

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS CONTRA DLL3-CD3

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a proteínas de fijación multiespecífica que comprenden una primera unidad de fijación al antígeno específica para DLL3 y una segunda unidad de fijación al antígeno específica para CD3. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de fijación, a métodos para preparar tales proteínas de fijación; a células huésped que expresan o son capaces de expresar tales proteínas de fijación, a composiciones que comprenden tales proteínas de fijación y a los usos de tales proteínas de fijación o tales composiciones, en particular, con fines terapéuticos en el campo de las enfermedades cancerosas.

ANTECEDENTES

DLL3 es una proteína transmembrana tipo I que pertenece a la familia de los ligandos de Notch. DLL3 participa principalmente en la somitogénesis, en donde se ubica de manera predominante en el aparato de Golgi y actúa como inhibidor de señalización de Notch, en contraste con los otros miembros de la familia DLL, DLL1 y DLL4, que se ubican en la superficie celular. Solo en las células cancerosas, en donde se sobreexpresa DLL3, algunas moléculas de DLL3 escapan hacia la superficie celular (Dylla, *Molecular & Cellular Oncology* 2016, vol. 3, N.º 2). DLL3 se identificó como diana específica del tumor mediante el uso de diversos métodos, por ejemplo, análisis mediante LC/MS de tejidos tumorales (WO 2014/125273), secuenciación de ARN (WO 2017/021349) y análisis de inmunohistoquímica (Saunders *et al.*, *Sci Transl Med.*, 26 de agosto de 2015;7(302):302ra136; Saunders *et al.*, *AACR* 2017; WO 2013/126746).

La expresión de DLL3 se describió en tumores neuroendocrinos, tales como carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de vejiga de células pequeñas, cáncer de próstata neuroendocrino, cáncer de páncreas neuroendocrino y glioblastoma (Saunders *et al.*, *Sci Transl Med.*, 26 de agosto de 2015;7(302):302ra136; Saunders *et al.*, *AACR* 2017).

El SCLC representa una indicación de una necesidad médica extremadamente elevada. El SCLC representa el 13 % de los diagnósticos de cáncer de pulmón, y tiene un pronóstico peor que el NSCLC. Los tratamientos habituales para estos tipos de cáncer incluyen principalmente quimioterapia, radioterapia, cirugía o combinaciones de

estos; en la actualidad, aún no hay tratamientos dirigidos disponibles. Mientras que la tasa de respuesta inicial a la quimioterapia es alta, muchos pacientes recaen con rapidez en una enfermedad resistente a la quimioterapia para la que no hay opciones de tratamiento disponibles. Aunque durante los últimos años hubo mejoras en el tratamiento de estos tipos de cáncer, las tasas de supervivencia general para estos tipos de tumor no cambiaron, por lo tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de tratamientos más dirigidos y potentes.

Un enfoque para un tratamiento dirigido se proporciona mediante conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Sin embargo, para DLL3 no se prefiere esta estrategia, debido a la baja expresión en la superficie celular de DLL3 y la elevada tasa de resistencia a la quimioterapia. Dado que la mayoría de pacientes recaen después del tratamiento con quimioterapia, y debido a la baja expresión de DLL3 en la superficie celular, la acción sobre DLL3 con ADC puede tener limitaciones. Además, los enfoques de ADC en general presentan toxicidades no diana causadas por fármacos libres como resultado de la degradación o inestabilidad de ligador.

Hubo intentos de combinar la acción sobre DLL3 con la acción sobre otras proteínas. Por ejemplo, WO2017/021349 describe un constructo de anticuerpo biespecífico que combina la fijación a DLL3 humana en la superficie de una célula diana y la fijación a CD3 humana en la superficie de un linfocito T. Sin embargo, aún no se ha probado que dichos enfoques resulten exitosos, y hasta la fecha no existen tratamientos dirigidos para SCLC y glioblastoma así como otros tumores que expresan DLL3.

En vista del mal pronóstico para tales pacientes con cáncer, existe una necesidad de identificar tratamientos más eficaces, en particular, tratamientos eficaces con mejor tolerancia. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o métodos de tratamiento que proporcionan determinadas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o métodos usados en la actualidad y/o conocidos en el estado de la técnica. Estas ventajas incluyen eficacia *in vivo*, mejores propiedades terapéuticas y farmacológicas, mayor especificidad, perfil de seguridad mejorado, menos efectos secundarios, inmunogenicidad reducida, así como otras propiedades ventajosas, tales como mayor facilidad de preparación o menor costo de productos, mayor estabilidad/vida media más extensa, regímenes de administración menos frecuente, en especial, en comparación con los fármacos candidatos ya conocidos en el estado de la técnica.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se basa en un enfoque de acoplamiento de linfocitos T biespecífico que utiliza proteínas de fijación multiespecífica con un brazo de fijación a CD3 en linfocitos T y un brazo de fijación a DLL3 en la superficie celular de células tumorales. Al fijarse de manera simultánea a linfocitos T y a células tumorales, los acopladores de linfocitos T fuerzan la formación de una sinapsis citolítica entre las dos células y, de este modo, redirigen la actividad del linfocito T selectivamente hacia las células tumorales diana.

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fijación multiespecífica que comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, en donde dicha primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 se selecciona del grupo que consiste en i) a xviii):

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3);
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3);
- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3);
- iv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) y SEQ ID NO:21 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) y SEQ ID NO:24 (CDR3);

- v) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) y SEQ ID NO:27 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) y SEQ ID NO:30 (CDR3);
- vi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) y SEQ ID NO:33 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) y SEQ ID NO:36 (CDR3);
- vii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) y SEQ ID NO:135 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) y SEQ ID NO:138 (CDR3);
- viii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) y SEQ ID NO:141 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) y SEQ ID NO:144 (CDR3);
- ix) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) y SEQ ID NO:147 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) y SEQ ID NO:150 (CDR3);
- x) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) y SEQ ID NO:153 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) y

- SEQ ID NO:156 (CDR3);
- xi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) y SEQ ID NO:159 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) y SEQ ID NO:162 (CDR3);
 - xii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) y SEQ ID NO:165 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) y SEQ ID NO:168 (CDR3);
 - xiii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) y SEQ ID NO:171 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) y SEQ ID NO:174 (CDR3);
 - xiv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) y SEQ ID NO:177 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) y SEQ ID NO:180 (CDR3);
 - xv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) y SEQ ID NO:183 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) y SEQ ID NO:186 (CDR3);
 - xvi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) y SEQ ID NO:189 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) y SEQ ID NO:192 (CDR3);

- xvii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) y SEQ ID NO:195 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) y SEQ ID NO:198 (CDR3); y
- xviii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) y SEQ ID NO:201 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) y SEQ ID NO:204 (CDR3).

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 comprende un primer dominio variable de la cadena liviana y un primer dominio variable de la cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en i) a xviii):

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38;
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:40;
- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42;
- iv) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44;
- v) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable

- de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;
- vi) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48;
 - vii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206;
 - viii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208;
 - ix) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210;
 - x) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:212;
 - xi) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:214;
 - xii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:215 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:216;
 - xiii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:217 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:218;

- xiv) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:219 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:220;
- xv) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:221 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:222;
- xvi) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:223 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:224;
- xvii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:225 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:226; y
- xviii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:227 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:228.

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 se selecciona del grupo que consiste en i) a iii):

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3);
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3); y

- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) y SEQ ID NO:98 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:99 (CDR1), SEQ ID NO:100 (CDR2) y SEQ ID NO:101 (CDR3).

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana y un segundo dominio variable de la cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en:

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70; y
- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103.

En algunas formas de realización de la invención, la primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 comprende de su terminal N al C: un primer dominio variable de la cadena liviana, un primer dominio constante de la cadena liviana, un primer ligador peptídico, un primer dominio variable de la cadena pesada y un primer dominio CH1 constante de la cadena pesada; y la segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 comprende de su terminal N al C: un segundo dominio variable de la cadena liviana, un segundo dominio constante de la cadena liviana, un segundo ligador peptídico, un segundo dominio variable de la cadena pesada y un segundo dominio CH1 constante de la cadena pesada. En algunas formas de realización de la invención, el primer y/o segundo ligador peptídico comprenden 26 a 42 aminoácidos, preferentemente, cualquiera de 30 a 40 aminoácidos, 34 a 40 aminoácidos o 36 a 39 aminoácidos, más preferentemente, 38 aminoácidos. En algunas formas de realización de la invención, el primer ligador y/o

segundo ligador es un ligador Gly-Ser, que comprende, preferentemente, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89, más preferentemente, dicho primer y segundo ligador peptídico comprenden la misma secuencia.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención también comprende un primer y un segundo dominio Fc, en donde dicho primer dominio Fc se une de manera covalente a dicha primera unidad de fijación al antígeno, y dicho segundo dominio Fc se une de manera covalente a dicha segunda unidad de fijación al antígeno.

En algunas formas de realización de la invención,

- i) el primer dominio Fc comprende una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y], y el segundo dominio Fc comprende una treonina (T) en la posición 407 [Y407T], o
- ii) el primer dominio Fc comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], y el segundo dominio Fc comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V], o
- iii) el segundo dominio Fc comprende una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y], y el primer dominio Fc comprende una treonina (T) en la posición 407 [Y407T], o
- iv) el segundo dominio Fc comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], y el primer dominio Fc comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V],

preferentemente, el primer o el segundo dominio Fc también comprenden una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F]. En algunas formas de realización, el primer y/o segundo dominio Fc también comprenden una alanina en la posición 234 [L234A] y en la posición 235 [L235A]. En algunas formas de realización, el primer dominio constante de la cadena liviana y el segundo dominio constante de la cadena liviana comprenden un dominio de kappa o lambda humana.

En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO:

249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 y SEQ ID NO: 252 y una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 o SEQ ID NO:105.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada i) que codifica una primera unidad de fijación al antígeno y/o una segunda unidad de fijación al antígeno de una proteína de la invención, que opcionalmente también codifica un primer y/o un segundo dominio Fc, o ii) que codifica una primera y/o una segunda cadena de polipéptidos de una proteína de la invención. En otros aspectos en la presente se proporcionan vectores de expresión que comprenden la molécula de ácido nucleico de la invención, células huésped transfectadas con dichos vectores de expresión, y métodos para la fabricación de una proteína de la invención.

En otro aspecto de la invención, en la presente se proporciona una proteína de fijación multiespecífica que comprende una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 y una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, en donde la primera cadena de polipéptidos comprende una primera cadena liviana, un primer ligador y una primera cadena pesada, y la segunda cadena de polipéptidos comprende una segunda cadena liviana, un segundo ligador, y una segunda cadena pesada, preferentemente, el terminal C de dicha primera cadena liviana está unido de manera covalente al terminal N de dicha primera cadena pesada por medio de dicho primer ligador peptídico y el terminal C de dicha segunda cadena liviana está unido de manera covalente al terminal N de dicha segunda cadena pesada por medio de dicho segundo ligador peptídico.

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 comprende un dominio variable de la cadena liviana y un dominio variable de la cadena pesada que comprende secuencias de CDR y/o secuencias de VH/VL según se define para las unidades de fijación al antígeno de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 descritas en la presente. En algunas formas de realización, la segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3 comprende dominios variables de la cadena liviana y de la cadena pesada que comprenden secuencias de CDR y/o secuencias de VH/VL según se define para las unidades de fijación al antígeno de CD3#1, CD3#2 o CD3#3 descritas en la presente.

Otros aspectos, formas de realización, usos y métodos que incluyen las

proteínas de fijación de la invención se esclarecerán a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona proteínas de fijación novedosas que permiten un tratamiento más eficiente para tipos de cáncer que expresan DLL3, tales como SCLC, glioblastoma o un tumor neuroendocrino que expresa DLL3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Representación esquemática de una proteína de fijación biespecífica de la invención

Figura 2: Representación esquemática de la proteína de longitud completa DLL3 y constructos de dominio de DLL3 expresados en células HEK293 para mapeo de dominio de epítipo. Para los constructos de dominio de DLL3, los dominios transmembrana e intracelular se derivan de EpCAM.

Figura 3A: Mapeo de dominio de epítipo de DLL3 de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. Proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que reconocen los dominios EGF4, EGF1, DSL y péptido próximo a la membrana de DLL3. El eje y representa recuentos, el eje x representa PE-A (área de señal de ficoeritrina).

Figura 3B: Mapeo de dominio de epítipo de DLL3 de seis proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. Proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que reconocen EGF1, EGF3, EGF4 o EGF6 de DLL3. El eje y representa recuentos, el eje x representa PE-A (señal de ficoeritrina).

Figura 3C: Mapeo de dominio de epítipo de DLL3 de seis proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. Proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que reconocen los dominios DSL o ninguno del DSL, EGF, ni el péptido próximo a la membrana de DLL3. El eje y representa recuentos, el eje x representa PE-A (señal de ficoeritrina).

Figura 4: Fijación de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo a líneas celulares que expresan DLL3 humana y de *Macaca fascicularis*. El eje y representa recuentos, el eje x representa PE-A (área de señal de ficoeritrina).

Figura 5: Fijación de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo a líneas celulares que expresan DLL1 y DLL4 humana; no se detecta fijación a DLL1 y DLL4 humana. El eje y representa recuentos, el eje x representa PE-A (área de señal de ficoeritrina).

Figura 6A: Fijación de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo a líneas celulares de SCLC y linfocitos T humanos mediante análisis de citometría de flujo.

Figura 6 B: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas a un péptido que no es DSL ni EGF1-6 ni el péptido próximo a la membrana) a células

SHP77.

Figura 6 C: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) a células SHP77.

Figura 6 D: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF1) a células SHP77.

Figura 6 E: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF3) a células SHP77.

Figura 6 F: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF4) a células SHP77.

Figura 6 G: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) a células SHP77.

Figura 6 H: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio del péptido próximo a la membrana) a células SHP77.

Figura 6 I: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigida a un péptido que no es DSL ni EGF1-6 ni el péptido próximo a la membrana) a células NCI-H82.

Figura 6 J: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) a células NCI-H82.

Figura 6 K: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF1) a células NCI-H82.

Figura 6 L: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF3) a células NCI-H82.

Figura 6 M: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF4) a células NCI-H82.

Figura 6 N: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) a células NCI-H82.

Figura 6 O: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio del péptido próximo a la membrana) a células NCI-H82.

Figura 6 P: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigida a un péptido que no es DSL ni EGF1-6 ni el péptido próximo a la membrana) a linfocitos T.

Figura 6 Q: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) a linfocitos T.

Figura 6 R: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF1) a linfocitos T.

Figura 6 S: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra

el dominio EGF3) a linfocitos T.

Figura 6 T: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF4) a linfocitos T.

Figura 6 U: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF6) a linfocitos T.

Figura 6 V: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio del péptido próximo a la membrana) a linfocitos T.

Figura 7 A: Potencia en el lisado de células de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 que redirigen PBMC no estimuladas hacia líneas celulares de SCLC humanas.

Figura 7 B: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas a un péptido que no es DSL ni EGF1-6 ni el péptido próximo a la membrana) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 C: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) que redirigen los linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 D: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF1) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 E: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF3) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 F: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF4) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 G: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF6) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 H: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el péptido próximo a la membrana que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células SHP77 humanas.

Figura 7 I: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigida a un péptido que no es DSL ni EGF1-6 ni el péptido próximo a la membrana) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 J: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio DSL) que redirigen linfocitos T no estimulados

hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 K: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF1 que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 L: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF3) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 M: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF4) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 N: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el dominio EGF6) que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 7 O: Potencia en el lisado de células de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (dirigidas contra el péptido próximo a la membrana que redirigen linfocitos T no estimulados hacia células NCI-H82 humanas.

Figura 8: Ensayo de internalización *in vitro* con dos proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se preincubaron con células SHP77 que expresan DLL3 durante 2 y 4 horas antes de la coincubación durante 48 horas con PBMC humanas.

Figura 9: Farmacocinética de dos proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. Perfiles farmacocinéticos medios de DLL3#3/CD3#1 (cuadrados abiertos) y DLL3#3/CD3#2 (cuadrados cerrados) en ratones C57BL/6 macho después de una única dosis intravenosa de 1 mg/kg.

Figura 10: Acción antitumoral de dos proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo. El eje y representa la mediana de los volúmenes tumorales y el eje x representa el tiempo.

Figura 11: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige PBMC no estimuladas hacia células SHP77 y RKO-E6 humanas.

Figura 12: Potencia en la activación de linfocitos T en presencia de células SHP77 de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo

Figura 13: Potencia en la desgranulación de linfocitos T en presencia de células SHP77 de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo

Figura 14A: Potencia en la secreción de interferón gamma mediante PBMC en presencia de células SHP77 de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo

Figura 14B: Potencia en la secreción de MCP-1 mediante PBMC en presencia de células SHP77 de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo

Figura 15: Potencia en la proliferación de linfocitos T en presencia de células SHP77 de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo

Figura 16: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige linfocitos T pan no estimulados y linfocitos T indiferenciados hacia células SHP77 humanas

Figura 17: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige linfocitos T de memoria central $CD4^+$ y $CD4^+$ no estimulados hacia células SHP77 humanas

Figura 18: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige linfocitos T efectores de memoria $CD4^+$ y $CD4^+$ no estimulados hacia células SHP77 humanas

Figura 19: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige linfocitos T efectores de memoria $CD8^+$ y $CD8^+CD45RA^+$ no estimulados hacia células SHP77 humanas

Figura 20: Potencia en el lisado de células de una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo que redirige linfocitos T de memoria $CD8^+$ y $CD8^+$ no estimulados hacia SHP77 humano

Figura 21: Infiltración de linfocitos T en tejido tumoral de xenoinjerto SHP77 con una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo.

Figura 22: Fijación de tres anticuerpos anti-DLL3 de ejemplo a una proteína DLL3 recombinante en ensayo ELISA. El eje y representa recuentos, el eje x representa concentración de proteína DLL3.

Figura 23: Fijación de seis anticuerpos anti-DLL3 de ejemplo a líneas celulares de SCLC que expresan DLL3 según se determina mediante citometría de flujo. El eje y representa recuentos, el eje x representa concentración de anticuerpo anti-DLL3.

Figura 24: Tinción representativa de una muestra tisular de SCLC con cinco anticuerpos anti-DLL3 de ejemplo. Los anticuerpos anti-DLL3 DLL3#1 y DLL3#5 mostraron que las células tumorales presentan una tinción punteada y/o difusa de DLL3 en membrana y/o citoplasma. Las imágenes se generaron de manera electrónica mediante escáner automatizado LEICA SCN400 con una magnificación de 10x.

Figura 25: Tinción representativa de pelets celulares de líneas celulares de SCLC con diferentes niveles de expresión de DLL3. Anticuerpo anti-DLL3 DLL3#5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

TÉRMINOS Y DEFINICIONES USADOS

Estos y otros aspectos y formas de realización de la invención se esclarecerán a partir de la descripción adicional en la presente, en donde:

A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos que se usan tienen su significado habitual en la técnica, que serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, Nueva York, (1990) y Roitt *et al.*, "Immunology" (2.^a ed.), Gower Medical Publishing, London, Nueva York (1989), así como a los antecedentes generales citados en la presente. Asimismo, a menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen de manera específica en detalle se pueden realizar y se realizaron de una manera conocida *per se*, como será evidente para la persona del oficio de nivel medio. Se hace referencia nuevamente, por ejemplo, a los manuales estándar, a los antecedentes generales mencionados anteriormente y a otras referencias allí citadas.

Cuando se usa en la presente, la expresión "que comprende" y variaciones de esta, tales como "comprende" y "comprenden", se pueden sustituir con las expresiones "que contiene" o "que incluye" o "que tiene".

El término "secuencia", como se usa en la presente (por ejemplo, en expresiones como "secuencia de la cadena pesada/liviana", "secuencia de anticuerpos", "secuencia de dominio variable", "secuencia de dominio constante" o "secuencia de proteínas"), debería incluir, en general, tanto la secuencia de aminoácidos correspondiente como las secuencias de ácido nucleico o las secuencias de nucleótidos que codifican aquella, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Una "unidad de fijación al antígeno" como se usa en la presente hace referencia a un polipéptido capaz de fijarse a su diana o antígeno específicos y comprende los requisitos estructurales mínimos derivados de un anticuerpo (en general, presente en un anticuerpo) que permite la fijación a la diana. Por ende, una unidad de fijación al antígeno comprende al menos la presencia de tres secuencias de CDR de la cadena liviana y tres de la cadena pesada, preferentemente, al menos un dominio variable de la cadena liviana y un dominio variable de la cadena pesada.

La estructura generalizada de un anticuerpo o de la inmunoglobulina es conocida por las personas del oficio de nivel medio. Estas moléculas son

glucoproteínas heterotetraméricas, en general, de alrededor de 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, y con frecuencia, se denominan anticuerpos de longitud completa. Cada cadena liviana se liga de manera covalente a una cadena pesada mediante un puente disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotetramérica se forma mediante un enlace de disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Si bien las cadenas livianas y pesadas se ligan mediante un puente disulfuro, la cantidad de enlaces de disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el terminal N un dominio variable (VH), seguido de tres o cuatro (en el caso de IgE) dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4), así como una región bisagra entre CH1 y CH2. Cada cadena liviana tiene dos dominios, un dominio variable (VL) en el terminal N y un dominio constante (CL) en el terminal C. El dominio VL se asocia de manera no covalente con el dominio VH, mientras que el dominio CL, habitualmente, se liga de manera covalente al dominio CH1 mediante un puente disulfuro. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada (Chothia *et al.*, 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663). En la presente, los dominios variables también se denominan regiones variables o Fv e indican la parte que confiere especificidad a un anticuerpo para el antígeno al tener el sitio de fijación al antígeno.

