na^+
10 163,9 mM, Cl^- 140,3 mM, pH 7,4). Se agregó 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) a una concentración final de 75 mM y se incubó la mezcla de reacción a 31 °C durante 5 h. Se extrajo la 2-MEA por diálisis en solución amortiguadora de PBS usando cartuchos de corte de peso molecular de 10 kDa Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con el objetivo de permitir la
15 reoxidación de los puentes disulfuro intercatenarios y la formación de anticuerpos biespecíficos intactos.

En los ejemplos se usaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos anti-CD3

IgG1-huCD3-FEAL (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 57 y
20 SEQ ID No: 60).

IgG1-huCD3-H101G-FEAL (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 68 y SEQ ID No: 60)

Anticuerpos anti-5T4

IgG1-5T4-207-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 40
25 y SEQ ID No: 44)

IgG1-5T4-226-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 47 y SEQ ID No: 51)

IgG1-5T4-059-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 9)

- IgG1-5T4-076-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 16)
- IgG1-5T4-085-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 19 y SEQ ID No: 23)
- 5 IgG1-5T4-106-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 26 y SEQ ID No: 30)
- IgG1-5T4-127-FEAR (con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 33 y SEQ ID No: 37)
- IgG1-5T4-H8-FEAR (en base al anticuerpo anti-5T4H8 de Wyeth (WO 2007/106744 y US2010/0173382); con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 87 y SEQ ID No: 88)
- 10 IgG1-5T4-A1-F405L (en base al anticuerpo anti-5T4A1 de Wyeth (WO 2007/106744 y US8044178); con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 83 y SEQ ID No: 84)
- 15 IgG1-5T4-A1-FEAR (en base al anticuerpo anti-5T4A1 de Wyeth (WO 2007/106744 y US8044178); con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 83 y SEQ ID No: 84)
- IgG1-5T4-A3-F405L (en base al anticuerpo anti-5T4A3 de Wyeth (WO 2007/106744 y US8759495); con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 85 y SEQ ID No: 86)
- 20 IgG1-5T4-A3-FEAR (en base al anticuerpo anti-5T4A3 de Wyeth (WO 2007/106744 y US8759495); con las secuencias de VH y VL descritas en las SEQ ID No: 85 y SEQ ID No: 86)

Anticuerpos biespecíficos

- 25 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR
 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR
 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR
 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR
 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-076-FEAR

- bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR
- bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR
- bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR
- bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR
- 5 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR
- bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR
- 10 bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-H8-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR
- bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR
- bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR

- 15 *Anticuerpos biespecíficos marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)*
- bslgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC
- bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC
- bslgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC
- bslgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC
- 20 bslgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC

- Anticuerpos biespecíficos conjugados con Duostatin-3*
- BslgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3
- bslgG1-5T4-076-FEARxb12-vcDuo3
- bslgG1-5T4-085-FEARxb12-vcDuo3
- 25 bslgG1-5T4-127-FEARxb12-vcDuo3
- BslgG1-5T4-059-FEARxb12-vcDuo3
- bslgG1-5T4-106-FEARxb12-vcDuo3
- bslgG1-5T4-207-FEARxb12-vcDuo3
- bslgG1-5T4-226-FEARxb12-vcDuo3.

Anticuerpos control sin unión

El IgG-b12 es un anticuerpo específico para gp120 de HIV-1 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23) que se usa en algunos de los ejemplos como segundo brazo control negativo, sin unión, para los anticuerpos biespecíficos.

- 5 IgG1-b12-F405L es una variante con la sustitución F405L.

IgG1-b12-FEAL es una variante con sustituciones que resultan en un dominio Fc que es incapaz de interactuar con los receptores Fc de IgG (receptores Fc gamma) y el complemento, además de una mutación que permite la generación de los anticuerpos biespecíficos mediante un intercambio controlado de brazos Fab: L234F, 10 L235E, D265A y F405L.

IgG1-b12-K409R es una variante con la sustitución K409R.

IgG1-b12-FEAR es una variante con sustituciones que resultan en un dominio Fc que es incapaz de interactuar con los receptores Fc de IgG (receptores Fc gamma) y el complemento, además de una mutación que permite la generación de los 15 anticuerpos biespecíficos mediante un intercambio controlado de brazos Fab: L234F, L235E, D265A y K409R.

Ejemplo 11 - Unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 a 5T4 de mono cinomolgo y humano expresadas en células HEK-293

Se analizó la unión de los anticuerpos CD3x5T4 biespecíficos monovalentes y los 20 anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos, bivalentes a la membrana plasmática de las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con 5T4 de humano o con 5T4 de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) (generadas como se describió en el Ejemplo 1) mediante citometría de flujo.

Se incubaron las células (3×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo redondo (Greiner bio-one, no. de cat. 650180) con diluciones 25 seriadas de anticuerpos (en el rango entre 0,0137 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en pasos de diluciones al tercio) en 100 μL de PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de tinción) a 4°C durante 30 min. Los experimentos se llevaron a cabo con duplicados técnicos. Después de lavar dos veces con solución 30 amortiguadora de tinción, se incubaron las células con 50 μL de anticuerpo

secundario a 4°C durante 30 min. Como anticuerpo secundario, se usó F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con FITC (Southern Biotech, EE.UU., no. de cat. 2043-02) diluido 1:200 en solución amortiguadora de tinción, en todos los experimentos. Se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción, se resuspendieron en 30 µL de solución amortiguadora de tinción y se analizaron en un iQue Screener (Intellicyt Corporation, EE.UU.). Se analizaron las curvas de unión usando una regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

En la Figura 5(I) (paneles de la izquierda) se muestra que los anticuerpos biespecíficos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (C) y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR (D), que se unen en forma monovalente a 5T4, presentan una unión dependiente de la dosis a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de humano que fue comparable a la unión de los anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-H8-FEAR, respectivamente.

En la Figura 5(I) (paneles de la derecha) se muestra que los anticuerpos biespecíficos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (B), y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (C), que se unen en forma monovalente a 5T4, presentan una unión dependiente de la dosis a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de mono cinomolgo, que fue comparable a la unión de los anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR, respectivamente. Los anticuerpos BslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR e IgG1-5T4-H8-FEAR muestran una unión baja a 5T4 de mono cinomolgo, lo que está en línea con el Ejemplo 2 y los experimentos que se describen en WO2007/106744. Como control negativo, en estos experimentos se incluyó el IgG1-b12-K409R (3 µg/mL), que no presentaba unión a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de humano o de mono cinomolgo.

En un segundo experimento, se llevó a cabo la tinción como se describió precedentemente con ajustes menores. Las células se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos en el rango entre 0,000128 y 10 µg/mL, en pasos de diluciones al quinto. Como anticuerpo secundario, se usó F(ab')₂ de cabra anti-IgG de humano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Immunoresearch, R.U., no. de cat. 109-116-098) en dilución 1:200 en solución amortiguadora de tinción.

En la Figura 5(II) se muestra que los anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR (C), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-076-FEAR e IgG1-5T4-076-FEAR (E), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-085-FEAR (F), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR (G), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR (H), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR (I) presentan una unión dependiente de la dosis a las células HEK-293 transfectadas con 5T4 de humano (paneles de la izquierda) así como a las células HEK-293 con 5T4 de mono cinomolgo (paneles de la derecha). Nuevamente, las curvas de unión de los anticuerpos bivalentes monoespecíficos y los biespecíficos, monovalentes presentan una tendencia similar entre 5T4 de humano y de cinomolgo.

Ejemplo 12 - Unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 a células tumorales humanas positivas para 5T4

Se analizó la unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 a las líneas de células tumorales humanas que expresan 5T4 HeLa (adenocarcinoma de cérvix; ATCC, no. de cat. CCL-2) y la línea celular MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama; ATCC, no. de cat. HTB-26) mediante citometría de flujo. Ni las células HeLa ni las MDA-MB-231 expresan CD3.

Se incubaron las células (3×10^4 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner bio-one, no. de cat. 650180) con diluciones seriadas de anticuerpos (rango entre 0,000152 y 3 µg/mL en pasos de diluciones al tercio) en 100 µL de PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de

tinción) a 4°C durante 30 min. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción, se incubaron las células con 50 µL de anticuerpo secundario a 4°C durante 30 min. Como anticuerpo secundario, se usó F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotech, EE.UU., no. de cat. 2043-02) en dilución 1:400 en solución amortiguadora de tinción, para el primer experimento. Luego, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción, se resuspendieron en 120 µL de solución amortiguadora de tinción y se analizaron en un BD LSRFortessa FACS (BD Biosciences, EE.UU.). Se analizaron las curvas de unión usando una regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

En la Figura 6(I) (paneles de la izquierda) se muestra que los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A) y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (B) presentan una unión dependiente de la dosis a las células HeLa, con un máximo de unión mayor que los anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR. Para el bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (C) la unión máxima fue similar a la de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-5T4 IgG1-5T4-226-FEAR en las células HeLa.

En la Figura 6(I) (paneles de la derecha) se muestra que los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (B) y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (C) presentan una unión dependiente de la dosis a las células MDA-MB-231, con un máximo de unión mayor que los anticuerpos anti-5T4 monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR. El anticuerpo control negativo que se incluyó en estos experimentos, el IgG1-b12-K409R (3 µg/mL), no mostró unión a las células HeLa y MDA-MB-231.

En un segundo experimento, se llevó a cabo la tinción como se describió precedentemente con ajuste menores. Las células se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos, en el rango entre 0,000128 y 10 µg/mL, en pasos de dilución al quinto. Como anticuerpo secundario, se usó F(ab')₂ de cabra anti-IgG de

humano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch, R.U., no. de cat. 109-116-098) en una dilución 1:200 en solución amortiguadora de tinción.

En las Figuras 6(II) y 6(III) se muestra que los anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR e IgG1-5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR e IgG1-5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-085-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR presentan una unión dependiente de la dosis a las células tumorales HeLa y MDA-MB-231. En general, los anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-
FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR e IgG1-5T4-127-FEAR presentan unión a concentraciones de anticuerpo inferiores en comparación con los anticuerpos bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR, IgG1-5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR.

Ejemplo 13 - Inducción de activación de células T, liberación de citoquinas y citotoxicidad *in vitro* por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 usando células T purificadas como células efectoras

Se ensayaron los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando líneas de células tumorales positivas para 5T4 como células diana y células T purificadas como células efectoras. Las células T se obtuvieron de la capa de leucocitos de donantes humanos sanos (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) y se aislaron usando el coctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep (Stemcell Technologies, Francia, no. de cat. 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para determinar el porcentaje de células T viables después del aislamiento (ya sea como células T totales, células T CD4⁺ o bien como células T CD8⁺), se tiñó una muestra de las células T aisladas (2,5 x10⁵ células por condición) durante 30 min a 4°C en una placa de 96 pocillos de

fondo en U (Cellstar, no. de cat. 650180) usando los siguientes anticuerpos: Pacific Blue-anti-CD3 (eBiosciences, clon OKT3), APC-Cy-anti-CD4 (eBiosciences, clon OKT4), AF700-anti-CD8 (Biolegend, clon RPA-T8) y el marcador de viabilidad FVS 510 (BD Biosciences) en 100 μ L de PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de tinción). Luego, se lavaron las células dos veces en solución amortiguadora de tinción, se resuspendieron en 120 μ L de solución amortiguadora de tinción y se analizaron en un BD LSRFortessa FACS (BD Biosciences, EE.UU.). Los porcentajes de células T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de cada uno de los donantes usados en el experimento de citotoxicidad se describen en la Tabla 6.