El “dominio variable de la cadena liviana” (o “región variable de la cadena liviana”) y el “dominio variable de la cadena pesada” (o “región variable de la cadena pesada”) como se usa en la presente tienen la misma estructura general y cada dominio consiste esencialmente en cuatro regiones de marco (FR) cuyas secuencias están altamente conservadas, que en la técnica y más adelante en la presente se denominan “región de marco 1” o “FR1”; “región de marco 2” o “FR2”; “región de marco 3” o “FR3”; y “región de marco 4” o “FR4”, respectivamente; en donde las regiones de marco están interrumpidas por tres regiones hipervariables, HVR (o CDR), que en la técnica y más adelante en la presente se denominan “región determinante de la complementariedad 1” o “CDR1”; “región determinante de la complementariedad 2” o “CDR2”; y “región determinante de la complementariedad 3” o “CDR3”, respectivamente. Por ende, la estructura general o la secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina se puede indicar de la siguiente manera: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Las regiones de marco adoptan una conformación de

lámina beta, y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena están sostenidas en su estructura tridimensional por regiones de marco y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de fijación al antígeno.

Dentro del contexto de la presente invención, la referencia a CDR se basa en la definición de CCG, también denominada IMGT (Lefranc MP, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." *Dev Comp Immunol.* enero de 2003; 27(1):55-77; Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. "IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences". *Cold Spring Harb Protoc.* 2011;2011(6):695–715. Una definición alternativa de CDR conocida en la técnica se basa en Chothia (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901–917), junto con Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller y H. Perry, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda (1983)).

Como se usa dentro de la presente solicitud, la expresión "dominios constantes" o "región constante" indica la suma de los dominios de un anticuerpo que no sea la región variable. Tales dominios y regiones constantes son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación N.º 91).

La "parte Fc" o el "dominio Fc" de un anticuerpo no se involucra directamente en la fijación de un anticuerpo a un antígeno, pero exhibe varias funciones efectoras. Una "parte/dominio Fc de un anticuerpo" es una expresión conocida por la persona del oficio de nivel medio y se define en función de la escisión de papaína de los anticuerpos. Según la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. De acuerdo con las regiones constantes de la cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, IgA1 e IgA2. La parte Fc de un anticuerpo está involucrada directamente en ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) en función de la activación del complemento, la fijación a C1q y la fijación al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la fijación del factor del complemento C1q a la

parte Fc de la mayoría de las subclases del anticuerpo IgG. Mientras la influencia de un anticuerpo en el sistema de complemento depende de determinadas condiciones, la fijación a Clq se produce mediante sitios de fijación definidos en la parte Fc. Dichos sitios de fijación son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con numeración EU (Edelman *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, mayo de 1969;63(1):78-85)). Los residuos más importantes para mediar la fijación a C1q y receptor Fcγ en IgG1 son L234 y L235 (Hezareh *et al.*, J. Virology 75 (2001) 12161- 12168, Shields *et al.* (2001) JBC, 276 (9): 6591-6604). En general, los anticuerpos de subclase IgG1 e IgG3 muestran la activación del complemento y la fijación a Clq y C3, mientras que IgG2 e IgG4 no activan el sistema del complemento y no se fijan a Clq y C3.

Las expresiones “anticuerpo” o “molécula de anticuerpo” (usados como sinónimos en la presente) comprenden un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), un fragmento de un anticuerpo, en particular, un fragmento Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario, en particular, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab monocatenario (scFab), una proteína inmunofarmacéutica modular pequeña (SMIP), un anticuerpo de dominio, un nanocuerpo, un diacuerpo. El anticuerpo puede tener una función efectora, tal como ADCC o CDC, que en general está mediada por la parte Fc (región constante del anticuerpo) del anticuerpo, o puede no tener ninguna función efectora, por ejemplo, al no tener una parte Fc o al tener a una parte Fc oculta, bloqueada, básicamente una parte Fc que no es reconocida, o es insuficientemente reconocida, por células inmunitarias o componentes del sistema inmunitario, como el sistema del complemento.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son anticuerpos monoespecíficos que son idénticos en la secuencia de aminoácidos. Se pueden producir mediante tecnología de hibridoma de una línea celular híbrida (denominada hibridoma) que representa un clon de una fusión de un linfocito B productor de un anticuerpo específico con una célula del mieloma (cáncer de linfocitos B) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7). De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante expresión recombinante en las células huésped (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (mayo de 1997), “Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells”, J

Immunol Methods 204 (1): 77–87; ver también más adelante). Un “anticuerpo recombinante” o una “proteína de fijación recombinante” es un anticuerpo o una proteína de fijación que se produjo mediante una célula huésped modificada por ingeniería genética de manera recombinante. Está opcionalmente aislado o purificado.

Los anticuerpos de longitud completa se pueden tratar con enzimas, tales como papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión de papaína se usa para producir dos fragmentos de anticuerpos de fijación al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de fijación al antígeno y un fragmento "Fc" residual. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el dominio CH1 de la cadena pesada. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de fijación al antígeno e incluso es capaz de generar reticulación con el antígeno.

Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo en el terminal C del dominio CH1. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ son pares de fragmentos Fab' ligados mediante residuos de cisteína en la región bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento "Fv" contiene un sitio de reconocimiento y fijación al antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y la cadena liviana con una fuerte asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de fijación al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de fijación al antígeno.

Un fragmento de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” es una variante de Fv monocatenario que comprende los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde los dominios están presentes en una cadena única de polipéptidos. El Fv monocatenario es capaz de reconocer un antígeno y fijarse a este. Opcionalmente, el polipéptido scFv también puede contener un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios VH y VL, a fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la fijación al antígeno mediante el scFv (ver, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315).

Un fragmento de anticuerpo “Fab monocatenario” o “scFab” es una variante de Fab monocatenario que comprende los dominios VL, CL, VH y CH1 de un anticuerpo,

en donde los dominios están presentes en una cadena única de polipéptidos. El Fab monocatenario es capaz de reconocer un antígeno y fijarse a este. El polipéptido scFab puede opcionalmente también comprender un ligador polipeptídico ubicado entre los dominios CL y VH (Hust *et al.* (2007) BMC Biotechnology).

En general, para aplicación en seres humanos, resulta conveniente reducir la inmunogenicidad de las moléculas terapéuticas, tales como anticuerpos o proteínas de fijación que comprenden una unidad de fijación al antígeno como se describe en la presente, originalmente derivada de otras especies, por ejemplo, de ratón. Esto puede realizarse mediante la construcción de anticuerpos quiméricos/proteínas de fijación o mediante un proceso denominado “humanización”. En este contexto, un “anticuerpo quimérico” o “unidad de fijación al antígeno quimérico” debe interpretarse como un anticuerpo o una unidad de fijación al antígeno que comprende una parte de secuencia (por ejemplo, un dominio variable) derivado de una especie (por ejemplo, ratón) fusionada con una parte de secuencia (por ejemplo, dominios constantes) derivada de una especie diferente (por ejemplo, ser humano). En este contexto, un “anticuerpo humanizado”, una “proteína de fijación humanizada” o una “unidad de fijación al antígeno humanizada” es un anticuerpo, una proteína o una unidad de fijación al antígeno que comprende un dominio variable que, originalmente, derivaba de una especie no humana, en donde ciertos aminoácidos se mutaron para hacer que toda la secuencia de ese dominio variable se asemejara más a una secuencia de un dominio variable humano. Los métodos de humanización de anticuerpos son conocidos en la técnica (Billetta R, Lobuglio AF, “Chimeric antibodies”, *Int Rev Immunol.* 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988), “Reshaping human antibodies for therapy”. *Nature*: 332:323).

Un “anticuerpo optimizado” o una “proteína o unidad de fijación al antígeno optimizada” es un tipo específico de anticuerpo humanizado o proteína/unidad de fijación al antígeno humanizada que incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de esta, que es capaz de fijarse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana, a menudo denominada secuencia “importada”, generalmente se toma de un dominio de anticuerpo “importado”, en particular, un dominio variable. En general, un anticuerpo optimizado incluye al menos las CDR (o los HVL) de un anticuerpo no humano o derivado de un

anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de la cadena pesada o liviana humano. Se debe tener en cuenta que ciertos residuos de FR de ratón pueden ser importantes para la función de los anticuerpos optimizados y, por ello, algunos de los residuos de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de la secuencia de línea germinal humana se modifican para que sean iguales a los de la secuencia de ratón correspondiente. Durante este proceso los aminoácidos no deseados también se pueden retirar o modificar, por ejemplo, para evitar la desamidación, las cargas no deseadas o la lipofilidad o la fijación no específica. Un “anticuerpo optimizado”, un “fragmento de anticuerpo optimizado” u “optimizado” se puede denominar a veces “anticuerpo humanizado”, “fragmento de anticuerpo humanizado” o “humanizado”, o “de secuencia optimizada”.

Asimismo, se desarrollaron tecnologías para crear anticuerpos o dominios VH/VL en función de secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo, mediante la expresión de fagos o el uso de animales transgénicos (WWW. Ablexis.com/technology-alivamab.php; WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths y G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.", J.Mol.Biol., 222, 581-597; Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen y L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display", Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D., "Human antibodies from transgenic mice", Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice", Curr Opin Biotechnol, agosto de 1997;8(4):455-8). Tales anticuerpos o unidades de fijación al antígeno o dominios VH/VL son “anticuerpos humanos”, “unidades de fijación al antígeno humanas” o “dominios VH/VL humanos” en el contexto de la presente invención.

Como se usa en la presente, la expresión “anticuerpo humano”, “unidad de fijación al antígeno humana” o “dominio VH/VL humano” incluyen anticuerpos, unidades de fijación al antígeno o dominios VH/VL que tienen regiones variables (y constantes, si corresponde) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos, las unidades de fijación al antígeno, las proteínas o los dominios VH/VL de la presente tecnología pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, como se usa en la presente, la expresión “anticuerpo humano”, “unidad de

fijación al antígeno humana” o “dominio VH/VL humano” no incluyen anticuerpos en donde las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otras (especie de mamíferos), como ratón, rata o conejo, se injertaron en secuencias de marco humanas. Por ende, como se usa en la presente, la expresión “anticuerpo humano”, “unidad de fijación al antígeno humana” o “dominio VH/VL humano” refieren a un anticuerpo, una unidad de fijación al antígeno o un dominio VH/VL, en donde sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, CL, dominios CH (por ejemplo, CH1, CH2, CH3), bisagra, VL, VH) es sustancialmente no inmunógena en seres humanos, solo con variaciones o cambios de secuencia mínimos. Tales cambios o variaciones opcional y preferentemente mantienen o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies en relación con unidades de fijación al antígeno o anticuerpos no modificados.

Por ende, un anticuerpo humano, una unidad de fijación al antígeno humana o un dominio VH/VL humano es distinto de, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o quimérico. Cabe destacar que un anticuerpo humano, una unidad de fijación al antígeno humana o un dominio VH/VL humano pueden producirse mediante una célula eucariota o procariota de animal no humano capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana con reordenamiento funcional (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena liviana).

El término “monómero” se refiere a una forma homogénea de un anticuerpo o una proteína multiespecífica como se describe en la presente. Por ejemplo, para un anticuerpo de longitud completa, monómero significa un anticuerpo monomérico que tiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas. En el contexto de la presente invención, un monómero significa una proteína de la presente invención que tiene una sola unidad de fijación al antígeno específica para DLL3 y una sola unidad de fijación al antígeno específica para CD3 como se describe en la presente. Por ejemplo, un monómero de una proteína de fijación descrita en la presente puede tener dos cadenas, una primera cadena que comprende un Fab monocatenario con una primera unidad de fijación al antígeno y, opcionalmente, un primer dominio Fc y una segunda cadena que comprende un Fab monocatenario con una segunda unidad de fijación al antígeno y, opcionalmente, un segundo dominio Fc.

Un epítipo es una región de un antígeno que está unido mediante un anticuerpo o una porción de fijación al antígeno (por ejemplo, la unidad de fijación al antígeno de las proteínas descritas en la presente). El término “epítipo” incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de fijarse específicamente a un

anticuerpo o una porción de fijación al antígeno. En algunas formas de realización, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones de superficies químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de glicano, fosforilo o sulfonilo, y, en algunas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Los epítopos conformacionales o no conformacionales se distinguen en que la fijación a los primeros pero no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

Se considera que una molécula/proteína de fijación al antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, una unidad de fijación al antígeno, o un fragmento de tal molécula/proteína de fijación al antígeno) que puede “*fijarse*”, “*fijarse a*”, “*fijarse de manera específica*” o “*fijarse de manera específica a*”, que “*tiene afinidad a*”, “*es específica para*” y/o tiene “*especificidad para*” un determinado epítipo, antígeno o proteína (o para al menos una parte, un fragmento o un epítipo de aquellos) está “*contra*” o “*dirigida contra*” dicho epítipo, antígeno o proteína o es una molécula/proteína de “*fijación*” con respecto a dicho epítipo, antígeno o proteína.

Como se usa en la presente, las expresiones “fijación” y “fijación específica” refieren a la fijación del anticuerpo o la porción de fijación al antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, una unidad de fijación al antígeno o un fragmento de tal molécula/proteína de fijación al antígeno) a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente, en un ensayo de resonancia de plasmones ((Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics", Curr Opin Immunol., abril 1993;5(2):282-6.)) con antígeno de tipo silvestre purificado. La afinidad del anticuerpo también se puede medir usando tecnología de ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Darling, R.J. y Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions" ASSAY and Drug Development Technologies, diciembre de 2004, 2(6): 647-657).

En general, el término “*especificidad*” se refiere a la cantidad de diferentes tipos de antígenos o epítopos a los que se puede fijar una molécula/proteína de fijación al antígeno en particular (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, una unidad de fijación al antígeno o un fragmento de tal molécula/proteína de fijación al antígeno). La especificidad de una molécula/proteína de fijación al antígeno se puede determinar en función de su afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de fijación al antígeno (K_D), es una medida para la fuerza de fijación entre un epítipo y un sitio de fijación al

antígeno en la molécula/proteína de fijación al antígeno: cuanto menor sea el valor de la K_D , mayor será la fuerza de fijación entre un epítipo y la molécula/proteína de fijación al antígeno (de manera alternativa, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Como será evidente para la persona del oficio de nivel medio (por ejemplo, sobre la base de la descripción detallada en la presente), la afinidad se puede determinar de una manera conocida en sí misma, en función del antígeno de interés específico. La avidéz es la medida de la fuerza de fijación entre una molécula/proteína de fijación al antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, una unidad de fijación al antígeno, o un fragmento de tal molécula/proteína de fijación al antígeno) y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada a la afinidad entre un epítipo y su sitio de fijación al antígeno en la molécula/proteína de fijación al antígeno y la cantidad de sitios de fijación pertinentes presentes en la molécula/proteína de fijación al antígeno.

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a un material que se elimina de su entorno original o nativo (por ejemplo, el entorno natural si es natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado mediante intervención humana de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y aun así estar aislados debido a que tal vector o composición no es parte del entorno en el que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, se considera que una molécula de polipéptido/proteína o ácido nucleico está "(en forma) esencialmente aislada" —en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo del que se obtuvo— cuando se separó de al menos un componente distinto con el cual se asocia en general en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, una impureza o un componente secundario. En particular, se considera que una molécula de polipéptido/proteína o ácido nucleico está "esencialmente aislada" cuando se purificó al menos 2 veces, en particular, al menos 10 veces, más en particular, al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Preferentemente, una molécula de polipéptido/proteína o ácido nucleico que está "en forma esencialmente aislada" es esencialmente homogénea, como se determinó usando una técnica adecuada, tal como una técnica de cromatografía adecuada, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida.

Como se usan en la presente, la expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para lograr una máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Luego se comparan los nucleótidos o los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo nucleótido o residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad= cant. de posiciones idénticas/cant. total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas)x100). En algunas formas de realización, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen los espacios dentro de las secuencias, según corresponda (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de la región variable, no se consideran las secuencias de dominio constante y/o líder. Para las comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR que tiene la misma ubicación en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

El porcentaje de identidad o el porcentaje de similitud entre dos secuencias se pueden determinar mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:2264-2268, modificado en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:5873-5877. Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, calificación=50, longitud de

palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para una búsqueda reiterada que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático que se usa para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Este algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de *software* de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalidad por longitud de espacio de 12 y una penalidad por espacio de 4. En la técnica, se conocen algoritmos adicionales para el análisis de secuencia e incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA como se describe en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, las regiones similares en las dos secuencias que se comparan se encuentran al observar los pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan los aminoácidos alineados únicos. ktup se puede establecer en 2 o 1 para las secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para las secuencias de ADN. Si no se especifica ktup, el valor predeterminado es 2 para proteínas y 6 para ADN. De manera alternativa, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe en Higgins *et al.*, 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

La expresión “ligado de manera covalente”, como se usa en la presente, se refiere a un enlace covalente directo entre residuos o a una asociación indirecta en donde dos residuos que no están ligados de manera directa pero están ambos ligados de manera covalente a una molécula o dominio intermedios, por ejemplo, un dominio intermedio de una inmunoglobulina.

En la presente, las expresiones “competir” o “competir de manera cruzada” se usan de manera indistinta para referirse a la capacidad de una molécula de anticuerpo para interferir en la fijación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención, a una diana, por ejemplo, DLL3 humana. La interferencia en la fijación puede ser directa o indirecta (por ejemplo, a través de una

modulación alostérica de la molécula de anticuerpo o la diana). El alcance al cual una molécula de anticuerpo es capaz de interferir en la fijación de otra molécula de anticuerpo a la diana y, por lo tanto, si se puede decir que compite, puede determinarse mediante el uso de un ensayo de fijación de competencia, por ejemplo, un ensayo FACS, un ensayo ELISA o BIACORE. En algunas formas de realización, un ensayo de fijación de competencia es un ensayo de competencia cuantitativa. En algunas formas de realización, se dice que una primera molécula de anticuerpo anti-DLL3 compite por la fijación a la diana con una segunda molécula de anticuerpo anti-DLL3 cuando la fijación de la primera molécula de anticuerpo a la diana se reduce 10 % o más, por ejemplo, 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 55 % o más, 60 % o más, 65 % o más, 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más en un ensayo de fijación de competencia (por ejemplo, un ensayo de competencia descrito en la presente).

A menos que se indique lo contrario, se debe inferir sin necesidad de mencionarlo que, cuando la presente tecnología se refiere a un polipéptido, una proteína, un polinucleótido o un anticuerpo, se incluye un equivalente o un equivalente biológico de estos en el alcance de la presente tecnología.

Como se usa en la presente, la expresión “equivalente biológico de estos” representa un sinónimo de “equivalente de estos” cuando se refiere a la proteína, el anticuerpo, el polipéptido, el polinucleótido o el ácido nucleico de referencia, e incluye aquellos que tienen una mínima homología pero mantienen una estructura o funcionalidad deseadas. A menos que se indique expresamente en la presente, se considera que cualquier ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína o anticuerpo mencionado en la presente también incluye los equivalentes de estos. Por ejemplo, un equivalente tiene al menos alrededor de 80 % de homología o identidad y, alternativamente, al menos alrededor de 85 % o, alternativamente, al menos alrededor de 90 % o, alternativamente, al menos alrededor de 95 % o, alternativamente, 98 % de homología o identidad y presenta actividad biológica sustancialmente equivalente con respecto a la proteína, el polipéptido, el anticuerpo o el ácido nucleico de referencia.

Como se usa en la presente, la expresión “etiqueta detectable” se refiere a una molécula, un compuesto o una composición que puede producir una señal detectable, es decir, una señal física o química, que incluye una señal colorimétrica, fluorescente, eléctrica, radiactiva y quimioluminiscente, que se puede medir por medio de métodos visuales o instrumentales, y que indica la presencia y/o cantidad/concentración de la etiqueta en una muestra.

Una “señal detectable” puede generarse mediante diversos mecanismos, que incluyen absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (que incluyen fotones de radiofrecuencia, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta), e incluye, entre otras, señales colorimétricas, fluorescentes, eléctricas, radiactivas y quimioluminiscentes.

Como se usa en la presente, “expresión” se refiere al proceso mediante el que los polinucleótidos se transcriben al mRNA y/o al proceso mediante el que el mRNA transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el empalme del mRNA en una célula eucariota. El nivel de expresión del gen puede determinarse mediante la medición de la cantidad de mRNA o proteína en una célula o muestra tisular.

Como se usa en la presente la expresión “muestra biológica” significa un material de muestra derivado de o en contacto con células vivas. La expresión incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto. Como se usa en la presente, la expresión “muestra tisular” refiere a una muestra celular que preserva una relación espacial de sección transversal entre las células como se encontraban en el sujeto del que se obtiene la muestra. Las muestras biológicas también pueden obtenerse de biopsias de órganos internos o de tipos de cáncer.

“Histoquímica” y “citoquímica” son técnicas usadas para identificar una molécula en el contexto de células intactas, por medio del etiquetado de muestras con un agente que se fija de manera específica a la molécula de modo que pueda visualizarse en un microscopio. “Inmunohistoquímica” e “inmunocitoquímica” son tipos de histoquímica y citoquímica que usan anticuerpos para etiquetar las moléculas.