10 Tabla 6: Proporción de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ por donante

Donante	% de CD3 ⁺ en las células viables	% de CD4 ⁺ en las células CD3 ⁺	% de CD8 ⁺ en las células CD3 ⁺
A	91,2	84,2	11,8
B	77,8	78,3	18
C	97,6	78,1	19,6
D	92,6	77,3	15,5
E	99,2	78,4	20,3

Se sembraron las células MDA-MB-231 (16.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner-bio-one, Países Bajos, no. de cat. 655180) y se las dejó adherirse durante 4 horas a 37°C. Se agregaron las células T a las células tumorales en una proporción de E:T = 8:1. Se agregaron diluciones seriadas de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 o los anticuerpos anti-5T4 mono-específicos bivalentes (concentración final en el rango entre 1000 y 0,0128 ng/mL; diluciones al quinto) y se incubaron las placas durante 72 horas a 37°C. Luego, se transfirieron 110 μ L de sobrenadante que contenía células T a placas de cultivo de 96 pocillos de fondo en U (CellStar, no. de cat. 650180). Se centrifugaron las placas (300 x g) durante 3 min a 4°C, después de lo cual se transfirieron 75 μ L del sobrenadante a una nueva placa para la medida de producción de citoquinas, y se mantuvieron las células T para evaluar los marcadores de activación de células T (descritos más adelante). Se analizó la producción de citoquinas inducida por 0,2 μ g/mL de anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 mediante un ensayo multiplex U-plex (MeSo

Scale Discovery, EE.UU., no. de cat. K15049K) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se tiñeron las células T para evaluar los marcadores de células T CD3 (1:200; eBioscience, clon OKT3, conjugado con eFluor450), CD4 (1:50; eBioscience, clon OKT4, conjugado con APC-eFluor780), CD8 (1:100; Biolegend, clon RPA-T8, conjugado con AF700) y los marcadores de activación de células T CD69 (1:50; BD Biosciences, clon AB2439, conjugado con APC), CD25 (1:50; eBioscience, clon BC96, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD1 (1:50; Biolegend, clon EH12.2H7, conjugado con BV605). Se usaron muestras teñidas individuales con esferas Ultracomp (5 µL; Invitrogen, no. de cat. 01-2222-42) para los ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 min de incubación a 4°C, se lavaron las placas tres veces con PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de tinción). Se resuspendieron las células en 120 µL de solución amortiguadora de tinción y se analizaron usando un FACS Fortessa (BD Biosciences). Los datos se procesaron usando FlowJo (BD Biosciences).

En paralelo, se evaluó la viabilidad de las células tumorales usando Resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Las células tumorales adherentes se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 10% de Resazurina (150 µL; Life Technologies, Países Bajos, no. de cat. DAL1100) en medio RPMI-1640 (Lonza, Suiza, no. de cat. BE12-115F) que contenía 10% de suero bovino de donante con hierro (Life Technologies, Países Bajos, no. de cat. 10371-029) y pen/estrep (Lonza, no. de cat. DE17-603E) durante 4 h a 37°C. Se midió la absorbancia con un lector de placas con marcadores múltiples Envision (PerkinElmer, US). Se configuró la absorbancia de las muestras de células tumorales tratadas con estaurosporina (Sigma-Aldrich, EE.UU., no. de cat. S6942) a 0% de viabilidad y se configuró la absorbancia de las muestras de células tumorales no tratadas a 100% de viabilidad. Se calculó el 'porcentaje de células viables' como se describe a continuación:

% de células viables = $\frac{[\text{absorbancia de la muestra} - \text{absorbancia de las células diana tratadas con estaurosporina}]}{[\text{absorbancia de las células diana no tratadas} - \text{absorbancia de las células diana tratadas con estaurosporina}]} \times 100$.

Se analizaron las curvas de respuesta a dosis, y se calcularon los valores de EC50 e IC50 usando una regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) con el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

- 5 En la Figura 7(I) se muestra que los anticuerpos bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR indujeron una citotoxicidad dependiente de la dosis (mostrado como una disminución del % de
- 10 células viables) en la línea celular tumoral positiva a 5T4 MDA-MB-231. Se observó una variación de donante a donante, pero las células T de ambos donantes indujeron un máximo de muerte en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo biespecífico anti-CD3x5T4. Los anticuerpos monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR no indujeron citotoxicidad. Los valores
- 15 de IC₅₀ calculados a partir de los gráficos se presentan en la Figura 7(II). Los valores de IC₅₀ de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR fueron menores en comparación con bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, respectivamente. Por el contrario, el valor de IC₅₀ de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR fue comparable al
- 20 de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR.

- En la Figura 8(I) se muestra que bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR indujeron citotoxicidad mediada por células T (mostrado como una disminución de la supervivencia de las células tumorales) en la línea celular MDA-MB-231. Los anticuerpos bivalentes
- 25 monoespecíficos IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-A1-FEAR e IgG1-5T4-A3-FEAR no indujeron
- 30

citotoxicidad mediada por células T. Los valores de IC₅₀ calculados a partir de los gráficos se presentan en la Figura 8(II). Los valores de IC₅₀ de la citotoxicidad inducida mediada por células T por parte de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR son inferiores que los valores de IC₅₀ de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR. Además, los valores de IC₅₀ de la citotoxicidad inducida mediada por células T por parte de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR son inferiores que los valores de IC₅₀ de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Se determinó la activación de las células T mediante citometría de flujo a través de tinción para los marcadores de activación PD1, CD25 y CD69 (Figura 9(I)). Los anticuerpos monoespecíficos bivalentes IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR no indujeron ningún aumento de dichos marcadores de activación de células T, mientras que los anticuerpos biespecíficos bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR indujeron un aumento dependiente de la dosis de PD1, CD25 y CD69. Los valores de EC₅₀ calculados a partir de los gráficos se representan en la Figura 9(II). Los valores de EC₅₀ para el aumento de PD1, CD25 y CD69 por parte de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR fueron menores en comparación con bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, respectivamente. Los valores de EC₅₀ para el aumento de CD25 y CD69 por parte de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR fueron menores en comparación con bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, mientras que el valor de EC₅₀ para el aumento de PD1 fue comparable para los anticuerpos bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR.

En la Figura 10(I) se muestra que los anticuerpos bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-
 FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FAER, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-
 226-FAER, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FAER, bsIgG1-huCD3-
 FEALx5T4-059-FAER, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FAER, bsIgG1-
 5 huCD3-FEALx5T4-106-FAER, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FAER,
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FAER, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FAER,
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FAER y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FAER
 indujeron la activación de células T (ejemplificado en la Figura 10(I) mediante el
 incremento del % de células T CD69⁺ dentro de las poblaciones de células T CD4⁺ y
 10 CD8⁺) cuando se incubaron con la línea celular MDA-MB-231, mientras que los
 anticuerpos bivalentes monoespecíficos IgG1-5T4-207-FAER, IgG1-5T4-226-FAER,
 IgG1-5T4-059-FAER, IgG1-5T4-106-FAER, IgG1-5T4-A1-FAER e IgG1-5T4-A3-
 FAER no indujeron la activación de células T. Los valores de EC50 de los tres
 marcadores de activación de células T se muestran en la Figura 10(II). En general,
 15 los valores de EC50 para la activación de células T (incremento del % de células
 CD69⁺, CD25⁺ y PD1⁺ dentro de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺)
 inducidas por bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FAER, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-
 FAER, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FAER y bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FAER
 son inferiores que los valores de EC50 de bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FAER y
 20 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FAER. Además, los valores de EC50 para la
 activación de células T (incremento del % de células T CD69⁺, CD25⁺ y PD1⁺ dentro
 de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺) inducidas por bsIgG1-huCD3-H101G-
 FEALx5T4-207-FAER, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FAER, bsIgG1-
 huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FAER y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-
 25 FAER son inferiores que los valores de EC50 de bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-
 A1-FAER y bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FAER.

Se midió la producción de las citoquinas IL-10, IL-13 y TNF después de la exposición
 de cocultivos de células T y células MDA-MB-231 a 0,2 µg/mL de anticuerpos
 biespecíficos anti-CD3x5T4 en sobrenadante de cultivo, mediante ensayo multiplex
 30 U-plex. En la Figura 11 se muestran los niveles de las citoquinas en el sobrenadante
 de los cocultivos de células T y células tumorales, después de la incubación con los
 anticuerpos biespecíficos. Los experimentos se llevaron a cabo usando células T de

dos donantes sanos diferentes; en la Figura 11A se muestran los resultados de los cocultivos con células T derivadas del donante A, en la Figura 11B se muestran los resultados de los cocultivos con células T derivadas del donante B. Los anticuerpos biespecíficos bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-
5 FEALx5T4-207-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bslgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR indujeron en todos los casos la liberación de citoquinas, aunque los niveles de citoquinas en los cocultivos de células T con
10 células tumorales incubados con anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 que contenían un brazo Fab específico contra CD3 derivado de IgG1-huCD3-H101G-FEAL fueron menores que los niveles de citoquinas en los cocultivos que se habían incubado con los anticuerpos biespecíficos que contenían un brazo Fab específico contra CD3 derivado de IgG1-huCD3-FEAL. Los anticuerpos monoespecíficos IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR e IgG1-5T4-059-FEAR no indujeron ninguna
15 liberación de citoquinas.

Ejemplo 14 - Inducción de citotoxicidad *in vitro* por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 usando PBMC o células T purificadas como células efectoras en proporciones variables de efector a diana

Para determinar la eficacia de la muerte mediada por células T de los anticuerpos
20 biespecíficos bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en forma más detallada, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad como se describe en el Ejemplo 13, con proporciones variables de células efectoras a diana (E:T). Además, se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o bien células T aisladas como células efectoras. Se usó la
25 línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3 (9.000 células/pocillo, ATCC, no. de cat. HTB-77) como línea celular diana. Se aislaron las PBMC a partir de 40 mL de capa de células blancas de sangre humana (Sanquin) usando un gradiente de Ficoll (Lonza; medio de separación de linfocitos, no. de cat. 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T se aislaron como se describe en el
30 Ejemplo 13. Para las PBMC, se usaron las siguientes proporciones de E:T: 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 y 12:1. Para las células T aisladas, se usaron las siguientes proporciones de E:T: 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1. En cada experimento, se usaron células

efectoras de dos donantes distintos. En la Tabla 7 se provee un resumen del porcentaje de células T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en los aislados de PMBC o células T para cada uno de los donantes (determinados como se describe en el Ejemplo 13).