PROTEÍNAS DE FIJACIÓN MULTIESPECÍFICA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona proteínas de fijación multiespecífica que comprenden al menos una unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 (una primera unidad de fijación al antígeno), y al menos una unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 (una segunda unidad de fijación al antígeno). Dichas proteínas de fijación (multiespecífica) también se denominan en la presente moléculas de fijación (multiespecífica) o proteínas de fijación a DLL3/CD3 o moléculas de fijación a DLL3/CD3.

De manera sorprendente, los inventores descubrieron que las proteínas de fijación multiespecífica de la invención inducen la lisis selectiva de líneas celulares de SCLC que expresan DLL3 en presencia de linfocitos T y que se encuentran activas en

relaciones bajas de células efectoras con respecto a células diana. Cabe destacar que las proteínas de fijación de la invención no producen la activación de linfocitos T, la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocina en ausencia de células que expresan DLL3 o lisis de células que no expresan DLL3.

Para evitar dudas, DLL3, como se usa en la presente, se refiere a DLL3 humana de UniProt Q9NYJ7 y la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína. CD3 como se usa en la presente refiere a complejos de CD3 épsilon (UniProt P07766) y CD3 gamma (Uniprot: P09693) humana (complejos CD3εγ humanos).

Se espera que la acción sobre DLL3 con un enfoque de acoplamiento de linfocitos T biespecífico proporcione ventajas sobre un enfoque con ADC, puesto que la redirección de los linfocitos T no se ve influenciada por la resistencia a la quimioterapia y los bajos niveles de expresión en la superficie celular son menos cruciales en este modo de acción. Los acopladores de linfocitos T son proteínas de fijación multiespecífica con brazos de fijación a CD3 en linfocitos T y brazos de fijación a un antígeno en la superficie celular de las células tumorales. Al fijarse de manera simultánea a linfocitos T y a células tumorales, los acopladores de linfocitos T fuerzan la formación de una sinapsis citolítica entre las dos células y, de este modo, redirigen la actividad del linfocito T selectivamente hacia las células tumorales diana.

En un aspecto, la proteína de fijación multiespecífica de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, en donde dicha primera unidad de fijación se selecciona del grupo que consiste en i) a xviii):

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#1);
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#2);

- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#3);
- iv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) y SEQ ID NO:21 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) y SEQ ID NO:24 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#4);
- v) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) y SEQ ID NO:27 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) y SEQ ID NO:30 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#5);
- vi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) y SEQ ID NO:33 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) y SEQ ID NO:36 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#6);
- vii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) y SEQ ID NO:135 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) y SEQ ID NO:138 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#7);
- viii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) y SEQ ID NO:141 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) y

- SEQ ID NO:144 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#8);
- ix) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) y SEQ ID NO:147 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) y SEQ ID NO:150 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#9);
 - x) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) y SEQ ID NO:153 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) y SEQ ID NO:156 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#10);
 - xi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) y SEQ ID NO:159 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) y SEQ ID NO:162 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#11);
 - xii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) y SEQ ID NO:165 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) y SEQ ID NO:168 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#12);
 - xiii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) y SEQ ID NO:171 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) y SEQ ID NO:174 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#13);
 - xiv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) y SEQ ID NO:177 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de

- aminoácidos de SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) y SEQ ID NO:180 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#14);
- xv) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) y SEQ ID NO:183 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) y SEQ ID NO:186 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#15);
 - xvi) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) y SEQ ID NO:189 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) y SEQ ID NO:192 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#16);
 - xvii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) y SEQ ID NO:195 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) y SEQ ID NO:198 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#17); and
 - xviii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) y SEQ ID NO:201 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) y SEQ ID NO:204 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno DLL3#18).

Preferentemente, la primera unidad de fijación al antígeno de la proteína de fijación de la invención es cualquiera de i) a iii) como se definió mediante las secuencias de CDR anteriores.

Para evitar dudas, cada una de las formas de realización específicas que se mencionan en la presente también se pueden considerar como aspectos independientes de la invención.

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, dicha segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 se selecciona del grupo que consiste en i) a iii):

- i) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno CD3#1);
- ii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno CD3#2); y
- iii) una unidad de fijación al antígeno que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) y SEQ ID NO:98 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:99 (CDR1), SEQ ID NO:100 (CDR2) y SEQ ID NO:101 (CDR3) (unidad de fijación al antígeno CD3#3).

Las primeras unidades de fijación al antígeno i) a xviii) indicadas anteriormente se denominan DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 y DLL3#18 respectivamente, y las segundas unidades de fijación al antígeno i) a iii) indicadas anteriormente se denominan CD3#1, CD3#2 y CD3#3, respectivamente. En la presente, se proporciona una tabla de secuencias que permite identificar fácilmente secuencias de aminoácidos individuales con unidades de fijación al antígeno específicas y proteínas de fijación de longitud completa de la presente invención. Se proporciona un resumen en la Tabla 1 en el Ejemplo 2.

Los términos “primera” y “segunda” con respecto a unidades de fijación al antígeno en general, como se usa en la presente, indican únicamente que estas unidades son dos unidades distintas (puesto que se fijan a diferentes antígenos diana). Por ende, estos términos no se deben interpretar como que se refieren al orden exacto o la secuencia exacta de las unidades en la proteína de fijación de la invención.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8,

DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 y DLL3#18 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#1 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente. En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, y DLL3#3 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#1 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 y DLL3#18 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#2 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente. En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, y DLL3#3 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#2 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 y DLL3#18 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#3 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente. En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1, DLL3#2, y DLL3#3 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente y una segunda unidad de fijación al antígeno de CD3#3 como se definió mediante las secuencias de CDR respectivas descritas anteriormente.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a

DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y

CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3) y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3, que comprende CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

Además de las secuencias de CDR establecidas en la presente, las unidades de fijación al antígeno de las proteínas de fijación de la invención incluyen secuencias de regiones de marco (FR) de inmunoglobulina. Preferentemente, estas secuencias no son inmunógenas en seres humanos y, por lo tanto, son preferentemente secuencias de FR humanas o humanizadas. Las secuencias de FR humanas o humanizadas adecuadas son conocidas en la técnica. Las secuencias de FR de especial preferencia

se pueden tomar de las formas de realización que se muestran en la presente, que divulgan las unidades de fijación al antígeno completas y, por lo tanto, las secuencias de CDR y las secuencias de FR.

En formas de realización preferidas de las proteínas de fijación de la invención, la primera y segunda unidad de fijación comprenden cada una un dominio variable de la cadena liviana y un dominio variable de la cadena pesada derivados de una molécula de anticuerpo, en donde dichos dominios variables de la cadena liviana/pesada se definen mediante las secuencias de CDR de cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 para la primera unidad de fijación al antígeno y dichos dominios variables de la cadena liviana/pesada se definen mediante las secuencias de CDR de cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3 para la segunda unidad de fijación al antígeno. En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, el dominio VH y/o VL de las unidades de fijación al antígeno de uno o más de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, DLL3#18, CD3#1, CD3#2 o CD3#3 es un dominio VH y/o VL humano o humanizado.

En formas de realización preferidas de la invención, los dominios variables de la cadena liviana/pesada de la primera unidad de fijación al antígeno se definen también de la siguiente manera:

- i) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:38 (unidad de fijación al antígeno DLL3#1); o
- ii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:40 (unidad de fijación al antígeno DLL3#2); o
- iii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42 (unidad de fijación al antígeno DLL3#3); o
- iv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un dominio variable de la cadena

- pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:44 (unidad de fijación al antígeno DLL3#4); o
- v) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:46 (unidad de fijación al antígeno DLL3#5); o
 - vi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:48 (unidad de fijación al antígeno DLL3#6); o
 - vii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206 (unidad de fijación al antígeno DLL3#7); o
 - viii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208 (unidad de fijación al antígeno DLL3#8); o
 - ix) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210 (unidad de fijación al antígeno DLL3#9); o
 - x) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:212 (unidad de fijación al antígeno DLL3#10); o
 - xi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:214 (unidad de fijación al antígeno DLL3#11); o
 - xii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:215 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:216 (unidad de fijación al antígeno DLL3#12); o
 - xiii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia

- de aminoácidos de SEQ ID NO:217 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:218 (unidad de fijación al antígeno DLL3#13); o
- xiv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:219 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:220 (unidad de fijación al antígeno DLL3#14); o
 - xv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:221 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:222 (unidad de fijación al antígeno DLL3#15); o
 - xvi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:223 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:224 (unidad de fijación al antígeno DLL3#16); o
 - xvii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:225 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:226 (unidad de fijación al antígeno DLL3#17); o
 - xviii) que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:227 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:228 (unidad de fijación al antígeno DLL3#18).

Preferentemente, la primera unidad de fijación al antígeno de la proteína de fijación de la invención es cualquiera de i) a iii) como se definió mediante las secuencias de VL y VH más arriba.

En formas de realización preferidas de la invención, los dominios variables de la cadena liviana/pesada de la segunda unidad de fijación al antígeno se definen también de la siguiente manera:

- i) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 (unidad de fijación al antígeno CD3#1); o
- ii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70 (unidad de fijación al antígeno CD3#2); o

- iii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 (unidad de fijación al antígeno CD3#3).

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende una combinación de una primera y una segunda unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3, DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, en donde la primera y segunda unidad de fijación al antígeno se definen mediante las secuencias de VH y VL y/o CDR de las unidades de fijación al antígeno como se describió anteriormente. En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una combinación de una primera y una segunda unidad de fijación al antígeno seleccionada del grupo que consiste en DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, y DLL3#3/CD3#3, en donde la primera y segunda unidad de fijación al antígeno se definen mediante las secuencias de VH y VL y/o CDR de las unidades de fijación al antígeno como se describió anteriormente.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena

pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:38 y (ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:40 y (ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y (ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:38 y (ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las

secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:40 y (ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende i) una primera unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 como se definió anteriormente mediante las secuencias de VH/VL o CDR respectivas) que comprende un primer dominio variable de la cadena liviana unido de manera covalente, ya sea directa o indirectamente, a un primer dominio variable de la cadena pesada con un primer ligador peptídico y/o ii) una segunda unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 (por ejemplo, cualquiera de CD3#1, CD3#2, o CD3#3 como se definió anteriormente mediante las secuencias de VH/VL o CDR respectivas) que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana unido de manera covalente, ya sea directa o indirectamente, a un segundo dominio variable de la cadena pesada con un segundo ligador peptídico.

En algunas formas de realización de las proteínas de fijación de la invención, la primera y/o la segunda unidad de fijación al antígeno además comprenden una CL y un dominio CH1 como en un dominio Fab liviano/pesado de una molécula de anticuerpo convencional, por lo que dicha primera unidad de fijación comprende a) un dominio VL (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VL o CDR de la cadena liviana (LCCDR) de cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5,

DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18) ligado de manera covalente (unido directa o indirectamente) a un primer dominio de la CL y b) un dominio VH (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VH o CDR de la cadena pesada (HCCDR) de cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18) ligado de manera covalente (unido directa o indirectamente) a un primer dominio CH1 y/o dicha segunda unidad de fijación al antígeno comprende a) un dominio VL (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VL o LCCDR de cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3) ligado de manera covalente (unido directa o indirectamente) a un segundo dominio CL y b) un dominio VH (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VH o HCCDR de cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3) ligado de manera covalente (unido directa o indirectamente) a un segundo dominio CH1.

En el contexto de la presente invención, un dominio CL es el dominio constante de una cadena liviana del anticuerpo, por ejemplo, una cadena liviana kappa (κ) o lambda (λ). Un ejemplo de una región constante de una cadena liviana kappa se muestra en SEQ ID NO:87. Un ejemplo de una región constante de una cadena liviana lambda se muestra en SEQ ID NO:88. En algunas formas de realización, el primero y segundo dominio CL son iguales, por ejemplo, el primer y el segundo dominio CL son ambos un dominio constante de la cadena liviana kappa o el primer y el segundo dominio CL son ambos un dominio constante de la cadena liviana lambda. En algunas formas de realización, el primer y segundo dominio CL son diferentes, por ejemplo, el primer dominio CL es un dominio constante kappa y el segundo dominio CL es un dominio constante lambda o viceversa.

En el contexto de la presente invención, un dominio CH1 es el primer dominio constante de una cadena pesada del anticuerpo. Un ejemplo de un dominio CH1 constante se muestra en SEQ ID NO:253.

En formas de realización preferidas de las proteínas de fijación de la invención, la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 definidas mediante las secuencias de VH/VL o CDR descritas más arriba) de las proteínas de fijación de la invención comprende del terminal N al C: un primer dominio variable de la cadena liviana, un primer dominio CL, un primer péptido ligador, un primer dominio VH

y un primer dominio CH1, y/o la segunda unidad de fijación (por ejemplo, cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3 definidas mediante las secuencias de VH/VL y/o CDR descritas más arriba) de las proteínas de fijación de la invención comprende del terminal N al C: un segundo dominio variable de la cadena liviana, un segundo dominio CL, un segundo péptido ligador, un segundo dominio VH y un segundo dominio CH1. En esta forma de realización, la primera y/o la segunda unidad de fijación tienen la estructura de un Fab monocatenario. Para ambas, la primera y/o la segunda unidad de fijación al antígeno, al formar un Fab monocatenario, el orden se puede revertir de manera tal que el terminal N al C la unidad de fijación al antígeno comprende: VH-CH1-[péptido ligador]-VL-CL. En algunas formas de realización de la proteína de la invención, cuando la primera y/o segunda unidad de fijación al antígeno comprenden un Fab o un Fab monocatenario, los dominios constantes pueden ser del mismo tipo (por ejemplo, ambos dominios CL son dominios constantes de la cadena liviana kappa o lambda) o de diferentes tipos (el primer dominio CL es un dominio constante de la cadena liviana kappa y el segundo dominio de CL es lambda o viceversa).

En un aspecto, un ligador usado en una proteína de fijación de la presente invención comprende 26 a 42 aminoácidos, por ejemplo, 30 a 40 aminoácidos. En otro aspecto, un ligador usado en una proteína de la presente invención comprende 34 a 40 aminoácidos, por ejemplo, 36 a 39 aminoácidos, por ejemplo, 38 aminoácidos. En algunas formas de realización, el ligador comprende una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95, preferentemente, SEQ ID NO: 89.

La secuencia del ligador puede ser una secuencia natural o una secuencia no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el ligador es, preferentemente, no inmunógeno en el sujeto al que se administra la proteína de fijación de la invención.

Un grupo útil de secuencias de ligadores son ligadores derivados de la región bisagra de anticuerpos de cadena pesada, como se describe en WO1996/34103 y WO1994/04678. Otros ejemplos son secuencias de ligadores de poli-alanina, tales como Ala-Ala-Ala.

Otros ejemplos preferidos de secuencias ligadoras son ligadores Gly/Ser de diferente longitud, tales como ligadores (glyxser)_z, que incluyen, por ejemplo, (gly4ser)₃, (gly4ser)₅, (gly4ser)₇, (gly3ser)₃, (gly3ser)₅, (gly3ser)₇, (gly3ser2)₃, (gly3ser2)₅ y (gly3ser2)₇ o un ligador de cualquiera de SEQ ID NO: 89 a 95.

En algunas formas de realización de las proteínas de fijación de la invención, el dominio VL de la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VL o CDR de la cadena liviana (LCCDR) de DLL3#1,

DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18) está ligado de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) mediante un primer ligador Gly/Ser (por ejemplo, el ligador Gly/Ser de cualquiera de 26 a 42 aminoácidos, 30 a 40 aminoácidos, 34 a 40 aminoácidos, o 36 a 39 aminoácidos, preferentemente, 38 aminoácidos) al dominio VH de la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VH o CDR de la cadena pesada (HCCDR) de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18); y el dominio VL de la segunda unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VL o CDR de la cadena liviana (LCCDR) de CD3#1, CD3#2 o CD3#3) está ligado de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) mediante un segundo ligador Gly/Ser (por ejemplo, el ligador Gly/Ser de cualquiera de 26 a 42 aminoácidos, 30 a 40 aminoácidos, 34 a 40 aminoácidos, o 36 a 39 aminoácidos, preferentemente, 38 aminoácidos) al dominio VH de la segunda unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, definido mediante las secuencias de VH o CDR de la cadena pesada (HCCDR) de CD3#1, CD3#2 o CD3#3). Con mayor preferencia, el primer y el segundo ligador son iguales. Aun con mayor preferencia, el primer y el segundo ligador comprenden cada uno la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno específica para DLL3 y que comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, y SEQ ID NO:240 y un segundo Fab monocatenario de SEQ ID NO:71 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno específica para CD3. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:49 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:71 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la

secuencia de SEQ ID NO:50 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:71 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:51 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:71 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno específica para DLL3 y que comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, y SEQ ID NO:240 y un segundo Fab monocatenario de SEQ ID NO:72 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno específica para CD3. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:49 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:72 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:50 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:72 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:51 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:72 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno.

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno específica para DLL3 y que comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID

NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, y SEQ ID NO:240 y un segundo Fab monocatenario de SEQ ID NO:104 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno específica para CD3. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:49 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:104 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:50 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:104 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno. En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende un primer Fab monocatenario que forma una primera unidad de fijación al antígeno que comprende la secuencia de SEQ ID NO:51 y un segundo Fab monocatenario que comprende la secuencia de SEQ ID NO:104 que forma una segunda unidad de fijación al antígeno.

En algunas formas de realización, la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 como se definió mediante las secuencias de VH/VL y/o CDR descritas anteriormente) y/o la segunda unidad de fijación al antígeno (por ejemplo CD3#1, CD3#2 o CD3#3) comprende un dominio VL unido de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) a un dominio CL y un dominio VH unido a un dominio CH1 (es decir, juntos forman un fragmento Fab derivado de un anticuerpo), y dicho dominio CH1 se une de manera covalente (por ejemplo, se une directamente) a un dominio Fc, y así forma un brazo de una molécula de anticuerpo en forma de Y convencional con una cadena liviana y una cadena pesada. En algunas formas de realización, la primera y la segunda unidad de fijación al antígeno forman cada una un fragmento Fab, es decir, un primer y un segundo fragmento Fab, que está ligado de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) a un primer y un segundo dominio Fc, respectivamente, y así forman una molécula de anticuerpo bivalente y biespecífica heterotetramérica convencional.

En formas de realización preferidas, la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14,

DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 como se definió mediante las secuencias de VH/VL o CDR descritas anteriormente) y/o la segunda unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3) comprende un Fab monocatenario, es decir, una cadena liviana de anticuerpo (VL-CL) unida de manera covalente al dominio VH-CH1 de una cadena pesada mediante un ligador peptídico (por ejemplo, un ligador Gly/Ser de cualquiera de 26 a 42 aminoácidos, 30 a 40 aminoácidos, 34 a 40 aminoácidos, o 36 a 39 aminoácidos, preferentemente, 38 aminoácidos, aun con mayor preferencia, un ligador de SEQ ID NO:89). En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera cadena de polipéptidos que comprende un primer Fab monocatenario que se fija específicamente a DLL3 (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 como se definió anteriormente mediante las secuencias de VH/VL o CDR respectivas, preferentemente, la primera unidad de fijación al antígeno es DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3) y un primer dominio Fc (esta cadena de polipéptidos también denominada en la presente “cadena DLL3”) y una segunda cadena de polipéptidos que comprende un segundo Fab monocatenario que se fija específicamente a CD3 (por ejemplo, cualquiera de CD3#1 CD3#2 o CD3#3 como se definió anteriormente mediante las secuencias de VH/VL o CDR respectivas) y un segundo dominio Fc (esta cadena de polipéptidos también se denomina en la presente “cadena CD3”). En algunas formas de realización, el primer y el segundo dominio Fc son iguales. En formas de realización preferidas, el primer y el segundo dominio Fc son diferentes. Las proteínas de fijación resultantes de la invención tienen un Fc completo y tienen dos sitios de fijación independientes, una primera unidad de fijación para DLL3 y una segunda unidad de fijación para CD3. En algunas formas de realización, la primera unidad de fijación al antígeno consiste en una cadena única de polipéptidos (una cadena DLL3). En algunas formas de realización, la segunda unidad de fijación al antígeno consiste en una cadena única de polipéptidos (una cadena CD3). En algunas formas de realización, la primera y la segunda unidad de fijación al antígeno consisten en una cadena única de polipéptidos, respectivamente.

En algunas formas de realización, la primera unidad de fijación al antígeno de la proteína de la invención se forma mediante una primera cadena de polipéptidos (una cadena DLL3) y la segunda unidad de fijación al antígeno se forma mediante una segunda cadena de polipéptidos (una cadena CD3). De este modo, en algunas formas

de realización, la proteína de fijación de la invención comprende dos cadenas de polipéptidos diferentes, que comprenden, cada una, una unidad de fijación al antígeno con diferente especificidad, en donde las cadenas de polipéptidos se unen de manera covalente entre sí, ya sea mediante puentes disulfuro o, potencialmente, mediante un ligador peptídico. En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención es una proteína biespecífica bivalente heterodimérica que comprende dos cadenas de polipéptidos, una cadena de polipéptidos (una primera cadena de polipéptidos o cadena DLL3) que comprende una unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a DLL3 (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 definidos mediante las secuencias de VH/VL o CDR respectivas) y otra cadena de polipéptidos (una segunda cadena de polipéptidos o cadena CD3) que comprende una unidad de fijación al antígeno que se fija específicamente a CD3 (por ejemplo, cualquiera de CD3#1, CD3#2 o CD3#3).

En el contexto de la presente invención, un dominio Fc se deriva, por ejemplo, de la cadena pesada de una IgG, por ejemplo, una IgG₁, IgG₂ o IgG₄. Por ejemplo, un dominio Fc de la presente invención es un dominio Fc de una cadena pesada de una IgG₁ o IgG₄ y comprende una región bisagra y dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}). Se muestran ejemplos de dominios Fc (que incluyen una región bisagra) en SEQ ID NO: 81 y 84.