5 Tabla 7: Proporción de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ por donante.

Donante	% de CD3 en la población de células viables	% CD4 ⁺ en las células CD3 ⁺	% CD8 ⁺ en las células CD3 ⁺
C (PBMC)	75	56,8	28,9
D (PBMC)	60	63,2	32
E (células T)	98,3	59,6	31,6
F (células T)	97,2	70	26,4

Como se muestra en la Figura 12, el uso de células efectoras de dos donantes diferentes, en proporciones de E:T entre 4:1 y 12:1, resultó en una eficaz muerte mediada por PBMC de las células SK-OV-3 en presencia de bslgG1-huCD3-
10 FEALx5T4-207-FEAR o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR. A proporciones de E:T de 2:1 e inferiores, no se consiguió la muerte máxima de las células SK-OV-3 a la concentración más alta de anticuerpo usada (1000 ng/mL). Se observó un resultado similar cuando se usaron células T aisladas como células efectoras (Figura 13). El uso de células efectoras de dos donantes diferentes, a una
15 proporción de E:T de entre 4:1 y 8:1 resultó en una muerte máxima mediada por células T de las células SK-OV-3 en presencia de bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR a la concentración más alta de anticuerpo usada (1000 ng/mL), mientras que las proporciones de E:T inferiores no fueron suficientes para inducir la muerte máxima. Por lo tanto, la eficacia de la
20 muerte mediada por células T inducida por bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR depende de una proporción de E:T suficientemente alta.

Ejemplo 15 - Actividad antitumoral de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en un modelo de xenoinjerto en ratón con sistema inmunológico humanizado

Se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR y bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en ratones NOD.*Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* (NSG-HIS) humanizados (obtenidos de The Jackson Laboratory) (células madre hematopoyéticas CD34+ inyectadas por la vena de la cola [HSC] a una edad entre 3 y 4 semanas) que se inocularon por vía subcutánea con células tumorales humanas MDA-MB-231. La humanización del sistema inmunológico de los ratones NSG-HIS se confirmó 16 semanas después del injerto mediante citometría de flujo. Posteriormente, se randomizaron los ratones NSG-HIS a tres grupos (8 ratones por grupo), en base al donante de HSC (#5239 o #2328) y al porcentaje de células T CD3+ humanas dentro de la población de células CD45+ humanas en sangre periférica (media de % de células hCD45+ y % de hCD3+ respectivamente; 42% de hCD45+ y 39% de hCD3+ para el grupo PBS, 34% de hCD45+ y 25 % de hCD3+ para el grupo bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, y 36% de hCD45+ y 29% de hCD3+ para el grupo bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR). Se inyectaron 5x10⁶ células MDA-MB-231 (en 100 µL de PBS) por vía subcutánea (SC) en el flanco de los ratones; esto se indicó como día 0 en el estudio. En el día 14, 18, 21 y 25, se inyectaron los ratones por vía intravenosa (IV) con 0,5 mg/kg de anticuerpo o bien con PBS. Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 8. Se evaluó el crecimiento de los tumores dos veces por semana (comenzando el día 14) usando un calibre. Los volúmenes de los tumores (mm³) se calcularon a partir de las medidas con calibre como 0,52 x (longitud) x (ancho)².

Los resultados se muestran en la Figura 14. En la Figura 14A se muestra que tanto bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (p<0,01) como bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (p<0,05) inhibieron en forma eficaz el crecimiento tumoral en base a un análisis estadístico de Mann-Whitney en el día 43, en comparación con el grupo control. Más aún, el análisis estadístico de las curvas de supervivencia libre de tumor (gráfica de Kaplan Meier, usando un tamaño de tumor < 500 mm³ como valor de corte) usando una prueba de Mantel Cox demostró que la diferencia de la supervivencia libre de tumor era estadísticamente significativa, mostrando un

incremento de la supervivencia libre de tumor en los animales tratados con bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR ($p < 0,001$) o bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR ($p < 0,001$) en comparación con los animales no tratados (Figura 14B).

Tabla 8. Grupos de tratamiento.

Anticuerpo	Dosis	Días de Tratamiento	Animales por Grupo
PBS	-	14, 18, 21, 25	8
bslgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR	0,5 mg/kg	14, 18, 21, 25	8
bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR	0,5 mg/kg	14, 18, 21, 25	8

- 5 Ejemplo 16. Determinación de la contribución de los residuos de aminoácidos de 5T4 a la unión al anticuerpo usando barrido de alaninas.

Diseño de la biblioteca

- Se sintetizó una biblioteca de alanina de residuos individuales de 5T4 de humano (Uniprot ID Q13641) (GeneArt, Thermo Fisher Scientific), en donde todos los
- 10 residuos de aminoácidos del dominio extracelular de la 5T4 de humano se mutaron en forma individual a alanina, excepto por las posiciones que ya contenían una alanina o una cisteína. Para minimizar la posibilidad de disrupción estructural del antígeno, las cisteínas no se mutaron. La biblioteca se clonó en el vector de expresión pMAC que contiene el casete de expresión CMV/TK-poliA, un gen de
- 15 resistencia a ampicilina y un origen de replicación de pBR322.

Producción de la biblioteca y tamizaje

- Se expresaron las 5T4 de tipo salvaje y los mutantes de alanina en forma individual en células HEK293 FreeStyle de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, no. de cat. 12347-019). Un día después de la transfección,
- 20 se cosecharon las células. Se incubaron aproximadamente 80.000 células con 20 μ L de anticuerpo conjugado con FITC (3 μ g/mL; en solución amortiguadora para FACS (PBS [Lonza, no. de cat. BE17-517] + 0,1% [p/v] de BSA [Roche, no. de cat.

10735086001] + 0,02% [p/v] de azida de sodio [NaN₃; EMELCA Bioscience, no. de cat. 41920044-3]); Tabla 9) a temperatura ambiente durante 40 min. Posteriormente, se lavaron las células dos veces por centrifugación usando entre 150 y 180 µL de solución amortiguadora para FACS. Se resuspendieron las células en 30 µL de solución amortiguadora para FACS y se almacenaron a 4°C hasta su análisis mediante citometría de flujo usando un iQue Screener (Intellicyt Corporation).

El experimento completo se llevó a cabo dos veces, dando medidas por duplicado.

Tabla 9: anticuerpos usados en la determinación de la contribución de los residuos de aminoácidos de 5T4 a la unión del anticuerpo usando barrido de alaninas. Los anticuerpos unidos en forma monocovalente a 5T4 se marcaron con FITC (Thermo Fisher Scientific, no. de cat. 46425), antes de llevar a cabo el experimento. El IgG1-5T4-A1-F405L y el IgG1-5T4-A3-F405L son anticuerpos A1 y A3 sustitutos, respectivamente, que se clonaron en el esqueleto de la IgG1 humana que contenía las mutaciones F405L. Por lo tanto, el anticuerpo sustituto A1 tiene una región variable idéntica a la del anticuerpo A1 que se divulga en WO2007106744. De forma similar, el anticuerpo sustituto A3 tiene una región variable idéntica a la del anticuerpo A3 que se divulga en WO2007106744. En ambos anticuerpos, el dominio Fc porta la sustitución F405L.

Anticuerpo	Anticuerpo de Prueba o Control
bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC	Anticuerpo de prueba
bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC	Anticuerpo de prueba
bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC	Anticuerpo de prueba
bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC	Anticuerpo de prueba
bsIgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC	Anticuerpo control usado para normalización

Análisis de los datos

Para cada muestra, la cantidad promedio de anticuerpo unido por célula se determinó como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (gMFI) para la población de células viables, individuales. La gMFI está influida por la afinidad del anticuerpo por el mutante de 5T4 y el nivel de expresión del mutante de 5T4 por célula. Debido a que las mutaciones de alanina específicas pueden impactar en el nivel de expresión en la superficie de la 5T4 mutante, y para corregir las diferencias de expresión para cada mutante de 5T4 en general, los datos de cada anticuerpo de prueba se normalizaron contra la intensidad de unión de un anticuerpo control específico por 5T4 sin bloqueo cruzado, utilizando la siguiente ecuación:

$$gMFI \text{ normalizada}_{\text{posición de aa}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{gMFI_{Ab \text{ de prueba}}}{gMFI_{Ab \text{ control}}} \right)$$

En donde “posición de aa” se refiere a la posición que fue mutada a una alanina; y el puntaje Z se calculó para expresar pérdida o ganancia unión de los anticuerpos, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Puntaje Z (veces de cambio)} = \frac{gMFI \text{ normalizada}_{\text{posición de aa}} - \mu}{\sigma}$$

En donde μ y σ son la media y la desviación estándar de la gMFI Normalizada calculada para todos los mutantes.

Si la gMFI del anticuerpo control para un mutante de 5T4 particular fue menor que la gMFI media del Ab Control – 2,5 x SD de la media de la gMFI del Ab Control (para todos los mutantes), se excluyeron los datos del análisis (se asumió que los niveles de expresión para aquellos mutantes de 5T4 no fueron suficientes para obtener conclusiones). Este fue el caso para el aminoácido W en la posición 296 (SEQ ID No: 1).

Resultados

En la Figura 15 se muestran los resultados de unión de los anticuerpos ensayados contra variantes de 5T4 de humano con mutaciones alanina individuales en el ECD:

posiciones 32 a 355 (de acuerdo con SEQ ID No: 1). Los resultados indican que el anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC mostró una pérdida de unión cuando los aa R en la posición 73, T en la posición 74, Y en la posición 92, R en la posición 94, N en la posición 95 o F en la posición 138 de 5T4 de humano se mutaron a una alanina. Esto sugiere que la unión del anticuerpo IgG1-5T4-059-04-FEAR depende por lo menos de los aa R73, T74, Y92, R94, N95, F138 de 5T4 de humano (SEQ ID No: 1), el anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC mostró pérdida de unión cuando los aa S en la posición 69, R en la posición 73, Y en la posición 92, R en la posición 94, F en la posición 111, F en la posición 138, D en la posición 148 de 5T4 de humano fueron mutados a una alanina. Esto sugiere que la unión del anticuerpo IgG1-5T4-207-FEAR depende por lo menos de los aa S69, R73, Y92, R94, F111, F138 y D148 de 5T4 de humano (SEQ ID No: 1), el anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC mostró pérdida de unión cuando los aa R en la posición 73, Y en la posición 92, R en la posición 94, F en la posición 111, F en la posición 138, L en la posición 144 o D en la posición 148 de 5T4 de humano fueron mutados a una alanina. Esto sugiere que la unión del anticuerpo IgG1-5T4-226-FEAR depende por lo menos de los aa R73, Y92, R94, F111, F138, L144 y D148 de 5T4 de humano (SEQ ID No: 1), el anticuerpo bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC mostró pérdida de unión cuando los aa D en la posición 60, Q en la posición 61, D en la posición 88, L en la posición 89, Y en la posición 92, F en la posición 111, P en la posición 115, L en la posición 117, F en la posición 138, D en la posición 148 o N en la posición 152 de 5T4 de humano fueron mutados a una alanina. Esto sugiere que la unión del anticuerpo IgG1-5T4-A3-FEAR depende por lo menos de los aa D60, Q61, D88, L89, Y92, F111, P115, L117, F138, D148 y N152 de 5T4 de humano (SEQ ID No: 1).