La numeración de los aminoácidos en las cadenas de aminoácido de una proteína de la presente invención se realiza en la presente de acuerdo con el sistema de numeración EU (Edelman, Cunningham *et al.* 1969), a menos que se indique lo contrario. Esto significa que los números de aminoácido indicados en la presente corresponden a las posiciones en una cadena pesada del subtipo correspondiente (por ejemplo, IgG₁ o IgG₄), de acuerdo con el sistema de numeración EU, a menos que se indique lo contrario.

En algunas formas de realización, el primer dominio Fc y el segundo dominio Fc en una proteína de la presente invención comprenden, cada uno, uno o más cambios de aminoácidos que reducen la formación de homodímeros de la primera y segunda cadena de polipéptidos en lugar de heterodímeros de una primera y una segunda cadena de polipéptidos. A través de estos cambios, se genera un “saliente” en uno de los dominios Fc mediante el reemplazo de una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de una de las cadenas pesadas con cadenas

laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar en la interfaz del otro dominio Fc mediante el reemplazo de cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros, en particular homodímeros del dominio Fc con la “saliente” (ver, por ejemplo, Ridgway *et al.* Protein Eng, 1996. 9(7): p. 617-21; Atwell *et al.*, JMB, 1997, 270, 26-35). En algunas formas de realización, dichos cambios de aminoácidos son una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y] del primer dominio Fc y una treonina (T) en la posición 407 [Y407T] del segundo dominio Fc. En algunas formas de realización, el primer dominio Fc comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S] y el segundo dominio Fc comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V]. En formas de realización preferidas, el primer dominio Fc comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], y el segundo dominio Fc comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V]. Por ejemplo, la posición 366 del dominio Fc de acuerdo con la numeración EU, que corresponde a la posición de aminoácido 146 en la secuencia Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO:81, se cambia de T en la posición 146 en SEQ ID NO:81 a W en la posición 146 en SEQ ID NO:82; y las posiciones 366, 368 y 407 de acuerdo con la numeración EU, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 146, 148 y 187, respectivamente, en SEQ ID NO:81, se cambian de T, L e Y en estas posiciones en SEQ ID NO:81 a S, A y V en estas posiciones en SEQ ID NO:83. En cualquiera de estas formas de realización, los cambios de aminoácidos descritos para el primer dominio Fc se pueden ubicar en el segundo dominio Fc y los cambios de aminoácidos respectivos para el segundo dominio Fc se pueden ubicar en el primer dominio Fc. En otras palabras, en estas formas de realización, las expresiones “primero” y “segundo” se pueden intercambiar. En algunas formas de realización, tal dominio Fc es un dominio Fc derivado de la cadena pesada de una IgG₁ o IgG₄.

En algunas formas de realización, el primer dominio Fc comprende una cisteína (C) en la posición 354 [S354C] además del triptófano (W) en la posición 366 [T366W] y el segundo dominio Fc comprende una cisteína (C) en la posición 349 [Y349C] además de la serina (S) en la posición 366 [T366S], la alanina (A) en la posición 368 [L368A] y la valina (V) en la posición 407 [Y407V]. En un aspecto, tal dominio Fc es un dominio Fc derivado de la cadena pesada de una IgG₄.

En algunos aspectos, el primer dominio Fc o el segundo dominio Fc en una proteína de fijación de la presente invención además comprenden uno o más cambios de aminoácidos que reducen la fijación del dominio Fc a la proteína A. En algunas formas de realización, dichos cambios de aminoácidos son una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F] de uno de los dominios Fc. Ambos cambios derivan de la secuencia de IgG3 humana (IgG3 no se fija a la proteína A). Estas dos mutaciones se ubican en el dominio CH3, y se incorporan en uno de los dominios Fc para reducir la fijación a la Proteína A (ver, por ejemplo, Jendeborg *et al.* J Immunol Methods, 1997. 201(1): p. 25-34). Estos dos cambios facilitan la eliminación de homodímeros de cadenas pesadas que comprenden estos cambios durante la purificación de las proteínas.

En algunas formas de realización, en una proteína de fijación de la presente invención, el dominio Fc, que comprende una treonina (T) en la posición 407 [Y407T], además comprende una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F]. En este caso, la otra cadena pesada comprende una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y], pero no incluye los dos cambios en las posiciones 435 y 436. De manera alternativa, en algunas formas de realización, en una proteína de la presente invención, el dominio Fc, que comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V], además comprende una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F]. En este caso, el otro dominio Fc comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], pero no incluye los dos cambios en las posiciones 435 y 436. Por lo tanto, el dominio Fc que comprende el cambio de aminoácidos que resulta en una “cavidad”, como se describió anteriormente, también comprende los cambios de aminoácidos, que reducen la fijación a la Proteína A. Los homodímeros que comprenden este dominio de Fc se eliminan a través de fijación reducida a la Proteína A. La producción de homodímeros del otro dominio de Fc, que comprende la “saliente”, se reduce mediante la presencia de la “saliente”.

En algunas formas de realización, el dominio Fc de una proteína de la presente invención además puede o no comprender mutaciones YTE (M252Y/S254T/T256E, numeración EU (Dall'Acqua, Kiener *et al.* 2006)). Se demostró que estas mutaciones mejoran las propiedades farmacocinéticas de los dominios Fc a través de la mejora preferencial de la afinidad de fijación para el receptor de FcRn neonatal a pH 6,0.

En algunas formas de realización, el primer y/o el segundo dominio Fc de la presente invención derivados de una IgG1 también incluyen mutaciones “KO” (L234A,

L235A). En otro aspecto, el primer y/o el segundo dominio Fc de la presente invención derivados de una IgG4 también incluyen la mutación bisagra Pro (S228P).

En formas de realización preferidas de la invención, la proteína de fijación comprende i) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#1/CD3#1), o ii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#2/CD3#1), o iii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#3/CD3#1), o iv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#4/CD3#1), o v) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#5/CD3#1), o vi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#6/CD3#1); o vii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:241 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#7/CD3#1); o viii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:242 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#8/CD3#1); o ix) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:243 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#9/CD3#1); o x) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:244 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#10/CD3#1); o xi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:245 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#11/CD3#1); o xii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:246 y una segunda cadena de polipéptidos

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#12/CD3#1); o xiii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:247 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#13/CD3#1); o xiv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:248 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#14/CD3#1); o xv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:249 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#15/CD3#1); o xvi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:250 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#16/CD3#1); o xvii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:251 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#17/CD3#1); o xviii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:252 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (DLL3#18/CD3#1). Preferentemente, la primera y segunda cadena de polipéptidos se unen mediante uno o más puentes disulfuro y forman una estructura tipo anticuerpo (Figura 1) similar a una molécula de anticuerpo en forma de Y convencional.

En otra forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, y SEQ ID NO:75, y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una

primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

En formas de realización preferidas de la invención, la proteína de fijación comprende i) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#1/CD3#2), o ii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#2/CD3#2), o iii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#3/CD3#2), o iv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#4/CD3#2), o v) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#5/CD3#2), o vi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#6/CD3#2); o vii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:241 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#7/CD3#2); o viii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:242 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#8/CD3#2); o ix) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:243 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#9/CD3#2); o x) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:244 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#10/CD3#2); o xi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:245 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#11/CD3#2); o xii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:246 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#12/CD3#2); o xiii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:247 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#13/CD3#2); o xiv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:248 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#14/CD3#2); o xv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:249 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#15/CD3#2); o xvi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:250 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#16/CD3#2); o xvii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:251 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#17/CD3#2); o xviii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:252 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (DLL3#18/CD3#2). Preferentemente, la primera y segunda cadena de polipéptidos se unen mediante uno o más puentes disulfuro y forman una estructura tipo anticuerpo (Figura 1) similar a una molécula de anticuerpo en forma de Y convencional.

En otra forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, y SEQ ID NO:75, y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80.

En formas de realización preferidas de la invención, la proteína de fijación comprende i) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#1/CD3#3), o ii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#2/CD3#3), o iii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#3/CD3#3), o iv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#4/CD3#3), o v) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#5/CD3#3), o vi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#6/CD3#3); o vii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:241 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#7/CD3#3); o viii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:242 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#8/CD3#3); o ix) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:243 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#9/CD3#3); o x) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:244 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#10/CD3#3); o xi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:245 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:105 (DLL3#11/CD3#3); o xii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:246 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#12/CD3#3); o xiii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:247 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#13/CD3#3); o xiv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:248 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#14/CD3#3); o xv) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:249 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#15/CD3#3), o xvi) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:250 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#16/CD3#3); o xvii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:251 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#17/CD3#3); o xviii) una primera cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:252 y una segunda cadena de polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 (DLL3#18/CD3#3). Preferentemente, la primera y segunda cadena de polipéptidos se unen mediante uno o más puentes disulfuro y forman una estructura tipo anticuerpo (Figura 1) similar a una molécula de anticuerpo en forma de Y convencional.

En otra forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, y SEQ ID NO:75, y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y una segunda cadena de polipéptidos específica

para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación comprende una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105.

Para todas las formas de realización anteriores, se debe entender que la expresión “que comprende” también incluye una forma de realización en donde el dominio o la molécula respectivos “consisten en” la secuencia de aminoácidos como se indica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína que comprende una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 y una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, en donde la primera cadena comprende una primera cadena liviana unida de manera covalente (por ejemplo, unida directamente) a un primer ligador, que está unido de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) a una primera cadena pesada, y en donde la segunda cadena que se fija específicamente a CD3 comprende una segunda cadena liviana unida de manera covalente (por ejemplo, unida directamente) a un segundo ligador, que está unido de manera covalente (por ejemplo, unido directamente) a una segunda cadena pesada.

En algunas formas de realización, a partir de su terminal N, la primera cadena de polipéptidos comprende una primera región variable de la cadena liviana que se fija específicamente a DLL3, una primera región constante de la cadena liviana, un primer ligador, una primera región variable de la cadena pesada específica para DLL3 y una primera región constante de la cadena pesada. En algunas formas de realización, a partir de su terminal N, la segunda cadena de polipéptidos comprende una segunda región variable de la cadena liviana que se fija específicamente a CD3, una segunda región constante de la cadena liviana, un segundo ligador, una segunda región variable de la cadena pesada específica para CD3 y una segunda región constante de la cadena pesada.

Las proteínas resultantes tienen un Fc completo, que es ligeramente más grande que una IgG y tiene dos sitios de fijación independientes (por ejemplo, cada sitio de fijación es monovalente para el antígeno respectivo), un primer sitio de fijación para DLL3 y un segundo sitio de fijación para CD3. Preferentemente, la primera y segunda cadena de polipéptidos se unen mediante uno o más puentes disulfuro. Como tales, las proteínas de la invención son estructuras tipo anticuerpo, que tienen la

estructura en forma de Y de un anticuerpo de longitud completa convencional (ver Figura 1). Este formato biespecífico reduce en gran medida la heterogeneidad después de la expresión y purificación (por ejemplo, al evitar un error de apareamiento de los dominios variables de las cadenas liviana y pesada con especificidades de fijación diferentes), mientras se mantienen las propiedades funcionales de las porciones de fijación dentro de una estructura con menos probabilidades de generar reacciones inmunógenas no deseadas. Esto también permite una buena expresión de proteínas heterodiméricas, por ejemplo, en células de mamíferos.

En algunas formas de realización de la proteína de la invención, la primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 comprende un primer dominio variable de la cadena liviana y un primer dominio variable de la cadena pesada, que comprenden secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consisten en i) a xviii):

- i) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO.:1 (CDR1), SEQ ID NO.:2 (CDR2) y SEQ ID NO.:3 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3);
- ii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3);
- iii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3);
- iv) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) y SEQ ID NO:21 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) y SEQ ID NO:24 (CDR3);
- v) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) y SEQ

- ID NO:27 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) y SEQ ID NO:30 (CDR3); y
- vi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) y SEQ ID NO:33 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) y SEQ ID NO:36 (CDR3);
 - vii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) y SEQ ID NO:135 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) y SEQ ID NO:138 (CDR3);
 - viii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) y SEQ ID NO:141 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) y SEQ ID NO:144 (CDR3);
 - ix) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) y SEQ ID NO:147 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) y SEQ ID NO:150 (CDR3);
 - x) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) y SEQ ID NO:153 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) y SEQ ID NO:156 (CDR3);
 - xi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) y SEQ ID NO:159 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) y SEQ ID NO:162 (CDR3);
 - xii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) y

- SEQ ID NO:165 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) y SEQ ID NO:168 (CDR3);
- xiii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) y SEQ ID NO:171 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) y SEQ ID NO:174 (CDR3);
 - xiv) que comprende CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) y SEQ ID NO:177 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) y SEQ ID NO:180 (CDR3);
 - xv) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) y SEQ ID NO:183 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) y SEQ ID NO:186 (CDR3);
 - xvi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) y SEQ ID NO:189 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) y SEQ ID NO:192 (CDR3);
 - xvii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) y SEQ ID NO:195 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) y SEQ ID NO:198 (CDR3); y
 - xviii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) y SEQ ID NO:201 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) y SEQ ID NO:204 (CDR3).

Los dominios variables de la cadena liviana/pesada respectivos definidos mediante estas secuencias de CDR se denominan DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3,

DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, y DLL3#18, respectivamente. Preferentemente, las secuencias de CDR se seleccionan del grupo que consiste en i) a iii) (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3), como se definió anteriormente.

En formas de realización preferidas de la proteína de fijación de la invención, dicha segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3 comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana y un segundo dominio variable de la cadena pesada, que comprende secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en:

- i) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3);
- ii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3); y
- iii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) y SEQ ID NO:98 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:99 (CDR1), SEQ ID NO:100 (CDR2) y SEQ ID NO:101 (CDR3).

Los dominios variables de la cadena liviana/pesada respectivos definidos mediante estas secuencias de CDR se denominan CD3#1, CD3#2 y CD3#3, respectivamente.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena liviana con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende

un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena liviana con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) y SEQ ID NO:57 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) y SEQ ID NO:60 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención

comprende (i) una primera cadenas de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadenas de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadenas de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y un primer dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3); y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3,

que comprende un segundo dominio variable de la cadena liviana con CDR de cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) y SEQ ID NO:63 (CDR3) y un segundo dominio variable de la cadena pesada con CDR de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) y SEQ ID NO:66 (CDR3).

En formas de realización preferidas de la proteína de la invención, dicha primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3 comprende un dominio variable de la cadena liviana (un primer dominio variable de la cadena liviana) y un dominio variable de la cadena pesada (un primer dominio variable de la cadena pesada) seleccionados del grupo que consiste en i) a xviii):

- i) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:38 (DLL3#1);
- ii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:40 (DLL3#2);
- iii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42 (DLL3#3);
- iv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:44 (DLL3#4);
- v) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:46 (DLL3#5);
- vi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:48 (DLL3#6);

- vii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206 (DLL3#7);
- viii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208 (DLL3#8);
- ix) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210 (DLL3#9);
- x) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:212 (DLL3#10);
- xi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:214 (DLL3#11);
- xii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:215 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:216 (DLL3#12);
- xiii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:217 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:218 (DLL3#13);
- xiv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:219 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:220 (DLL3#14);
- xv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:221 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

- NO:222 (DLL3#15);
- xvi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:223 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:224 (DLL3#16);
 - xvii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:225 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:226 (DLL3#17); y
 - xviii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:227 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:228 (DLL3#18).

Preferentemente, las secuencias de dominio variable de la cadena liviana y de dominio variable de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en i) a iii) (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3), como se definió anteriormente.

En formas de realización preferidas de la proteína de la invención, dicha segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3 comprende un dominio variable de la cadena liviana (un segundo dominio variable de la cadena liviana) y un dominio variable de la cadena pesada (un segundo dominio variable de la cadena pesada) seleccionados del grupo que consiste en:

- i) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 (CD3#1);
- ii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70 (CD3#2); y
- iii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 (CD3#3).

En algunas formas de realización, la proteína de fijación de la invención comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos que comprenden CDR

y/o secuencias de VH y VL de los dominios variables de la cadena liviana/pesada seleccionados de la lista que consiste en DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 y DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3. En formas de realización preferidas, la proteína de fijación de la invención comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos que comprenden CDR y/o secuencias de VH y VL de los dominios variables de la cadena liviana/pesada seleccionados de la lista que consiste en DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3 y DLL3#3/CD3#3.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:38; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:40; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3,

que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:42; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:68.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:37 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:38; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:70.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:39 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:40; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:70.

En una forma de realización preferida, la proteína de fijación de la invención comprende (i) una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente a DLL3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:42; y (ii) una segunda cadena de polipéptidos que se fija específicamente a CD3, que comprende un dominio variable de la cadena liviana de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:70.

En algunas formas de realización de la invención, el primer y/o el segundo péptido ligador comprenden un ligador como se describió anteriormente, por ejemplo, un ligador derivado de una región bisagra, un ligador de polialanina o un ligador Gly/Ser, en donde el ligador comprende de 26 a 42 aminoácidos, por ejemplo, cualquiera de 30 a 40 aminoácidos, 34 a 40 aminoácidos, o 36 a 39 aminoácidos, preferentemente, 38 aminoácidos.

En formas de realización preferidas, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID

NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, o SEQ ID NO:240 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

En algunas formas de realización, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, o SEQ ID NO:240 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En algunas formas de realización, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, o SEQ ID NO:240 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos

específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En una forma de realización preferida, la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la primera y segunda cadena de polipéptidos comprenden un dominio Fc derivado de la cadena pesada de una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2 o IgG4. Por ejemplo, un dominio Fc de la presente invención es un dominio Fc de una cadena pesada de una IgG1 o IgG4 y comprende una región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Ejemplos de los dominios Fc de IgG humana se muestran en SEQ ID NO:81 y 84.

En algunas formas de realización de la proteína de fijación de la invención, la cadena pesada comprende uno o más cambios de aminoácidos. Por ejemplo, dichos cambios de aminoácidos son una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y] de la primera cadena pesada y una treonina (T) en la posición 407 [Y407T] de la segunda cadena pesada. En algunas formas de realización, la primera cadena pesada comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S] y la segunda cadena pesada comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V]. En formas de realización preferidas, la primera cadena pesada comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W] y la segunda cadena pesada comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V]. Por ejemplo, la posición 366 del dominio Fc de acuerdo con la numeración EU, que corresponde a la posición de aminoácido 146 en la secuencia Fc de IgG1 humana de SEQ ID NO:81, se cambia de T en la posición 146 en SEQ ID NO:81 a W en la posición 146 en SEQ ID NO:82; y las posiciones 366, 368 y 407 de acuerdo con la numeración EU, que corresponde a las posiciones de aminoácidos 146, 148 y 187, respectivamente, en SEQ ID NO:81, se cambian de T, L e Y en estas posiciones en SEQ ID NO:81 a S, A y V en estas posiciones en SEQ ID NO:83. En cualquiera de estas formas de realización, los cambios de aminoácidos descritos para la primera cadena pesada se pueden ubicar en la segunda cadena pesada y los cambios de aminoácidos respectivos para la segunda cadena pesada se pueden ubicar en la primera cadena pesada. En otras palabras, en estas formas de realización, las

expresiones “primera” y “segunda” se pueden intercambiar. En algunas formas de realización, la cadena pesada se deriva de la cadena pesada de una IgG₁ o IgG₄.

En algunas formas de realización, la primera cadena pesada o la segunda cadena pesada en una proteína de la presente invención además comprenden uno o más cambios de aminoácidos que reducen la fijación de la cadena pesada a la proteína A. En algunas formas de realización, dichos cambios de aminoácidos son una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F] de una de las cadenas pesadas.

En algunas formas de realización, en una proteína de la presente invención, la cadena pesada, que comprende una treonina (T) en la posición 407 [Y407T], además comprende una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F]. En este caso, la otra cadena pesada comprende una tirosina (Y) en la posición 366 [T366Y], pero no incluye los dos cambios en las posiciones 435 y 436. De manera alternativa, en algunas formas de realización, en una proteína de la presente invención, la cadena pesada, que comprende una serina (S) en la posición 366 [T366S], una alanina (A) en la posición 368 [L368A] y una valina (V) en la posición 407 [Y407V], además comprende una arginina en la posición 435 [H435R] y una fenilalanina en la posición 436 [Y436F]. En este caso, la otra cadena pesada comprende un triptófano (W) en la posición 366 [T366W], pero no incluye los dos cambios en las posiciones 435 y 436. Por lo tanto, la cadena pesada que comprende el cambio de aminoácidos que resulta en una “cavidad”, como se describió anteriormente, también comprende los cambios de aminoácidos, que reducen la fijación a la proteína A. Los homodímeros que comprenden estas cadenas pesadas se eliminan a través de fijación reducida a la proteína A. La producción de homodímeros de la otra cadena pesada, que comprende la “saliente”, se reduce mediante la presencia de la “saliente”.

En otras formas de realización, la cadena pesada de una proteína de la presente invención además puede o no comprender mutaciones YTE (M252Y/S254T/T256E, numeración EU (Dall'Acqua, Kiener et al. 2006)). Se demostró que estas mutaciones mejoran las propiedades farmacocinéticas de la cadena pesada a través de la mejora preferencial de la afinidad de fijación para el receptor de FcRn neonatal a pH 6,0.

En algunas formas de realización, la primera y/o la segunda cadena pesada de la presente invención derivada de una IgG1 también incluyen mutaciones “KO” (L234A, L235A). En otro aspecto, la primera y/o la segunda cadena pesada de la

presente invención derivada de una IgG4 también incluyen la mutación bisagra Pro (S228P).