Algunos de los aminoácidos podrían estar involucrados indirectamente en la unión. Por ejemplo, la mutación de un residuo hidrofóbico a alanina podría impactar en el plegamiento local y afectar al posicionamiento de residuos que interactúan de manera directa (Zhao y col., 2014 Structure 22, 612-620). En base a datos estructurales (estructura cristalina de 5T4 de humano 4cnm; banco de datos de proteínas de RCSB) los siguientes residuos están ocultos y por lo tanto se espera que contribuyan de manera indirecta a la unión a:

- anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-04-FEAR-FITC: F138,
 - anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: F111, F138, D148,
 - anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: F111, F138, L144, D148,
 - anticuerpo bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC: L89, F111, L117, F138,
- 5 D148, N152.

Debido a que solo los residuos expuestos en la superficie pueden interactuar en forma directa con el anticuerpo, se espera que los siguientes residuos interactúen directamente con:

- anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC: R73, T74, Y92, R94 y
- 10 N95,
- anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: S69, R73, Y92 y R94,
 - anticuerpo bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: R73, Y92 y R94,
 - anticuerpo bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC: D60, Q61, D88, Y92 y
- P115.

- 15 En conjunto, estos resultados proponen que los anticuerpos IgG1-5T4-059, IgG1-5T4-207 e IgG1-5T4-226 se unen todos por interacción directa con los residuos de aminoácidos R73, Y92 y R94. Los resultados también indican que los anticuerpos IgG1-5T4-059, IgG1-5T4-207 e IgG1-5T4-226 se unen en cada caso a un epítopo que es diferente, pero parcialmente superpuesto, del epítopo al que se une IgG1-
- 20 5T4-A3. Esto está en línea con el comportamiento de desplazamiento que se describe en el Ejemplo 3 y 4.

Ejemplo 17: Inducción de activación de células T y citotoxicidad por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en líneas celulares de diferentes indicaciones *in vitro*

- 25 Se ensayaron los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x5T4 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando líneas de células tumorales de cáncer de páncreas y cervical como células diana, y células T purificadas como células efectoras. Para cada indicación (cáncer de páncreas y cáncer cervical) se seleccionaron dos líneas celulares representativas. Las líneas de células tumorales que se usaron en el
- 30 ensayo de citotoxicidad *in vitro* se resumen en la Tabla 10. Las células T se obtuvieron de capas de células blancas de donantes humanos (Sanquin,

Ámsterdam, Países Bajos) y se aislaron usando el coctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep (Stemcell Technologies, Francia, no. de cat. 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada línea celular, se ensayaron por lo menos tres donantes diferentes en el ensayo de citotoxicidad *in vitro* y en el análisis de la activación de células T, tal como se resume en la Tabla 10.

Tabla 10: Líneas de células tumorales usadas para ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Línea celular tumoral	Indicación	ATCC clon no.	Citotox. (n)	Activación de células T (n)
BxPC-3	Páncreas	CRL-1687	3	3
PANC-1	Páncreas	CRL-1469	9	4
Ca Ski	Cervical	CRL-1550	5	3
SiHa	Cervical	HTB-35	3	3

Las células tumorales (16.000 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Países Bajos, no. de cat. 655180) y se dejaron adherir a 37°C durante 4 h. Las células T se agregaron a las células tumorales en una relación de E:T = 4:1. Se agregaron diluciones seriales de bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR o anticuerpos control (bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR) (concentración final en el rango entre 5000 y 0,0128 ng/mL; diluciones al quinto) y se incubaron las placas a 37°C durante 72 h. Luego, se transfirieron 110 µL de los sobrenadantes que contenían células T a placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (CellStar, no. de cat. 650180) y se centrifugaron (300 x g) a 4°C durante 3 minutos. Las células T se tiñeron para marcadores de células T mediante incubación con CD3-eFluor450 (1:200; eBioscience, clon OKT3), CD4-APC-eFluor780 (1:50; eBioscience, clon OKT4), CD8-AF700 (1:100; Biolegend, clon RPA-T8) y para marcadores de activación de células T CD69-APC (1:50; BD Biosciences, clon AB2439), CD25-PE-Cy7 (1:50; eBioscience, clon BC96) y CD279/PD1-BV605 (1:50; Biolegend, clon EH12.2H7) diluidos en 50 µL de PBS/0,1% de BSA/0,02% de azida (solución amortiguadora de tinción). Se usaron muestras teñidas individuales con perlas

5 Ultracomp (5 µL; Invitrogen, no. de cat. 01-2222-42) para los ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, se lavaron las placas tres veces con solución amortiguadora de tinción. Las células se resuspendieron en 120 µL de solución amortiguadora de tinción y se analizaron usando un FACS Fortessa (BD Biosciences). Los datos se procesaron usando FlowJo (versión 10, BD Biosciences).