En otro aspecto, las proteínas de la invención comprenden una primera unidad de fijación al antígeno o una cadena de polipéptidos específica para DLL3 con una afinidad de, preferentemente, $\leq 10\text{nM}$, con mayor preferencia, $\leq 1\text{nM}$, aun con mayor preferencia, $\leq 0,1\text{nM}$, aun con mayor preferencia, $\leq 0,01\text{ nM}$ a DLL3 humana y de *Macaca fascicularis*. La afinidad se puede medir en un ensayo SPR (BIAcore) mediante proteína DLL3 recombinante, como se describió, por ejemplo, en los ejemplos u otros métodos que son conocidos para la persona del oficio de nivel medio. Las proteínas comprenden una segunda unidad de fijación al antígeno o una cadena de polipéptidos con una afinidad de, preferentemente, $\leq 500\text{ nM}$, con mayor preferencia, $\leq 100\text{ nM}$, aun con mayor preferencia, $\leq 10\text{ nM}$ a un complejo CD3 ϵ γ humano y de *Macaca fascicularis*.

En otro aspecto, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención no fijan las células que no expresan DLL3 y no reaccionan de manera cruzada con los parálogos de DLL3 humana, DLL1 y DDL4, como se mostró en el Ejemplo 5.

En otro aspecto, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la presente invención comprenden una primera unidad de fijación al antígeno o una primera cadena de polipéptidos que se fija específicamente al péptido próximo a la membrana de la proteína DLL3. En otro aspecto, las proteínas de la invención muestran fijación débil a las células que expresan proteína DLL3, por ejemplo, no se logra saturación de la fijación de la proteína a la superficie celular hasta una concentración de 100 nM (ver, por ejemplo Figura 6).

En otro aspecto, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la presente invención son capaces de mediar la citotoxicidad contra células tumorales al proporcionar condiciones estéricas óptimas para la formación de una sinapsis citolítica entre una célula tumoral que expresa DLL3 y un linfocito T, con el fin de redirigir la actividad del linfocito T de manera selectiva a las células tumorales diana, lo que produce la lisis de células tumorales.

Se pueden usar distintos métodos para medir la citotoxicidad mediada por las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la presente invención. Por ejemplo, la citotoxicidad se puede medir usando el método descrito en el Ejemplo 10. Las células efectoras pueden ser, por ejemplo, linfocitos T (humanos o de *Macaca fascicularis*) estimulados o no estimulados, o sus subconjuntos (por ejemplo, CD4, CD8), o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (humanas o de *Macaca fascicularis*) no

estimuladas. Las células diana deberían expresar al menos el dominio extracelular de DLL3 (humana o de *Macaca fascicularis*) y pueden ser células con expresión de DLL3 (natural) endógena, tal como líneas celulares de carcinoma pulmonar de células pequeñas humanas SHP77, NCI-H82, de manera alternativa, también células recombinantes que expresan DLL3 de longitud completa o dominio extracelular de DLL3. En general, la relación entre las células efectora con respecto a diana (E:T) es de alrededor de 10:1, pero puede variar. La actividad citotóxica de las moléculas de fijación a DLL3/CD3 se puede determinar, por ejemplo, en un ensayo de liberación de LDH después de 48 o 72 horas de incubación. Las modificaciones posibles del tiempo de incubación y lectura usados para la determinación de la citotoxicidad son conocidas por las personas del oficio de nivel medio. Los sistemas de lectura para citotoxicidad pueden comprender ensayos MTT/MTS, ensayos a base de ATP, ensayos a base de FACS, ensayos de liberación de cromo 51, ensayos de sulforodamina B (SRB), ensayos colorimétricos (WST), ensayos clonogénicos, ensayos bioluminescentes y tecnología ECIS.

La actividad citotóxica mediada por proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la presente invención se mide, preferentemente, en un ensayo de citotoxicidad a base de células. La citotoxicidad se representa mediante los valores EC_{90} medidos en el ensayo de citotoxicidad. La persona del oficio de nivel medio sabe que se puede esperar que EC_{90} sea menor cuando se usan linfocitos T purificados como células efectoras, en comparación con PBMC, y también sabe que EC_{90} puede ser aun menor cuando se usan linfocitos T estimulados. Asimismo, se puede esperar que los valores EC_{90} sean menores cuando las células diana expresan una alta cantidad de DLL3 en la superficie celular en comparación con células que expresan baja cantidad de moléculas DLL3 en la superficie celular. La EC_{90} de la proteína de fijación a DLL3/CD3 es, preferentemente, ≤ 10 nM, con mayor preferencia, ≤ 5 nM, y aun con mayor preferencia, ≤ 1 nM.

Preferentemente, las proteínas de fijación multiespecífica de la invención no inducen/median en la lisis de células que no expresan DLL3. La expresión “no induce/media en la lisis de células que no expresan DLL3” significa que la molécula de fijación a DLL3/CD3 no induce ni media en la lisis de más de 30 %, preferentemente, no más de 20 %, con mayor preferencia, no más de 10 % y, en particular, no más de 5 % de células que no expresan DLL3, mientras que la lisis de la línea celular de carcinoma pulmonar que expresa DLL3 se establece en 100 %. En general, esto se aplica en concentraciones de la proteína de fijación de hasta 1000 nM.

Preferentemente, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención no son internalizadas por las células diana. La velocidad de internalización se puede someter a ensayo, por ejemplo, como se describió en el Ejemplo 11. Preferentemente, la velocidad de internalización (por ejemplo, medida como una disminución en la citotoxicidad) es ≤ 50 % luego de 4 horas de preincubación de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 con las células diana, con mayor preferencia, ≤ 40 %, y, aun con mayor preferencia, ≤ 30 %.

Asimismo, se demostró que las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención son estables con un contenido de monómeros superior a 95 % (por ejemplo, al menos 98 %, ver Ejemplo 14), tienen propiedades farmacocinéticas favorables y buena producibilidad corriente abajo, y además, se espera que tengan buena biodistribución (ver, por ejemplo, Ejemplo 12). Asimismo, las proteínas de la presente invención tienen un perfil de inmunogenicidad favorable (ver Ejemplo 16) y tienen buena estabilidad *in vitro* e *in vivo* (ver, por ejemplo, Ejemplos 12 y 15). Asimismo, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención (por ejemplo, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2) muestran eficacia favorable en un modelo de xenoinjerto *in vivo* humanizado en ratón. Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 indujeron una regresión tumoral fuerte desde el inicio luego de la primera dosis de proteínas de fijación a DLL3/CD3. Asimismo, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención inducen la regresión tumoral en dosis muy bajas de 0,25 mg/kg administradas una vez por semana (q7d), lo que respalda aun más su aplicabilidad terapéutica. En particular, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención inducen la proliferación selectiva de linfocitos T, activación de linfocitos T, desgranulación de linfocitos T y la secreción de citocinas (ver Ejemplo 18) solo en presencia de células diana que expresan DLL3 y no en presencia de células diana que no expresan DLL3, y además aumentan significativamente la infiltración de linfocitos T en el tejido tumoral (ver Ejemplo 20). Asimismo, el Ejemplo 19 demuestra que las proteínas de fijación a DLL3/CD3 median en la lisis redirigida por linfocitos T CD4⁺ así como CD8⁺. En particular, los linfocitos T indiferenciados así como también las células de memoria CD4⁺ efectoras, de memoria central CD4⁺, de memoria CD8⁺ y CD8⁺CD45RA⁺ efectoras contribuyen a la lisis redirigida por linfocitos T de células tumorales que expresan DLL3.

Otro aspecto de la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la primera y/o la segunda unidad de fijación al antígeno de una proteína de fijación multiespecífica de la invención. En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico además codifican un primer y/o un segundo dominio

Fc como se describe en la presente, en donde el primer y/o el segundo dominio Fc están ligados al extremo 3' de la molécula de ácido nucleico que codifica la primera y/o la segunda unidad de fijación al antígeno, respectivamente. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico codifica i) una primera cadena de polipéptidos que comprende un primer Fab monocatenario específico para DLL3 (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 y DLL3#18), y opcionalmente, un primer dominio Fc y/o ii) una segunda cadena de polipéptidos que comprende un segundo Fab monocatenario específico para CD3 (por ejemplo, cualquiera de CD3#1, CD3#2 y CD3#3) y, opcionalmente, un segundo dominio Fc.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer Fab monocatenario de cualquiera de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, o SEQ ID NO:240 y/o un segundo Fab monocatenario de SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 o SEQ ID NO:104. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena de polipéptidos de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, o SEQ ID NO: 252 y/o una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 o SEQ ID NO:105.

Otro aspecto de la invención proporciona un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el primer y/o segundo dominio de fijación al antígeno (por ejemplo, un primer y/o segundo Fab monocatenario de la invención). Preferentemente, el vector de expresión comprende, además, una molécula de ácido nucleico, preferentemente, una molécula de ADN, que codifica un primer y/o segundo dominio Fc, ligado a la molécula de ácido nucleico, preferentemente, la molécula de ADN, que codifica el primer y/o segundo dominio de fijación al antígeno (por ejemplo, el primer y/o segundo Fab monocatenario, respectivamente). Como tal, el vector de expresión comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que comprende un primer Fab monocatenario ligado a un primer dominio Fc y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que comprende un segundo Fab monocatenario ligado a un segundo dominio Fc.

En una forma de realización preferida, el vector de expresión contiene una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la primera y/o la segunda cadena de polipéptidos de la invención. En una forma de realización preferida, el vector de expresión comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena de polipéptidos de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, o SEQ ID NO: 252 y/o una segunda cadena de polipéptidos que comprende SEQ ID NO:79.

En otras formas de realización preferidas, el vector de expresión comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena de polipéptidos de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, o SEQ ID NO: 252 y/o una segunda cadena de polipéptidos que comprende SEQ ID NO:80.

En otras formas de realización preferidas, el vector de expresión comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena de polipéptidos de cualquiera de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, o SEQ ID NO: 252 y/o una segunda cadena de polipéptidos que comprende SEQ ID NO:105.

En una forma de realización específicamente preferida, se pueden usar dos vectores de expresión, uno de ellos para la expresión de la primera cadena de polipéptidos específica para DLL3, el otro para la expresión de la segunda cadena de polipéptidos específica para CD3, en donde los dos vectores de expresión se pueden transfectar en una célula huésped para la expresión de proteínas recombinantes.

Preferentemente, el vector de expresión será un vector que comprende la molécula o las moléculas de ácido nucleico, ligadas operativamente a al menos una

secuencia reguladora, en donde dicha secuencia reguladora puede ser una secuencia promotora, potenciadora o terminadora y, con máxima preferencia, una secuencia promotora, potenciadora o terminadora heteróloga.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que tiene un vector de expresión que codifica una primera cadena de polipéptidos específica para DLL3 de la invención y un vector de expresión que codifica una segunda cadena de polipéptidos específica para CD3 de la invención.

De acuerdo con una forma de realización de particular preferencia, estas células huésped son células eucariotas, tales como células de mamífero. En otra forma de realización, las células huésped son células bacterianas. Otras células útiles son células de levadura u otras células fúngicas.

Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, y similares. Sin embargo, también se pueden utilizar células de anfibio, células de insecto, células de planta y muchas otras células utilizadas en el estado de la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

ANTICUERPOS ANTI-DLL3

En general, DLL3 se expresa en membranas intracelulares, incluso aquellas del aparato de Golgi en el cerebro fetal, y tiene una función clave en la somitogénesis en el mesodermo paraxial (Geffers et al., J Cell Biol. 2007;178:465; Chapman et al., Hum. Mol. Genet. 2011;20:905-916). La inducción marcada de la expresión de DLL3 en algunos tipos de tumor, que incluyen SCLC, LCNEC y glioblastoma, da como resultado la localización en la superficie celular: esto junto con la ausencia de DLL3 en superficie celular detectable en células no malignas crea una nueva oportunidad para el tratamiento específico para células tumorales y para el uso de anticuerpos anti-DLL3 como herramientas de diagnóstico y pronóstico.

Muchos anticuerpos anti-DLL3 (tales como LS-c167440, Lifespan; AP21739PU-N, Acris; LS-C148700, LSBio) están disponibles en el comercio. Sin embargo, estos anticuerpos no tienen buenos resultados en los ensayos de inmunohistoquímica (IHC), FACS y ELISA y no logran fijarse específicamente a la proteína DLL3 expresada en las células, en particular, células tumorales. También se informó sobre anticuerpos anti-DLL3, por ejemplo, en WO2007111733 y se los sugirió para uso diagnóstico en pacientes con glioma, pero no se mostraron datos de ensayos de IHC. De este modo, el uso de anticuerpos anti-DLL3 como herramientas de diagnóstico confiables para medir de manera precisa la expresión de DLL3 en pacientes, por ejemplo, en células/tejidos tumorales y/o para evaluar la eficacia de tratamientos dirigidos contra

DLL3 sigue siendo un desafío.

En consecuencia, existe la necesidad de identificar anticuerpos anti-DLL3 alternativos, que se puedan usar para la detección precisa y específica de la expresión de la proteína DLL3 en distintos ensayos tales como los ensayos FACS, ELISA, inmunoprecipitación, transferencia Western, ELISA, radioinmunoensayo, citometría de flujo, IHC e inmunométrico en cualquier tipo de muestra biológica, y se puedan usar como reactivos diagnósticos confiables.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona moléculas de anticuerpos anti-DLL3, que comprenden:

- i) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) y SEQ ID NO:3 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) y SEQ ID NO:6 (CDR3); o
- ii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) y SEQ ID NO:9 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) y SEQ ID NO:12 (CDR3); o
- iii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) y SEQ ID NO:15 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) y SEQ ID NO:18 (CDR3); o
- iv) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) y SEQ ID NO:21 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) y SEQ ID NO:24 (CDR3); o
- v) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) y SEQ ID NO:27 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) y SEQ ID NO:30 (CDR3); o
- vi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de

- aminoácidos de SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) y SEQ ID NO:33 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) y SEQ ID NO:36 (CDR3); o
- vii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) y SEQ ID NO:135 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) y SEQ ID NO:138 (CDR3); o
 - viii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) y SEQ ID NO:141 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) y SEQ ID NO:144 (CDR3); o
 - ix) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) y SEQ ID NO:147 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) y SEQ ID NO:150 (CDR3); o
 - x) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) y SEQ ID NO:153 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) y SEQ ID NO:156 (CDR3); o
 - xi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) y SEQ ID NO:159 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) y SEQ ID NO:162 (CDR3); o
 - xii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) y SEQ ID NO:165 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) y SEQ ID NO:168 (CDR3); o
 - xiii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de

- aminoácidos de SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) y SEQ ID NO:171 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) y SEQ ID NO:174 (CDR3); o
- xiv) que comprenden CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) y SEQ ID NO:177 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) y SEQ ID NO:180 (CDR3); o
 - xv) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) y SEQ ID NO:183 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) y SEQ ID NO:186 (CDR3); o
 - xvi) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) y SEQ ID NO:189 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) y SEQ ID NO:192 (CDR3); o
 - xvii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) y SEQ ID NO:195 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) y SEQ ID NO:198 (CDR3); o
 - xviii) CDR de la cadena liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) y SEQ ID NO:201 (CDR3) y CDR de la cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) y SEQ ID NO:204 (CDR3).

Los anticuerpos i) a xviii) como se indicaron anteriormente se denominan DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 o DLL3#18 respectivamente. En la presente, se proporciona una tabla de secuencias que permite identificar fácilmente secuencias de aminoácidos individuales con anticuerpos específicos de la presente invención.

En formas de realización preferidas de la invención, la molécula de anticuerpo comprende secuencias de CDR como se define en i) o v) más arriba que corresponden a DLL3#1 o DLL3#5.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la invención es una molécula de anticuerpo quimérico, humano o humanizado. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal Fab, F(ab)₂, Fv o scFv. . En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 de la invención comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. En algunas formas de realización, la región constante de la cadena liviana de la molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención es kappa o lambda.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la invención tiene un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226 y 228. Preferentemente, la molécula de anticuerpo tiene un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226 o 228.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 tiene un dominio variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 y 227. Preferentemente, la molécula de anticuerpo tiene un dominio variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 o 227.

Los métodos para calcular las identidades de secuencia de aminoácidos son conocidos en el estado de la técnica y también se analizan en la presente en la sección de definiciones de la memoria descriptiva.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 tiene i) un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37 (DLL3#1), o ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 (DLL3#2); o iii) un dominio variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 (DLL3#3), o iv) un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 (DLL3#4); o v) un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 (DLL3#5); o vi) un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 (DLL3#6); o vii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206 (DLL3#7); o viii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208 (DLL3#8); o ix) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210 (DLL3#9); o x) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:212 (DLL3#10); o xi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:214 (DLL3#11); o xii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:215 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:216 (DLL3#12); o xiii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:217 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:218 (DLL3#13); o xiv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:219 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:220 (DLL3#14); o xv) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:221 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:222 (DLL3#15); o xvi) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:223 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:224 (DLL3#16); o xvii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:225 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:226 (DLL3#17); o xviii) un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:227 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:228 (DLL3#18).

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL3 de la invención es un anticuerpo monoclonal de ratón. En el contexto de la presente invención, un anticuerpo monoclonal de ratón incluye un anticuerpo en donde VH y VL se obtienen de la inmunización de ratones con proteína DLL3 humana, selección posterior de secuencias de VH y VL adecuadas que se fijan con cierta afinidad a DLL3 humana, y luego unión de las secuencias de VH y VL a dominios constantes que derivan de ratón (por ejemplo, de IgG2a de ratón) mediante técnicas recombinantes; y que se producen mediante expresión recombinante en células huésped. La invención también abarca anticuerpos quiméricos, por ejemplo, que comprenden regiones variables y constantes de diferentes especies. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico que comprende los dominios VH y VL derivados de ratón como se describió anteriormente y que además comprende dominios constantes derivados de otras especies tales como ser humano, conejo, rata, cabra, asno. En algunas formas de realización, el anticuerpo quimérico comprende dominios VH y VL derivados de ratón y luego humanizados o con secuencias optimizadas como se definió anteriormente y además comprende dominios constantes derivadas de otras especies. En algunas formas de realización, el anticuerpo quimérico comprende dominios VH y VL derivados de un animal transgénico (por ejemplo, un ratón) que comprende secuencias de IgG humana, y así comprende secuencias de VH y VL humanas, y además comprende dominios constantes derivados de otras especies. En cualquiera de las formas de realización de los anticuerpos quiméricos como se definió anteriormente, la región constante de la cadena pesada es una región de la cadena pesada de ratón, ser humano, conejo, rata, cabra o asno.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención tiene un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en los

dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-DLL3 tiene un dominio constante de IgG2a, preferentemente, que comprende la secuencia de SEQ ID NO:254. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 tiene un dominio constante de la cadena liviana que es kappa o lambda, preferentemente, el dominio constante de la cadena liviana es un dominio constante de la cadena liviana kappa, preferentemente, que comprende la secuencia de SEQ ID NO:255.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 es capaz de fijarse a DLL3 humana o de *Macaca fascicularis* con una constante de disociación (KD) de, preferentemente, $\leq 10\text{nM}$, con mayor preferencia, $\leq 1\text{nM}$, aun con mayor preferencia, $\leq 0,1\text{nM}$, aun con mayor preferencia, $\leq 0,01\text{ nM}$. La afinidad (valor KD) se puede medir en un ensayo SPR (BIAcore) mediante proteína DLL3 recombinante, como se describió, por ejemplo, en los ejemplos u otros métodos que son conocidos para la persona del oficio de nivel medio.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 no se fija a DLL3 de ratón.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 es capaz de detectar la expresión de DLL3 (por ejemplo, la expresión de la proteína en la superficie o citoplasmática) en muestras de tejido (por ejemplo, muestras de tejido embebido en parafina/fijado en formalina) tales como muestras de tejido tumoral, o líneas celulares cultivadas. Opcionalmente, las muestras de tejido o cultivo celular embebido en parafina/fijado en formalina se tratan con un recuperador de epítomos tal como proteinasa K.

En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención se fija al mismo epítipo como cualquiera de los anticuerpos DLL3#1, DLL2#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, o DLL3#18. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención compite de manera cruzada por la fijación a DLL3 humana con cualquiera de las moléculas de anticuerpo DLL3#1, DLL2#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, o DLL3#18.

Otro aspecto de la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena liviana de una molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226 o 228. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena liviana de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 o 227.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena liviana de una molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención.

Preferentemente, el vector de expresión comprende, además, una molécula de ácido nucleico, preferentemente, una molécula de ADN, que codifica los dominios constantes de una cadena pesada y/o el dominio constante de una cadena liviana, respectivamente, ligados a la molécula de ácido nucleico, preferentemente, la molécula de ADN, que codifica el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena liviana, respectivamente.

En una forma de realización específicamente preferida, se pueden usar dos vectores de expresión, uno de ellos para la expresión de la cadena pesada, el otro para la expresión de la cadena liviana, en donde los dos vectores de expresión se pueden transfectar en una célula huésped para la expresión de proteínas recombinantes.

Preferentemente, el vector de expresión será un vector que comprende la molécula o las moléculas de ácidos nucleicos, ligadas operativamente a al menos una secuencia reguladora, en donde dicha secuencia reguladora puede ser una secuencia promotora, potenciadora o terminadora y, con máxima preferencia, una secuencia promotora, potenciadora o terminadora heteróloga.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que tiene un vector de expresión que codifica una cadena pesada de una molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención y un vector de expresión que codifica una cadena liviana de una molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención.

De acuerdo con una forma de realización de particular preferencia, estas células huésped son células eucariotas, tales como células de mamífero. En otra forma de realización, las células huésped son células bacterianas. Otras células útiles son células de levadura u otras células fúngicas.

Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, y similares. Sin embargo, también se pueden utilizar células de anfibio, células de insecto, células de planta y muchas otras células utilizadas en el estado de la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y PURIFICACIÓN

La invención también proporciona métodos para la fabricación de una proteína de fijación multiespecífica de la invención, que comprenden, en general, las siguientes etapas:

- cultivar las células huésped que comprenden un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fijación de la invención en condiciones que permiten la formación de la proteína de fijación de la invención; y
 - recuperar la proteína de fijación expresada por las células huésped del cultivo;
- y
- opcionalmente, purificar y/o modificar y/o formular adicionalmente la proteína de fijación de la invención.

La invención también proporciona métodos para la fabricación de un anticuerpo anti-DLL3 de la invención, en donde los métodos comprenden, en general, las siguientes etapas:

- cultivar las células huésped que comprenden un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de la invención en condiciones que permiten la formación de la molécula de anticuerpo; y
- recuperar la molécula de anticuerpo expresada por las células huésped del cultivo; y
- opcionalmente, purificar y/o modificar y/o formular adicionalmente la molécula de anticuerpo de la invención.

Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN que comprende secuencias codificantes, así como también secuencias reguladoras y, opcionalmente, intrones naturales o artificiales, o puede ser una molécula de cADN. Puede tener sus codones originales o puede tener un uso de codón optimizado adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped u organismo huésped previsto. De acuerdo con una forma de realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, como se definió anteriormente.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida *per se* (por ejemplo, mediante síntesis de ADN automatizada y/o

tecnología de ADN recombinante), en función de la información en las secuencias de aminoácidos para las proteínas de la invención proporcionadas en la presente.

Generalmente, el ácido nucleico de la invención se incorporará a un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la expresión de la proteína cuando se transfecta en una célula huésped adecuada u otro sistema de expresión.

Para elaborar las proteínas de fijación o los anticuerpos de la invención, la persona del oficio de nivel medio puede escoger de una amplia variedad de sistemas de expresión conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, aquellos analizados por Kipriyanow y Le Gall, 2004.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV y similares. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de manera que sean compatibles con la célula huésped. La secuencia de nucleótidos que codifica la primera unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, el Fab monocatenario específico de DLL3 o la cadena DLL3 de longitud completa de la proteína de fijación de la invención) y la secuencia de nucleótidos que codifica la segunda unidad de fijación al antígeno (por ejemplo, Fab monocatenario específico de CD3 o la cadena CD3 de longitud completa de la proteína de fijación de la invención) de la proteína de fijación a DLL3/CD3 puede insertarse en vectores distintos. En algunas formas de realización, las secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión. La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana de un anticuerpo contra DLL3 y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de un anticuerpo contra DLL3 puede insertarse en vectores separados. En algunas formas de realización, las secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión.

Los vectores convenientes son aquellos que codifican una secuencia de inmunoglobulina CH (pesada constante) humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados modificados por ingeniería genética para que cualquier unidad de fijación al antígeno, tal como una secuencia de Fab monocatenario o cualquier dominio variable de cadena pesada/liviana, se pueda insertar y expresar de manera sencilla, como se describió anteriormente. Para la cadena pesada del anticuerpo, puede ser, entre otros, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) u otras inmunoglobulinas, que incluyen variantes alélicas.

El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena DLL3 o CD3 de longitud completa de una célula huésped o de la cadena liviana/pesada de un anticuerpo anti-DLL3. El ADN que

codifica la cadena de la proteína se puede clonar en el vector para que el péptido de señal se ligue en el marco con el terminal amino del ADN de la cadena de longitud completa madura. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no es inmunoglobulina. De manera alternativa, la secuencia de ADN que codifica las cadenas de longitud completa de la proteína de la invención puede contener una secuencia de péptidos de señal.

Además de las secuencias de ADN que codifican las cadenas DLL3/CD3 o las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada/liviana de un anticuerpo contra DLL3, los vectores de expresión recombinante generalmente tienen secuencias reguladoras, opcionalmente secuencias reguladoras heterólogas, que incluyen promotores, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación y otros elementos de control de expresión que controlan la expresión de las cadenas de proteínas en una célula huésped. Los ejemplos de secuencias promotoras (ejemplificadas para la expresión de células de mamífero) son promotores y/o potenciadores derivados de CMV (tal como el promotor/potenciador de virus del simio 40 CMV (SV40)), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), poliovirus y promotores mamíferos fuertes, tales como promotores de actina e inmunoglobulina naturales. Los ejemplos de señales de poliadenilación son polyA de BGH, polyA tardía o temprana de SV40; de manera alternativa, se pueden usar 3'UTR de genes de inmunoglobulina, etc.

Los vectores de expresión recombinante también pueden tener secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena de longitud completa con la primera unidad de fijación al antígeno (Fab monocatenario y dominio Fc) o una porción de fijación al antígeno de esta y/o la cadena de longitud completa con la segunda unidad de fijación al antígeno (Fab monocatenario y dominio Fc) o una porción de fijación al antígeno de esta, y los vectores que comprenden esas moléculas de ADN, se pueden introducir en células huésped, por ejemplo, células bacterianas o células eucariotas superiores, por ejemplo, células de mamífero, de acuerdo con los métodos de transfección conocidos en el estado de la técnica, que incluyen transfección mediada por liposomas, transfección mediada por policationes, fusión de protoplastos, microinyecciones, precipitación de fosfato de calcio, electroporación o transferencia por vectores virales.

Preferentemente, las moléculas de ADN que codifican la cadena DLL3 y CD3

de la proteína de la invención están presentes en dos vectores de expresión que se cotransfectan en la célula huésped, preferentemente, una célula de mamífero.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en el estado de la técnica e incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NS0, células de SP2/0, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma humanas (por ejemplo, células de Hep G2 y A-549), células 3T3 o derivados/progenies de cualquiera de esas líneas celulares. Se pueden usar otras células de mamífero, que incluyen, entre otras, líneas celulares humanas, de ratón, rata, mono y roedor, u otras células eucariotas, que incluyen, entre otras, células de levadura, insectos y plantas, o células procariotas, tales como bacterias.

Las proteínas de la invención se producen mediante el cultivo de células huésped durante un período suficiente para permitir la expresión de la proteína en las células huésped. Preferentemente, las moléculas de proteína se recuperan del medio de cultivo como un polipéptido segregado o se pueden recuperar de los lisados de células huésped si, por ejemplo, se expresan sin una señal de secreción. Es necesario purificar las moléculas de proteína mediante los métodos de purificación de proteínas estándares utilizados para las proteínas recombinantes y las proteínas de células huésped de manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas de la proteína. A modo de ejemplo, los métodos de purificación del estado de la técnica útiles para obtener moléculas de proteína de la invención incluyen, como una primera etapa, la eliminación de células y/o residuos de partículas celulares del medio de cultivo o lisado. Luego, la proteína se purifica de las proteínas solubles contaminantes, polipéptidos y ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante fraccionamiento por inmunoafinidad o en columnas de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía Sephadex, cromatografía de gel de sílice o en una resina de intercambio catiónico. Como etapa final en el proceso para obtener una preparación de moléculas de proteína, la molécula de proteína purificada se puede secar, por ejemplo, liofilizar, como se describe más adelante para aplicaciones terapéuticas.

La presente invención se refiere a proteínas de fijación que tienen especificidades de fijación para al menos dos dianas diferentes. Con respecto a la presente invención, las moléculas de fijación derivan de anticuerpos. Las técnicas para fabricar moléculas de fijación incluyen, entre otras, coexpresión recombinante de dos cadenas de inmunoglobulina con diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello,

Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829 y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), y modificación por ingeniería genética “botón en ojal” (*knob-in-hole*) (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.731.168; Atwell et al, JMB, 1997, 270, 26-35). Las proteínas de fijación de la invención también se pueden fabricar mediante efectos de direccionamiento electrostático modificado por ingeniería genética para fabricar moléculas heterodiméricas Fc de anticuerpos (WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.676.980 y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina para producir proteínas biespecíficas (ver, por ejemplo, Kostelny et al., Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de “diacuerpo” para fabricar fragmentos de anticuerpo biespecífico (ver, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444- 6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de cadena simple (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber et al., /. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. /. Immunol. 147: 60 (1991).

Las composiciones (por ejemplo, proteínas de fijación multiespecífica y anticuerpos anti-DLL3) y los métodos descritos en la presente abarcan polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen las secuencias especificadas, o secuencias sustancialmente idénticas o similares a estas, por ejemplo, secuencias al menos 85 %, 90 %, 95 % idénticas o más a la secuencia especificada. En el contexto de una secuencia de aminoácidos, la expresión “sustancialmente idéntica” se usa en la presente para referirse a una primera secuencia de aminoácidos que contiene una cantidad suficiente o mínima de residuos de aminoácidos que son i) idénticos a, o ii) sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos alineados en una segunda secuencia de aminoácidos, de modo que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común de al menos alrededor de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia proporcionada en la presente. En el contexto de la secuencia de nucleótidos, la expresión “considerablemente idéntico” se usa en la presente para referirse a una primera secuencia de ácidos nucleicos que contiene una cantidad suficiente o mínima de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos alienados en una segunda secuencia de ácidos nucleicos, de manera que la primera y la segunda secuencia de nucleótidos codifiquen un polipéptido con actividad funcional común, o codifiquen un dominio de polipéptido estructural común o una actividad de polipéptido

funcional común, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que tienen al menos alrededor de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a una secuencia de referencia.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen, entre otras, las moléculas de ADN que codifican las secuencias de polipéptidos que se muestran en el listado de secuencias. Además, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que se hibridan a las moléculas de ADN que codifican las secuencias de polipéptidos que se muestran en el listado de secuencias en condiciones de fijación y lavado de alta rigurosidad, como se define en WO 2007/042309. Las moléculas preferidas (desde una perspectiva de mRNA) son aquellas que tienen al menos 75 % u 80 % (preferentemente, al menos 85 %, con mayor preferencia, al menos 90 % y, con máxima preferencia, al menos 95 %) de homología o identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN descritas en la presente. A modo de ejemplo, en vista de expresar los anticuerpos en células eucariotas, las secuencias de ADN que se muestran en el listado de secuencias fueron diseñadas para que coincidieran con el uso de codones en células eucariotas. Si se desea expresar los anticuerpos en *E. coli*, estas secuencias pueden cambiarse para que coincidan con el uso de codones de *E. coli*. Las variantes de moléculas de ADN de la invención se pueden construir de varias maneras diferentes, como se describe, por ejemplo, en WO 2007/042309.

Las proteínas de la invención pueden tener una secuencia del terminal N modificada, por ejemplo, una eliminación de uno o más de los aminoácidos del terminal N, o un intercambio de, por ejemplo, el primer aminoácido del terminal N (por ejemplo, glutamato a alanina) para optimizar la molécula para expresarla mediante el uso de determinados sistemas de expresión (tales como vectores o células huésped específicos), o para expresarla como cuerpos de inclusión o en forma soluble, o para que sea segregada en el medio o el espacio periplásmico, o para que esté contenida en la célula, o para obtener un producto más homogéneo. Los polipéptidos de la invención pueden tener una secuencia del terminal C modificada, tal como una alanina adicional, y/o intercambios adicionales de aminoácidos en la parte del terminal C o en otras posiciones definidas dentro de cualquiera de las regiones de marco, como se explica en, por ejemplo, WO2012/175741, WO2011/075861 o WO2013/024059, a fin de, por ejemplo, mejorar aún más la estabilidad o reducir la inmunogenicidad de estos polipéptidos.

Para evitar dudas, la totalidad de las formas de realización que se relacionan

con composiciones farmacéuticas, kits, métodos de tratamiento, uso médico, combinaciones, métodos de administración y dosis como se describen en la presente se contemplan para cualquiera de las proteínas de fijación multiespecífica descritas en la presente, ya sea solas o combinadas con otros agentes terapéuticos (como se especifica en mayor detalle más adelante).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN, DOSIS

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad (como se especifica con mayor detalle más adelante), en donde esas composiciones comprenden al menos una proteína de fijación multiespecífica de la invención. La invención también comprende métodos para tratar una enfermedad (como se especifica con mayor detalle más adelante) utilizando al menos una proteína multiespecífica de la invención o una composición farmacéutica como se establece a continuación, y también comprende la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicha enfermedad mediante el uso de la proteína de fijación de la invención o composición farmacéutica.

Las proteínas de fijación de la invención (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 y DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) y/o las composiciones que las comprenden pueden administrarse a un paciente que lo necesita por cualquier vía adecuada, en función de la composición o formulación farmacéutica específica que se desea usar. Por lo tanto, las proteínas de fijación de la invención y/o las composiciones que las comprenden se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intramuscular

(i.m.), intraperitoneal (i.p.), transdérmica, oral, sublingual (por ejemplo, en forma de un comprimido, pulverización o gota sublingual que se coloca debajo de la lengua y se adsorbe a través de las membranas mucosas a la red de capilares debajo de la lengua), (intra)nasal (por ejemplo, en forma de un pulverizador nasal y/o como un aerosol), tópica, mediante un supositorio, mediante inhalación, o mediante cualquier otra forma adecuada en una cantidad o dosis eficaz. La proteína de fijación puede administrarse mediante infusión, bolo o inyección. En formas de administración preferidas, la administración es mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea.

Las proteínas de fijación de la invención y/o las composiciones que las comprenden se administran en función de un régimen de tratamiento adecuado para tratar y/o aliviar la enfermedad, el trastorno o la afección que se debe tratar o aliviar. En general, el profesional clínico podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, en función de factores, tales como la enfermedad, el trastorno o la afección que se desea tratar o aliviar, la gravedad de la enfermedad, la gravedad de los síntomas de esta, las proteínas de fijación específicas de la invención que se desea usar, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica que se desea usar, la edad, el sexo, el peso, la dieta, el estado general del paciente y factores similares conocidos por el profesional clínico. En general, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de una o más proteínas de fijación de la invención, o de una o más composiciones que las comprenden, en cantidades o dosis terapéuticamente eficaces.

En general, para el tratamiento y/o alivio de enfermedades, trastornos y afecciones mencionados en la presente y en función de la enfermedad, el trastorno o la afección específica que se desea tratar, la potencia de la proteína de fijación específica de la invención que se desea usar, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica específica que se desea usar, las proteínas de fijación de la invención se administrarán, en general, en una cantidad de alrededor de 0,005 a 20,0 mg por kilogramo de peso corporal y dosis, preferentemente, de alrededor de 0,05 a 10,0 mg/kg/dosis, ya sea de forma continua (por ejemplo, mediante infusión) o, con mayor preferencia, como dosis únicas (por ejemplo, dos veces por semana, dosis semanales o mensuales; cf. a continuación), pero puede variar significativamente, en especial, en función de los parámetros mencionados anteriormente. Por lo tanto, en algunos casos puede ser suficiente usar menos que la dosis mínima indicada anteriormente, mientras que en otros casos, es posible que deba excederse el límite superior. Cuando se administran cantidades grandes, puede

ser conveniente dividir las en varias dosis más pequeñas y esparcir las a lo largo del día.

En función de la proteína de fijación específica de la invención y su farmacocinética específica y otras propiedades, se puede administrar diariamente, cada segundo, tercer, cuarto, quinto o sexto día, semanalmente, mensualmente y similares. Un régimen de administración puede incluir un tratamiento semanal a largo plazo. "A largo plazo" significa al menos dos semanas y, preferentemente, meses o años de duración.

La eficacia de la proteína multiespecífica de la invención, y de las composiciones que la comprenden, se puede evaluar mediante cualquier ensayo *in vitro*, ensayo celular, ensayo *in vivo* y/o modelo de animal adecuado conocido *per se*, o cualquier combinación de estos, en función de la enfermedad específica involucrada. Los ensayos y modelos de animales adecuados serán evidentes para la persona del oficio de nivel medio y, por ejemplo, incluyen los ensayos y modelos de animales usados en los ejemplos a continuación.

FORMULACIONES

Para el uso farmacéutico, las proteínas de fijación de la invención puede formularse como una preparación farmacéutica que comprende (i) al menos una proteína de fijación de la invención (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 y DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) y (ii) al menos un portador, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante aceptables desde el punto de vista

farmacéutico, y, (iii) opcionalmente, uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacológicamente activos adicionales. "Aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa que el material respectivo no muestra ningún efecto biológico o de otro tipo no deseado cuando se administra a un individuo y no interactúa de manera perjudicial con ninguno de los demás componentes de la composición farmacéutica (por ejemplo, el ingrediente farmacéuticamente activo) que lo contiene. Pueden encontrarse ejemplos específicos en manuales estándares, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, Mack Publishing Company, EE.UU. (1990). Por ejemplo, las proteínas de fijación de la invención se pueden formular y administrar de cualquier forma conocida *per se* para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales y otras proteínas farmacéuticamente activas. Por lo tanto, de acuerdo con una forma de realización adicional, la invención se refiere a una composición o preparación farmacéutica que contiene al menos una proteína de fijación de la invención y al menos un portador, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, y opcionalmente, una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales, en forma de formulaciones liofilizadas o secas, suspensiones o soluciones acuosas o no acuosas.

Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, tales como inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas o infusiones intravenosas, pueden ser soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo y que son adecuadas, opcionalmente después de una disolución o dilución adicional, para infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para tales preparaciones incluyen, por ejemplo, entre otros, agua estéril y amortiguadores y soluciones acuosas aceptables desde el punto de vista farmacéutico, tales como solución salina fisiológica amortiguada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank, aceites acuosos, glicerol, etanol, glicoles, tales como propilenglicol, así como también aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, así como mezclas de estos adecuadas.

Las soluciones de las proteínas de fijación de la invención también pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos, tales como agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, (sales de metales alcalinos de) ácido etilendiamintetraacético y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, amortiguadores o cloruro de sodio. Opcionalmente,

se pueden usar emulgentes y/o dispersantes. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o usando tensioactivos. También se pueden agregar otros agentes de retraso de la adsorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones se pueden colocar en viales de inyección, ampollas, botellas de infusión y similares.

En todos los casos, la forma de dosis final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en el solvente adecuado con diversos de los otros ingredientes mencionados anteriormente, según sea necesario, y la posterior esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y técnicas de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

En general, se prefieren soluciones o suspensiones acuosas. En general, las formulaciones adecuadas para proteínas terapéuticas, tales como las proteínas de fijación de la invención, son soluciones de proteínas amortiguadas, tales como soluciones que incluyen la proteína en una concentración adecuada (tal como de 0,001 a 400 mg/ml, preferentemente, de 0,005 a 200 mg/ml, con mayor preferencia, de 0,01 a 200 mg/ml, con mayor preferencia, de 1,0 - 100 mg/ml, tal como 1,0 mg/ml (administración i.v.) o 100 mg/ml (administración s.c.) y un amortiguador acuoso, tal como:

- solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4,
- otros amortiguadores de fosfato, pH 6,2 a 8,2,
- amortiguadores de acetato, pH 3,2 a 7,5, preferentemente, pH 4,8 a 5,5
- amortiguadores de histidina, pH 5,5 a 7,0,
- amortiguadores de succinato, pH 3,2 a 6,6, y
- amortiguadores de citrato, pH 2,1 a 6,2,

y, opcionalmente, sales (por ejemplo, NaCl) y/o azúcares (por ejemplo, sacarosa y trehalosa) y/u otros polialcoholes (por ejemplo, manitol y glicerol) para proporcionar isotonicidad a la solución.

Además, otros agentes, tales como un detergente, por ejemplo, 0,02 % de Tween-20 o Tween-80, se pueden incluir en estas soluciones. Las formulaciones para aplicación subcutánea pueden incluir concentraciones significativamente más altas del

anticuerpo de la invención, por ejemplo, hasta 100 mg/ml o incluso más de 100 mg/ml. Sin embargo, será evidente para la persona del oficio del nivel medio que los ingredientes y las cantidades de estos que se proporcionan anteriormente solo representan una opción preferida. Las alternativas y variaciones serán inmediatamente evidentes para la persona del oficio de nivel medio, o pueden ser concebidas fácilmente a partir de la descripción anterior. De manera opcional, las formulaciones descritas pueden proporcionarse como una formulación liofilizada, es decir, reconstituida en una solución, por ejemplo, en agua para inyección (WFI).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, una proteína de fijación de la invención se puede usar en combinación con un dispositivo útil para la administración de la proteína, tal como una jeringa, inyector tipo pluma, microbomba u otro dispositivo.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fijación de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de fijación de la invención para usar en un método para tratar el cáncer.

Otro aspecto de la invención es el uso de la proteína de fijación de la invención para preparar una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

Para evitar dudas, los aspectos de los usos médicos de la invención pueden comprender cualquier proteína de fijación específica de la invención descrita anteriormente (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 y DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1,

DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3).

Como se usa en la presente, el término "cáncer" incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados en malignos, independientemente del tipo o estadio histopatológico de la invasión.

Los ejemplos de tipos de cáncer cuyo crecimiento puede inhibirse mediante el uso de las proteínas de fijación multiespecífica descritas de la presente son cualquier tumor que expresa DLL3, preferentemente, SCLC, LCNEC, glioma, glioblastoma, melanoma, u otros tumores neuroendocrinos que expresan DLL3 (por ejemplo, cáncer de próstata neuroendocrino o cáncer de páncreas neuroendocrino, cáncer de vejiga de células pequeñas).