10 En paralelo, se evaluó la viabilidad de las células tumorales usando Resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Las células tumorales adherentes se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 10% de Resazurina (150 µL; Life Technologies, Países Bajos, no. de cat. DAL1100) en medio RPMI-1640 (Lonza, Suiza, no. de cat. BE12-115F) suplementado con suero bovino de donante 10% con hierro (Life Technologies, Países Bajos, no. de cat. 10371-029) y pen/estrep (Lonza, no. de cat. DE17-603E) a 37°C durante 4 h. Se midió la absorbancia con un lector de placas con marcadores múltiples Envision (PerkinElmer, US). La absorbancia de las células tratadas con estaurosporina (Sigma-Aldrich, EE.UU., no. de cat. S6942) se ajustó como 0% de viabilidad y la absorbancia de células sin tratar se ajustó a 100% de viabilidad. El “porcentaje de células viables” se calculó como a continuación:

20
$$\% \text{ de células viables} = \frac{[\text{absorbancia de la muestra} - \text{absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina}]}{[\text{absorbancia de células diana no tratadas} - \text{absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina}]} \times 100.$$

25 Se analizaron las curvas de citotoxicidad, curvas de activación de células T, valores de IC50 (citotoxicidad) y EC50 (activación de células T) utilizando una regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa de computación GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

30 En la Figura 16(I) se muestra que bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR indujo citotoxicidad en un rango de líneas celulares de diferentes indicaciones, mientras que los anticuerpos biespecíficos control (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR) dirigidos solo a las células tumorales o las células T no mostraron ninguna citotoxicidad. En la Figura 16(II) se

muestran los valores promedio de IC50 para cada una de las líneas celulares ensayadas con donantes diferentes (por lo menos n=3). En la Figura 17(I) se muestra la activación de células T inducida por bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR en un rango de líneas celulares de diferentes indicaciones medido por la sobreexpresión de CD69 en células T CD4⁺ y CD8⁺ (% de células CD69⁺ en la población de CD4⁺ o CD8⁺). Los anticuerpos biespecíficos control (bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR) dirigidos contra las células tumorales o las células T, no indujeron ninguna activación de células T. En la Figura 17(II) se muestran los valores promedio de EC50 para cada una de las líneas celulares ensayadas con donantes diferentes (por lo menos n=3).

Estos datos indican que el bslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR puede inducir de manera específica una citotoxicidad mediada por células T y la activación de células T en el cáncer de páncreas y cervical, mientras que los anticuerpos biespecíficos control bslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR y bslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR no inducen ninguna activación de células T ni citotoxicidad mediada por células T.

Referencias

1. Zhao y col., 2014 Structure 22, 612-620
2. Southall y col., 1990 Br J Cancer 61, 89-95
3. Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol Immunother 66, 415-426; Southall y col., 1990 Br J Cancer 61, 89-95
4. Damelin y col., 2011 Cancer Res 71, 4236-4246; Carsberg y col., 1996 Int J Cancer 68, 84-92
5. Carsberg y col., 1996 Int J Cancer 68, 84-92
6. Kagermeier-Schenk y col., 2011 Dev Cell 21, 1129-1143
7. Eisen, y col., 2014 Curr Oncol Rep 16, 370
8. Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol Immunother 66, 415-426; Scurr y col., 2017 JAMA Oncol 12, 10
9. Scurr y col., 2017 JAMA Oncol 12, 10)
10. WO2007106744

11. WO03038098
12. WO2011048369
13. WO2013041687
14. WO2017072207
- 5 15. Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, y col. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535)
16. WO 2007/059782; Genmab A/S
- 10 17. Ward y col., Nature 341, 544-546 (1989)
18. Holt y col; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90
19. Revets y col; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24
20. Bird y col., Science 242, 423-426 (1988)
21. Huston y col., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)
- 15 22. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
23. Lefranc MP. y col., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999
24. Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
25. Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. Anal Biochem. 2009; 386(2): 172-180)
- 20 26. WO92/22653
27. EP0629240
28. Kabat, E.A. y col., Sequences of proteins of immunological interest. 5ta Edición - Departamento de Servicios de Salud y Humanos de EE.UU., Publicación de NIH No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)
- 25 29. Rice y col., 2000, Trends Genet. 16: 276-277
30. WO2007106744
31. Shaw y col. (2002), Biochem. J. 363: 137-45, WO98/55607
- 30 32. WO06/031653

33. Wu y col., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)
34. WO 2011/131746; Genmab A/S
- 5 35. WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech
36. WO9850431; Genetech
37. WO2011117329; Roche
38. EP1870459; Amgen
39. WO2009089004; Amgen
- 10 40. US201000155133; Chugai
41. WO2010129304; Oncomed
42. WO2007110205; EMD Serono
43. WO 2010/015792; Regeneron
44. WO11143545; Pfizer/Rinat
- 15 45. WO2012058768; Zymeworks/Merck
46. WO2011028952; Xencor
47. WO 2009/080254; Roche
48. WO2008003116; F-Star
49. US 7,262,028; Crucell/Merus
- 20 50. US 7,612,181; Abbott
51. WO20100226923; Unilever, Sanofi Aventis
52. US007951918; Biogen Idec
53. CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
54. WO2012025525; Roche
- 25 55. WO2012025530; Roche
56. WO2008157379; Macrogenics
57. WO2010/080538; Macrogenics
58. WO 2008/119353
59. WO 2011/131746
- 30 60. WO2015001085
61. Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604)
62. Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)

63. US 6,077, 835
64. WO 00/70087
65. Schakowski y col., Mol Ther 3, 793-800 (2001)
66. WO 00/46147
- 5 67. Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
68. Wigler y col., Cell 14, 725 (1978)
69. Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)
70. US 5.589.466
71. US 5.973.972
- 10 72. Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
73. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
74. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- 15 75. US 4.699.880
76. Kozak, M., Gene 1999;234(2):187-208)
77. Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006)
78. Aslanidis, C. y P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74
- 20 79. Lefranc MP. y col., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999
80. Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
81. WO2007/106744
82. WO2015/001085
83. WO2017/009442
- 25 84. WO2011147986,
85. WO2011131746
86. WO2013060867
87. Labrijn y col., PNAS 2013, 110: 5145-50
88. Gramer y col., MAbs 2013, 5: 962- 973
- 30 89. Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23
90. WO2007/106744
91. US 2015/0337049