Los tumores neuroendocrinos (NET) surgen del sistema endocrino disperso y pueden producirse en diversas áreas del cuerpo. Tradicionalmente, los NET se clasificaron según su sitio anatómico de origen y, en general, son muy agresivos. Mayormente, se ubican en el tubo gastrointestinal, páncreas o pulmones (carcinoma pulmonar de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino de células grandes), así como en los riñones o en el aparato genitourinario (vejiga, próstata, ovario, cuello uterino, y endometrio). Los NET incluyen ciertos tumores del tubo gastrointestinal y células de islotes pancreáticos, ciertos tumores del timo y los pulmones, y carcinoma medular de las células parafoliculares de la glándula tiroidea.

Otros tipos de cáncer cuyo crecimiento puede inhibirse mediante el uso de las proteínas de fijación multiespecífica descritas en la presente son pseudotumores neuroendocrinos (pNET) que comparten determinadas características genotípicas, fenotípicas o bioquímicas con los tradicionalmente definidos tumores neuroendocrinos.

En algunas formas de realización, los siguientes tipos de cáncer, tumores y otras enfermedades proliferativas pueden tratarse con las proteínas de fijación multiespecífica de la invención: cáncer de pulmón; preferentemente, SCLC, NSCLC o LCNEC; de mama; de cuello uterino; de colon; colorrectal; de endometrio; de cabeza y cuello; de hígado (hepatoblastoma o carcinoma hepatocelular); de ovario; de páncreas; de próstata; de piel; gástrico; de testículo; de tiroides; suprarrenal; renal; de vejiga; de útero; de esófago; cáncer urotelial; tumor cerebral; linfoma; sarcoma de Ewing; y otros tumores neuroendocrinos y tumores de células pequeñas, redondas y azules.

En una forma de realización preferida de la invención, el cáncer es cáncer de

pulmón de células pequeñas (SCLC) o glioblastoma.

Todos los tipos de cáncer, tumores, neoplasias, etc., mencionados anteriormente que se caracterizan por su ubicación/origen específico en el cuerpo incluyen los tumores primarios y los tumores metastásicos derivados de estos.

Es posible que un paciente sea más propenso a responder al tratamiento con una proteína de fijación de la invención (como se describió anteriormente) si dicho paciente tiene un tipo de cáncer que se caracteriza por tener una alta expresión de DLL3. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el cáncer que se desea tratar con las proteínas de fijación de la invención es un tipo de cáncer con una alta expresión de DLL3, por ejemplo, en donde la expresión de DLL3 es mayor que la expresión promedio en células cancerosas de una población de pacientes que tienen el mismo tipo de cáncer que expresa DLL3.

Las proteínas de fijación de la invención se pueden usar en regímenes terapéuticos en el contexto de tratamientos de primera línea, segunda línea o cualquier línea adicional y tratamiento de mantenimiento.

Las proteínas de fijación de la invención se pueden usar para la prevención, el tratamiento a corto plazo o el tratamiento a largo plazo de las enfermedades mencionadas con anterioridad, opcionalmente, también en combinación con radioterapia, uno o más agentes terapéuticos y/o cirugía.

En formas de realización preferidas, la proteína de la invención se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con un antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PDL-1. Preferentemente, dicho anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 y PD1-5 como se describe en la presente (como se define según las secuencias en la Tabla A) y en WO2017/198741 (que se incorporan en la presente por referencia). Preferentemente, dicho anticuerpo anti-PDL-1 se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab, avelumab y durvalumab. En formas de realización de particular preferencia, la proteína de fijación de la invención (preferentemente cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2 o DLL3#3/CD3#3) se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con PD1-1. En formas de realización de particular preferencia, la proteína de fijación de la invención (preferentemente cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2 o DLL3#3/CD3#3) se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con PD1-2. En

formas de realización de particular preferencia, la proteína de fijación de la invención (preferentemente cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con PD1-3. En formas de realización de particular preferencia, la proteína de fijación de la invención (preferentemente cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con PD1-4. En formas de realización de particular preferencia, la proteína de fijación de la invención (preferentemente cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se usa para el tratamiento del cáncer en combinación con PD1-5.

Tabla A: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las secuencias de la cadena pesada y de la cadena liviana de los anticuerpos anti-PD1, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5.

Número de SEQ ID:	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:256	PD1-1 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQ APGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG
SEQ ID NO:257	PD1-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQ QKPGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:258	PD1-2 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQ APGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

Número de SEQ ID:	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG
SEQ ID NO:259	PD1-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWIYQ QKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:260	PD1-3 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKKSAMSWVRQ APGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSL YLQMNSLRADTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG
SEQ ID NO:261	PD1-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQ QKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:262	PD1-4 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKKSAMSWVRQ APGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSL YLQMNSLRADTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG
SEQ ID NO:263	PD1-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQ QKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:264	PD1-5 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKKSAMSWVRQ APGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSL

Número de SEQ ID:	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		YLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG
SEQ ID NO:265	PD1-5 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWIYQ QKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

De acuerdo estas formas de realización preferidas y cualquier otro de los aspectos de la presente invención, los anticuerpos PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 y PD1-5 son moléculas de anticuerpo como se divulgan en WO2017/198741, y se definen mediante las secuencias que se muestran en la Tabla A anterior.

En consecuencia, PD1-1 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:256, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:257;

PD1-2 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:258, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:259;

PD1-3 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:260, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:261;

PD1-4 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:262, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:263; y

PD1-5 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:264, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:265.

Lo anterior también incluye el uso de las proteínas de fijación de la invención en diversos métodos de tratamiento de las enfermedades anteriores mediante la

administración de una dosis terapéuticamente eficaz a un paciente que lo necesita, así como el uso de estas proteínas de fijación para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades así como composiciones farmacéuticas que incluyen las proteínas de fijación de la invención, así como la preparación y/o fabricación de medicamentos que incluyen las proteínas de fijación de la invención y similares.

COMBINACIONES CON OTRAS SUSTANCIAS ACTIVAS O TRATAMIENTOS

Una proteína de fijación de la invención puede usarse sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, en particular, en combinación con un agente quimioterapéutico, como agentes que dañan el ADN, un compuesto terapéuticamente activo que inhibe la angiogénesis, un inhibidor de las vías de transducción de señal, un inhibidor de EGFR, un inmunomodulador, un inhibidor del punto de control del sistema inmunitario, un inhibidor de los puntos de control mitóticos o un agente terapéutico hormonal.

El agente terapéutico adicional se puede administrar de manera simultánea con las preparaciones farmacéuticas de la presente, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración de la proteína de fijación a DLL3/CD3.

Las sustancias activas citostáticas y/o citotóxicas que se pueden administrar en combinación con las moléculas de fijación de la invención incluyen, entre otras, hormonas, análogos hormonales y antihormonas, inhibidores de aromatasa, agonistas y antagonistas de LHRH, inhibidores de los factores de crecimiento (factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento epidérmico humano (HER, por ejemplo, HER2, HER3, HER4) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)), los inhibidores son, por ejemplo, anticuerpos del factor de (anti)crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de (anti)crecimiento e inhibidores de la tirosina quinasa, por ejemplo, cetuximab, gefitinib, afatinib, nintedanib, imatinib, lapatinib, bosutinib y trastuzumab; antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos, tales como metotrexato, raltitrexed, análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, irinotecán, doxorubicina, TAS-102, capecitabina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina, tales como mercaptopurina, tioguanina, cladribina y pentostatina, citarabina (ara C), fludarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas); derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino,

carboplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfán, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, temozolomida, nitrosoureas, tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimitóticos (por ejemplo, alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vindesina, vinorelbina y vincristina; y taxanos, tales como paclitaxel, docetaxel); inhibidores de la angiogénesis, que incluyen bevacizumab, ramucirumab y aflibercept, inhibidores de la tubulina; inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de PARP, inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas, tales como etopósido y etopophos, tenipósido, amsacrina, topotecán, irinotecán, mitoxantrona), inhibidores de serina/treonina quinasa (por ejemplo, inhibidores de PDK 1, inhibidores de Raf, inhibidores de A-Raf, inhibidores de B-Raf, inhibidores de C-Raf, inhibidores de mTOR, inhibidores de mTORC1/2, inhibidores de PI3K, inhibidores de PI3K α , inhibidores de mTOR/PI3K duales, inhibidores de STK 33, inhibidores de AKT, inhibidores de PLK 1 (tal como volasertib), inhibidores de CDK, que incluyen inhibidores de CDK9, inhibidores de Aurora quinasa), inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, inhibidores de PTK2/FAK), inhibidores de la interacción proteína/proteína, inhibidores de MEK, inhibidores de ERK, inhibidores de FLT3, inhibidores de BRD4, inhibidores de IGF-1R, inhibidores de Bcl-xL, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de Bcl-2/Bcl-xL, inhibidores del receptor ErbB, inhibidores de BCR-ABL, inhibidores de ABL, inhibidores de Src, análogos de rapamicina (por ejemplo, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, sirolimus), inhibidores de la síntesis de andrógenos, inhibidores del receptor de andrógenos, inhibidores de DNMT, inhibidores de HDAC, inhibidores de ANG1/2, inhibidores de CYP17, productos radiofarmacéuticos, agentes inmunoterapéuticos, tales como inhibidores del punto de control del sistema inmunitario (por ejemplo, moléculas de fijación a CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 y TIM3 / inmunoglobulinas, tales como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab) y distintos agentes quimioterapéuticos, tales como amifostina, anagrelida, clodronat, filgrastim, interferón, interferón alfa, leucovorina, rituximab, procarbazona, levamisol, mesna, mitotano, pamidronato y porfímero; inhibidores del proteasoma (tales como Bortezomib); miméticos de Smac y BH3; agentes que restauran la funcionalidad de p53, que incluyen el antagonista de mdm2-p53; inhibidores de la vía de transducción de señal de Wnt/beta-catenina; y/o inhibidores de quinasa 9 dependientes de ciclina.

En particular, se prefieren los tratamientos con las moléculas de fijación de la invención en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos, que incluyen agentes anti-PD-1 y anti-PD-L1 y agentes anti LAG3: Los agentes anti-PD1 de ejemplo

incluyen, entre otros, anticuerpo anti-PD-1 PDR-001, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab y PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 y PD1-5 como se divulga en la presente (Tabla A) y en WO2017/198741. Los agentes anti- PDL-1 de ejemplo incluyen, entre otros, atezolizumab, avelumab y durvalumab. En formas de realización preferidas, la molécula de fijación de la invención (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se combina con PD1-1. En formas de realización preferidas, la molécula de fijación de la invención (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se combina con PD1-2. En formas de realización preferidas, la molécula de fijación de la invención (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se combina con PD1-3. En formas de realización preferidas, la molécula de fijación de la invención (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se combina con PD1-4. En formas de realización preferidas, la molécula de fijación de la invención (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) se combina con PD1-5.

En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional puede ser otro agente inmunoterapéutico, por ejemplo, moduladores de: TIM-1, TIM-3, TIM-4, PD-L2, LAG3, CTLA-4, Galectina 9, Galectina-1, CD69, CD113, GPR56, CD48, GARP, CAECAM-1, BTLA, TIGIT, CD160, LAIR1, 2B4, CEACAM, CD39, TGF β , IL-10, ligando Fas, ICOS, familia B7 (B7-1, B7-2, B7-H1 (PDL-1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) o B7-H6).

En algunas formas de realización, el agente inmunoterapéutico adicional es un miembro de la familia de moléculas TNF que se fijan a miembros de la familia del receptor de TNF cognado, que incluye CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-IBBL, CD137, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TLIA, TRAMP/DR3, EDAR, EDAI, XEDAR, EDA2, TNFR1, Linfotoxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, Linfotoxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un mimético SMAC. Los miméticos SMAC son compuestos que se fijan a inhibidores de las proteínas de la apoptosis (IAP) y tienen función inmunomoduladora y median la inducción de citocinas sistémicas (por ejemplo, IL-6, TNF α , *etc.*) y quimiocinas (por ejemplo, MCP-1) cuando se administran a animales o seres humanos. En algunas formas de realización, el mimético SMAC es (i) LCL161, es decir, Compuesto A en el Ejemplo 1 de WO 2008/016893 (página 28/29; [122]), o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico; (ii) el mimético SMAC denominado Debio-1143, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico; (iii) el mimético SMAC denominado birinapant, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico; (iv) el mimético SMAC denominado ASTX-660, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico; o (v) el mimético SMAC denominado CUDC-427, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

En algunas formas de realización, el agente inmunoterapéutico adicional se selecciona de (i) antagonistas de citocinas que inhiben la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF-B, VEGF; “citocinas inmunodepresoras”) y/o (ii) antagonistas de citocinas que estimulan la activación de linfocitos T y/o citocinas, tales como IL2, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, a fin de tratar enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

En algunas formas de realización, el agente inmunoterapéutico adicional es un agonista de una proteína que estimula la activación de linfocitos T, tal como CD28, GITRL, OX40L, CD27 y CD28H.

En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un virus oncolítico, que incluye, entre otros, un virus oncolítico derivado de virus *vaccinia*, adenovirus, (AdV), virus del herpes simple (HSV1 o HSV2), reovirus, virus mixoma (MYXV), poliovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus Maraba, virus de la varicela, virus del sarampión (MV) o virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

USOS DIAGNÓSTICOS

Las moléculas de anticuerpo anti-DLL3 de la invención son útiles en métodos de diagnóstico y pronóstico y pueden usarse para etiquetar, localizar o identificar células o tejidos que expresan DLL3 (por ejemplo, en ensayos ELISA, análisis de FACS, inmunohistología o similares) uniéndolos a una tintura, a un fármaco o a otra molécula con especificidad de fijación para un antígeno diferente. Por ejemplo, en tales métodos de diagnóstico se puede usar una etiqueta detectable que se puede conjugar con la molécula de anticuerpo anti-DLL3 de la invención o un reactivo

secundario que se fija de manera específica a la molécula de anticuerpo de la invención y se conjuga con una etiqueta detectable (por ejemplo, un anticuerpo secundario). En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos para DLL3 se fijan específicamente a DLL3 expresada en células, ya sea en el citoplasma y/o en la superficie celular, y se usan para localizar y/o identificar dichas células. En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos para DLL3 proporcionados en la presente se usan para identificar células o tejidos que expresan DLL3 (por ejemplo, células tumorales).

Los anticuerpos de la invención se seleccionan de modo que tengan un alto nivel de especificidad de fijación al epítipo y alta afinidad de fijación al polipéptido de DLL3. En general, cuanto mayor es la afinidad de fijación de un anticuerpo, más rigurosas serán las condiciones de lavado que se podrán realizar en un inmunoensayo para eliminar el material fijado de manera no específica sin eliminar el polipéptido diana.

Por lo tanto, en la presente también se proporcionan métodos para detectar DLL3 en una muestra biológica. Específicamente, en un aspecto la invención proporciona un método para detectar DLL3 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido, una muestra de tejido tumoral) que comprende:

- (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención; y
- (b) detectar el anticuerpo anti-DLL3 unido a DLL3.

Una muestra biológica puede obtenerse/aislarse de cualquier tejido (que incluye biopsias), célula o fluido corporal de un sujeto. En una forma de realización preferida, la muestra es una muestra de tejido, preferentemente, una muestra de tejido tumoral. En una forma de realización específica, la muestra es una muestra de tejido (tumoral) fijada, preferentemente, muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE), más preferentemente, una muestra de tejido tumoral fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE).

Por lo general, las muestras se dividen en varias porciones y se fijan a un medio para su análisis microscópico, tal como a un portaobjetos de microscopio. Si la muestra es una muestra de tejido, las diversas porciones pueden ser secciones tisulares. En algunas formas de realización, las secciones en serie se toman de muestras de tejido FFPE. En algunas formas de realización, las secciones en serie se toman de una pluralidad de sitios distintos de un bloque FFPE, a fin de capturar la heterogeneidad intrasección y la heterogeneidad intrabloque. En algunas formas de realización, las secciones en serie se toman de una pluralidad de muestras de biopsia

distintas tomadas de diferentes ubicaciones en un mismo tumor, a fin de capturar la heterogeneidad intrasección y la heterogeneidad intratumoral. Por lo general, las muestras de tejido se someten primero a desparafinación, recuperación de antígeno (por ejemplo, con proteinasa K) antes de la detección del antígeno. La muestra de tejido puede obtenerse/aislarse de una variedad de tejidos (por ejemplo, de una biopsia), específicamente, de tejidos obtenidos de tumores que incluyen, entre otros, SCLC, LCNEC, glioma, glioblastoma, melanoma, u otros tumores neuroendocrinos (por ejemplo, cáncer de próstata neuroendocrino o cáncer de páncreas neuroendocrino, cáncer de vejiga de células pequeñas).

Otros tumores de ejemplo de los que puede obtenerse/aislarse una muestra (de tejido) incluyen cáncer de pulmón; preferentemente, SCLC, NSCLC o LCNEC; cáncer de mama; de cuello uterino; de colon; colorrectal; de endometrio; de cabeza y cuello; de hígado (hepatoblastoma o carcinoma hepatocelular); de ovario; pancreático; de próstata; de piel; gástrico; de testículo; de tiroides; suprarrenal; renal; de vejiga; uterino; de esófago; cáncer urotelial; tumor cerebral; linfoma; sarcoma de Ewing; y otros tumores neuroendocrinos (que incluyen seudotumores endocrinos) y tumores de células pequeñas, redondas y azules.

Los métodos de ejemplo para la detección de DLL3 en una muestra son inmunocitoquímica (ICC), inmunohistoquímica (IHC), transferencia Western, citometría de flujo y/o ELISA.

En una forma de realización preferida, DLL3 se detecta mediante IHC.

En un aspecto específico de la invención, el método para detectar DLL3 en una muestra de tejido comprende

- a) poner en contacto una muestra de tejido (por ejemplo, un tejido tumoral, tal como SCLC, glioblastoma o tumores neuroendocrinos) en donde, preferentemente, dicha muestra de tejido es una muestra de tejido fijada (por ejemplo, fijada en formalina y embebida en parafina), con un anticuerpo de la invención (por ejemplo, DLL3#1 o DLL3#5)
- b) permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno en la muestra, y
- c) detectar el anticuerpo anti-DLL3 unido a DLL3.

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, el anticuerpo anti-DLL3 se detecta mediante una señal detectable, preferentemente, la señal detectable se genera mediante una etiqueta detectable. En una forma de realización preferida del método de la invención, la señal detectable se detecta en un ensayo IHC. En algunas formas de realización, la señal detectable se detecta en un ensayo ELISA,

mediante citometría de flujo o transferencia Western. En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para detectar DLL3 presente en la superficie celular de una célula (por ejemplo, una célula tumoral), por ejemplo, usando citometría de flujo. En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden usarse para detectar la presencia de DLL3 en una muestra de tejido (por ejemplo, muestra de tejido tumoral) usando ELISA, transferencia Western o IHC.

En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se conjuga directamente con el anticuerpo anti-DLL3 y, por ende, se deposita en la muestra después de la fijación del anticuerpo anti-DLL3 a DLL3; esto generalmente se denomina método de etiquetado directo. Los métodos de etiquetado directo se pueden cuantificar de manera más directa, pero a menudo carecen de sensibilidad. En otras formas de realización, el depósito de la etiqueta detectable se realiza mediante el uso de un reactivo de detección secundario que se fija de manera específica a la molécula de anticuerpo de la invención y se conjuga con una etiqueta detectable (por ejemplo, un anticuerpo secundario); esto generalmente se denomina método de etiquetado indirecto. En algunas formas de realización, el reactivo de detección secundario específico puede ser un anticuerpo secundario específico para especies, un anticuerpo antihapteno que se fija a un anticuerpo anti-DLL3 conjugado de hapteno, o una proteína de fijación a biotina unida a un anticuerpo anti-DLL3 biotinilado.

Los ejemplos particulares de etiquetas detectables que se pueden conjugar con el anticuerpo anti-DLL3 de la invención o con un reactivo de detección secundario, incluyen moléculas y materiales cromogénicos, fluorescentes, fosforescentes, luminiscentes y radiactivos, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra para proporcionar una diferencia detectable (tal como mediante la conversión de una sustancia incolora en una sustancia de color o viceversa, o la producción de un precipitado o el incremento de la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse mediante interacciones de fijación de anticuerpo-hapteno mediante conjugados de anticuerpo etiquetados de manera detectable, y moléculas y materiales paramagnéticos y magnéticos.

Por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser un enzima, tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, y β -lactamasa; un fluoróforo, tal como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas; nanopartículas, tales como puntos cuánticos (patentes estadounidenses N.^{os} 6.815.064, 6.682.596 y

6.649.138); quelatos metálicos, tales como quelatos de DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos, como Gd $<3+>$; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas.

Si la etiqueta detectable incluye una enzima, un sustrato detectable, tal como un cromógeno, un compuesto fluorogénico, o un compuesto luminogénico puede usarse en combinación con la enzima para generar una señal detectable. Los ejemplos particulares de compuestos cromogénicos incluyen diaminobencidina (DAB), 4-nitrofenilfosfato (pNPP), Fast Red, bromocloroindolil fosfato (BCIP), nitro azul de tetrazolio (NBT), BCIP/NBT, Fast Red, AP naranja, AP azul, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosida (X-Gal), metilumbeliferil- β -D-galactopiranosida (MU-Gal), p-nitrofenil- α -D-galactopiranosida (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida (X-Gluc), 3-amino-9-etil carbazol (AEC), fucsina, yodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

En algunos ejemplos, la porción detectable es un fluoróforo, que pertenece a diversas clases químicas habituales, que incluyen cumarinas, fluoresceínas (o derivados de fluoresceína y análogos), rodaminas, resorufinas, luminóforos y cianinas.

En otras formas de realización, la porción detectable es una molécula detectable por medio de un microscopio de campo claro, tal como colorantes que incluyen diaminobencidina (DAB), 4-(dimetilamino) azobencen-4'-sulfonamida (DABSYL), tetrametilrodamina (violeta DISCOVERY), N,N'-biscarboxipentil-5,5'-disulfonato-indo-dicarbocianina (Cy5) y Rodamina 110 (Rodamina).

Los haptenos son moléculas pequeñas que se fijan de manera específica a anticuerpo, aunque por sí mismos no generan una respuesta inmunitaria en un animal, y deben primero unirse a una molécula portadora más grande, tal como una proteína, para generar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de haptenos incluyen di-nitrofenilo, biotina, digoxigenina y fluoresceína.

En un aspecto también se proporcionan métodos para diagnosticar o identificar un tumor, como un tumor que expresa DLL3 (que expresa DLL3 en el citoplasma y/o la superficie celular), que comprenden detectar DLL3 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral) del sujeto usando los anticuerpos anti-DLL3 (por ejemplo, DLL3#1 o DLL3#5) de la invención (por ejemplo, mediante IHC en una muestra de tejido tumoral). En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para seleccionar un tratamiento dirigido contra DLL3 para un sujeto, que comprenden

detectar DLL3 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral) del sujeto usando los anticuerpos anti-DLL3 (por ejemplo, DLL3#1 o DLL3#5) de la invención (por ejemplo, mediante IHC en una muestra de tejido tumoral). En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para controlar el efecto terapéutico (por ejemplo, de un tratamiento dirigido contra DLL3) en un sujeto, que comprenden detectar DLL3 en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral) del sujeto usando los anticuerpos anti-DLL3 (por ejemplo, DLL3#1 o DLL3#5) de la invención (por ejemplo, mediante IHC en una muestra de tejido tumoral).

Las moléculas de anticuerpo anti-DLL3 de la invención también pueden usarse para actuar sobre células. En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos para DLL3 proporcionados en la presente se usan para administrar un fármaco o un agente citotóxico a una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral que expresa DLL3) uniendo dicho fármaco o agente citotóxico a dicho anticuerpo contra DLL3, y de esta manera, por ejemplo, inactivar dicha célula diana.

KITS

La invención también comprende kits que comprenden al menos una proteína de fijación multiespecífica de la invención (por ejemplo, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 y DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) y, opcionalmente, uno o más componentes distintos seleccionados del grupo que consiste en otros fármacos usados para el tratamiento de enfermedades y trastornos como se describió anteriormente.

En una forma de realización, el kit incluye una composición que contiene una

cantidad eficaz de una proteína de fijación de la invención en forma de dosis unitaria.

La invención también abarca kits que comprenden al menos una proteína de fijación multiespecífica de la invención y uno o más componentes distintos seleccionados del grupo que consiste en otros fármacos usados para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente.

En una forma de realización, el kit incluye una composición que contiene una cantidad eficaz de una proteína de fijación multiespecífica de la invención en forma de dosis unitaria (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3). En una forma de realización adicional, el kit incluye una composición que contiene una cantidad eficaz de una proteína de fijación multiespecífica de la invención en forma de dosis unitaria (preferentemente, cualquiera de DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) y una composición que contiene una cantidad eficaz de un antagonista de PD-1 en forma de dosis unitaria, tal como un anticuerpo anti PD-1, con mayor preferencia, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 y PD1-5 como se describe en la presente (por ejemplo, Tabla A) y en WO2017/198741.

En algunas formas de realización, el kit comprende un recipiente estéril que contiene la composición; los recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsos, bolsas, blísteres, u otra forma de recipiente conocida en el estado de la técnica. Tales recipientes pueden ser de plástico, vidrio, papel laminado, papel de aluminio u otros materiales adecuados para contener medicamentos. Además, el kit puede comprender la composición farmacéutica en un primer recipiente con la proteína de fijación de la invención en forma liofilizada y un segundo recipiente con un diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico (por ejemplo, agua estéril) para inyectar. El diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico se puede usar para la reconstitución o la disolución de la proteína de fijación.

Si se desea, una proteína de fijación multiespecífica de la invención se proporciona junto con instrucciones para administrar las proteínas de fijación multiespecífica a un sujeto que tiene cáncer. Generalmente, las instrucciones incluyen información acerca del uso de la composición para el tratamiento o la prevención de un tipo de cáncer. En otras formas de realización, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; cronograma de dosificación y administración para el tratamiento o la prevención del cáncer o síntomas de este;

precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar directamente impresas en el recipiente (si es que están presentes), o como una etiqueta aplicada en el recipiente, o como una hoja, panfleto, tarjeta o folleto plegable separado proporcionado en o con el recipiente.

Como se indica en la presente, la presente divulgación también proporciona métodos de diagnóstico para determinar la expresión de DLL3 en una muestra biológica. En un aspecto, la presente divulgación proporciona kits para realizar estos métodos, así como instrucciones para llevar a cabo los métodos de la presente divulgación, tales como recolectar tejido y/o realizar el ensayo de detección y/o analizar los resultados.

El kit comprende o, de manera alternativa, consiste esencialmente en, o consiste además en una composición del anticuerpo contra DLL3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) e instrucciones para su uso. Los kits son útiles para detectar la presencia de polipéptidos de DLL3 en una muestra biológica, por ejemplo, cualquier fluido corporal o muestras de biopsia de tejido corporal. En algunas formas de realización, el kit puede comprender: uno o más anticuerpos contra DLL3 capaces de fijarse a un polipéptido de DLL3 en una muestra (por ejemplo, anticuerpo anti-DLL3 DLL3#1 o DLL3#5); medios para detectar el polipéptido de DLL3 en la muestra; y, opcionalmente, medios para comparar la señal/cantidad de polipéptido de DLL3 en la muestra con un control. Uno o más de los anticuerpos anti-DLL3 de la invención se pueden etiquetar. Los componentes del kit (por ejemplo, reactivos) pueden envasarse en un recipiente adecuado. Adicionalmente, el kit puede comprender instrucciones para usar el kit para detectar los polipéptidos de DLL3. En determinadas formas de realización, el kit comprende un anticuerpo anti-DLL3 de la invención (un primer anticuerpo) y un segundo anticuerpo distinto que se fija al polipéptido de DLL3 o al primer anticuerpo y se conjuga con una etiqueta detectable.

El kit puede también comprender, por ejemplo, un agente amortiguador, un conservante o un agente estabilizante de proteína. Adicionalmente, el kit puede comprender componentes necesarios para la detección de la etiqueta detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. El kit puede también contener una muestra de control o una serie de muestras de control, que pueden someterse a ensayo y compararse con la muestra de prueba. Cada componente del kit puede incluirse en un recipiente individual, y todos los distintos recipientes pueden incluirse en un único envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos

realizados mediante el kit. Los kits de la presente divulgación pueden contener un producto escrito sobre o dentro del recipiente del kit. El producto escrito describe la forma de usar los reactivos contenidos en el kit.

De ser posible, estos componentes sugeridos del kit pueden envasarse de una forma habitual para el uso la persona del oficio de nivel medio. Por ejemplo, estos componentes del kit sugeridos se pueden proporcionar en una solución o como una dispersión líquida o similares.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no deberían interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Diseño y construcción de proteínas de fijación a CD3/DLL3

Los inventores de la presente desarrollaron proteínas de fijación multiespecífica que se fijan a DLL3 y CD3 y que inducen la activación de linfocitos T, lo que produce la lisis de células tumorales que expresan DLL3. El diseño molecular usado tiene una estructura de anticuerpo IgG y una estructura tipo IgG. Presenta tecnología botón en ojal en el Fc para la heterodimerización de los brazos botón (anti-DLL3) y ojal (anti-CD3). Además, la proteína de fijación tiene secuencias de péptidos flexibles entre la cadena liviana y la cadena pesada correspondiente en cada brazo. De este modo, la proteína de fijación comprende dos brazos, uno que se fija a CD3 y otro que se fija a DLL3, y cada brazo comprende un Fab monocatenario y una región Fc.

Preferentemente, la molécula de fijación es biespecífica y bivalente (monovalente para cada una de las dos dianas).

Preparación de los dominios de fijación que reconocen DLL3 y CD3 mediante recuperación génica V de alto rendimiento a partir de hibridomas y linfocitos B únicos cultivados.

Para obtener aglutinantes anti-DLL3, se cultivaron *in vitro* hibridomas o linfocitos B únicos derivados de ratones humanizados AlivaMab y de tipo silvestre inmunizados con DLL3 (Ablexis, San Francisco, CA, USA: AlivaMab transgenic mouse platform with human immunoglobulin loci). Los sobrenadantes se cribaron para determinar la reactividad contra DLL3 humana recombinante, mediante AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.), y contra células SHP77 (ATCC®, CRL-2195TM) que expresan DLL3 humana, mediante citometría de flujo.

Luego, se amplificaron los genes de VH y VL de inmunoglobulina (Ig) a partir de clones positivos identificados. Para aislar el ARN de hibridomas, alrededor de 2×10^6 células de clones únicos se convirtieron en pelets y se usaron como material fuente.

Para linfocitos B únicos, 100 a 500 células expandidas a partir de linfocitos B singularmente aislados se usaron como material fuente. El ARN se aisló mediante RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego, el cADN se sintetizó usando el kit de síntesis de cADN Smarter (Clontech, Mountain View, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para facilitar la síntesis de cADN, se usó oligodT para cebar la transcripción inversa de la totalidad del ARN mensajero seguido de “terminación 5’” con un oligonucleótido Smarter IIA. La amplificación subsiguiente de los fragmentos VH y VL se llevó a cabo mediante una amplificación de PCR en 2 etapas usando cebadores 5’ que actúan sobre la terminación Smarter IIA y cebadores 3’ que actúan sobre regiones de consenso en CH1. Brevemente, cada reacción PCR de 50 µl consiste en 20 µM de mezclas de cebadores directos e inversos, 25 µl de premezcla de ADN polimerasa PrimeStar Max (Clontech), 2 µl de cADN no purificado, y 21 µl de H₂O bidestilada. El programa de ciclos comienza a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos (94 °C durante 30 s, 50 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min), y termina a 72 °C durante 7 min. La segunda ronda de PCR se llevó a cabo con cebadores de segunda ronda de VL y VH que contienen extensiones complementarias de 15 bp que se “superponen” a las regiones respectivas en su vector de origen pTT5 respectivo (VH y VL). La PCR de segunda ronda se llevó a cabo con el siguiente programa: 94 °C durante 3 min; 35 ciclos (94 °C durante 30 s, 50 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min), y termina a 72 °C durante 7 min.

Se usó el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Estados Unidos de América) para la clonación direccional del gen de VL en un vector pTT5 hulgK y del gen de VH en un vector pTT5 hulgG1KO. Para facilitar la clonación In-Fusion® HD, los productos de PCR se purificaron y se trataron con potenciador de clonación antes de la clonación In-Fusion HD. La clonación y la transformación se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Clontech, Estados Unidos de América). Las miniprep de ADN se sometieron a secuenciación Sanger para confirmar que se obtuvieran fragmentos de genes V completos.

Con el uso de esta metodología, se prepararon pares de dominios de fijación que codifican los genes de VH y VL de Ig con especificidad para DLL3. Los anticuerpos recombinantes se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E37 con los plásmidos que codifican las cadenas liviana y pesada correspondientes.

Análisis confirmatorio de anticuerpos recombinantes

Los sobrenadantes que contienen anticuerpos recombinantes expresados se

sometieron a ensayo mediante citometría de flujo para fijación a las líneas celulares que expresan DLL3 humana o de *Macaca fascicularis*. Brevemente, las células se incubaron con sobrenadantes recombinantes, se lavaron, y los mAb unidos de los sobrenadantes se detectaron con APC anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch 109-136-098). Las relaciones de señal con respecto a fondo (S/B) se calcularon al dividir la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de la muestra por la del control de isotipo (regiones variables contra una proteína no relacionada y diferentes estructuras principales de la región constante).

Una resonancia de plasmones superficiales (SPR) en Biacore 400 se realizó a los sobrenadantes recombinantes. Brevemente, las IgG no optimizadas en los sobrenadantes HTP se capturaron mediante proteína A/G en la superficie del sensor durante 60 s a 10 ul/min. La fijación de 100 nM de DLL3 humana a las IgG capturadas se controló durante 180 s de asociación a 30 ul/min, y luego 120 s de disociación en el amortiguador HBS-EP. La regeneración de la superficie de proteína A/G se realizó con glicina pH 2,1 entre cada ciclo de fijación. En el presente ensayo se usaron los siguientes materiales: Reactivo de proteína: DLL3 humana expresada de manera recombinante. Amortiguador de corrida del sistema: HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA y 0,005 % v/v de polisorbato P20). Reactivo de captura: Proteína A/G G (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), con especificidad hacia todos los isotipos de IgG humana.

Los clones de interés (con $K_d < 300$ pM) se seleccionaron para formateo multiespecífico. Se generaron proteínas de fijación multiespecífica y luego se evaluaron en cribado mecánico y funcional (tal como fijación celular, citotoxicidad y activación de linfocitos T como se describe a continuación).

Humanización de aglutinantes DLL3 y CD3

Las secuencias de aglutinantes DLL3, como se describieron anteriormente, así como los aglutinantes CD3 descritos en la literatura (Pessano et al., EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337-44; Salmerón A et al., J Immunol. 1991 Nov 1;147(9):3047-52) se humanizaron y/u optimizaron. La optimización/humanización de secuencias de anticuerpos es un método para modificar por ingeniería genética anticuerpos producidos en especies no humanas (contra un antígeno/ epítipo específico) para usar en agentes terapéuticos que se parecen a anticuerpos producidos en seres humanos y, por lo tanto, eliminar los efectos adversos potenciales como la inmunogenicidad a la vez que se mantiene la especificidad. El enfoque de optimización/humanización de secuencias utilizado en la presente fue como se

describió en Singh et al, 2015 (Singh S et al., mAbs 2015: 7(4):778-91). Brevemente, se identificaron *in silico* las líneas germinales humanas de mayor coincidencia, y las variantes de optimización/humanización se evaluaron usando un método de cribado de fagos. Las secuencias finales de candidatos iniciales se seleccionaron en función de la fijación, puntuación humana en porcentaje y puntuación Epivax (herramienta predictiva *in silico* para inmunogenicidad potencial).

Construcción de proteínas biespecíficas que se fijan a DLL3 y CD3

Las regiones variables de los aglutinantes DLL3 y CD3 se clonaron en el vector de expresión pTT5 (National Research Council, Canadá), usando técnicas de biología molecular comunes para formar proteínas de fijación biespecíficas con una unidad de fijación específica a DLL3 que comprende un Fab monocatenario que se fija a DLL3 y una región Fc (unidad de fijación también denominada en la presente “brazo DLL3” o “cadena DLL3”) y una unidad de fijación específica a CD3 que comprende un Fab monocatenario que se fija a CD3 y una región Fc (unidad de fijación también denominada “brazo CD3” o “cadena CD3”). Las regiones Fc de los brazos DLL3 y CD3 incluyen mutaciones “botón” u “ojal” (Atwell et al, JMB, 1997, 270, 26-35) y las cadenas respectivas se denominan cadenas botón u ojal. Para el ensamblaje de ADN multifragmentado, se usaron los enfoques de ensamblaje Gibson y ensamblaje de ADN NEBuilder HiFi, de acuerdo con los protocolos del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). Las miniprep de ADN se secuenciaron.

Cada vector de expresión contiene elementos del promotor eucariótico para el gen que codifica la cadena (brazo/cadena DLL3 o CD3), es decir, el gen que codifica la secuencia de señal y la cadena liviana o pesada, un casete de expresión para un gen marcador de selección procariota, tal como ampicilina, y un origen de la replicación. Estos plásmidos de ADN se propagaron en cultivos y colonias de *E. coli* resistentes a la ampicilina y se purificaron.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de proteínas de fijación biespecíficas bivalentes que se fijan a DLL3 y CD3

Las moléculas biespecíficas que se fijan a DLL3 y CD3 se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E con los vectores pTT5 que tienen genes que codifican cadenas DLL3/CD3. Brevemente, las células CHO-E transfectadas que crecen en suspensión en un medio libre de suero se cultivaron en matraces de agitación a 140 rpm, 37 °C y 5 % de CO₂, y se mantuvieron en condiciones de crecimiento exponencial. El día de la transfección, las células se transfectaron químicamente con el plásmido de cadena botón y el plásmido de cadena ojal en una

relación de masa 1:3. Luego, se sembraron de 1 a 2×10^6 células/ml en 1 l del medio de expresión de CHO Gibco® FreeStyle™ (LifeTechnologies, NY, Estados Unidos de América). A continuación, las células se incubaron con agitación orbital durante 10 días con un único suministro de 200 ml de solución de alimentación comercial para permitir la expresión de las proteínas. Los títulos de anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo celular se determinaron usando un instrumento Octet® (Pall ForteBio, CA, EE. UU.) y puntas de biosensor de protA de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 recombinantes se purificaron de sobrenadantes de cultivo en un proceso de dos etapas: primero, mediante cromatografía de afinidad de proteína A mediante columna MabSelect™ (GE Healthcare); segundo, mediante cromatografía de intercambio catiónico mediante columna Poros 50 HS (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.). El material purificado en dos etapas se almacenó en amortiguador final de 50 mM de acetato de sodio y 100 mM de NaCl, pH 5,0; la pureza y nivel de heterogeneidad de las muestras se evaluaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica, espectrometría de masa y ultracentrifugación analítica. Las muestras que se usaron para evaluación funcional comprendían material purificado en dos etapas, con alrededor de 99 % de contenido de monómero.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos y SEQ ID NO de las secuencias CDR, VH, VL, scFab, brazo DLL3 y brazo CD3 de los constructos de anticuerpos/proteínas descritos en la presente:

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 1	DLL3#1 LCCDR1	RASQSVSSNFLV
SEQ ID NO:2	DLL3#1 LCCDR2	GASTRAS
SEQ ID NO:3	DLL3#1 LCCDR3	QQYGDSPYT
SEQ ID NO:4	DLL3#1 HCCDR1	GNTFTNYMH
SEQ ID NO:5	DLL3#1 HCCDR2	IIDPSVGSKSYAQKFLG
SEQ ID NO:6	DLL3#1 HCCDR3	AGKRFGESYFDY
SEQ ID NO:7	DLL3#2 LCCDR1	RASQGISNYLA
SEQ ID	DLL3#2	AASSLQS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:8	LCCDR2	
SEQ ID NO:9	DLL3#2 LCCDR3	LQHNSSPYT
SEQ ID NO:10	DLL3#2 HCCDR1	GYTFTSYMH
SEQ ID NO:11	DLL3#2 HCCDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
SEQ ID NO:12	DLL3#2 HCCDR3	GEAVGGNYYYGMDV
SEQ ID NO:13	DLL3#3 LCCDR1	RASQGISNYLV
SEQ ID NO:14	DLL3#3 LCCDR2	AVSSLYS
SEQ ID NO:15	DLL3#3 LCCDR3	LQHDSYPYT
SEQ ID NO:16	DLL3#3 HCCDR1	GYTFTSYVH
SEQ ID NO:17	DLL3#3 HCCDR2	IINPGGGTTSYAQKFLG
SEQ ID NO:18	DLL3#3 HCCDR3	GEAVTGNFYFYGMDV
SEQ ID NO:19	DLL3#4 LCCDR1	RASKSVSSFYGYSFMH
SEQ ID NO:20	DLL3#4 LCCDR2	LASNLES
SEQ ID NO:21	DLL3#4 LCCDR3	QHSRELPWT
SEQ ID NO:22	DLL3#4 HCCDR1	VYTFTSYFMY
SEQ ID NO:23	DLL3#4 HCCDR2	EISPTNGNSNLNERFKN
SEQ ID NO:24	DLL3#4 HCCDR3	GGDGYLDY
SEQ ID NO:25	DLL3#5 LCCDR1	QASQDISNYLN
SEQ ID NO:26	DLL3#5 LCCDR2	DASNLET
SEQ ID NO:27	DLL3#5 LCCDR3	QQYDNLPTWT
SEQ ID NO:28	DLL3#5 HCCDR1	GFTFTGYIYH
SEQ ID NO:29	DLL3#5 HCCDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG
SEQ ID NO:30	DLL3#5 HCCDR3	GWDY
SEQ ID NO:31	DLL3#6 LCCDR1	RASQDISNYFA
SEQ ID	DLL3#6	AASTLQS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:32	LCCDR2	
SEQ ID NO:33	DLL3#6 LCCDR3	QQLNSYPYT
SEQ ID NO:34	DLL3#6 HCCDR1	GGSISSYFWS
SEQ ID NO:35	DLL3#6 HCCDR2	RIYTSGSTNYNPSLNS
SEQ ID NO:36	DLL3#6 HCCDR3	RGDWGGFDI
SEQ ID NO:37	DLL3#1 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQK PGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEP EDFALYYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIK
SEQ ID NO:38	DLL3#1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYMHVVR QAPGPGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTST VFLDLYSLRSEDVAVYFCARAGKRFGESYFDYWGGTLV TVSS
SEQ ID NO:39	DLL3#2 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITTCRASQGISNYLAWFQQK PGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPE EDFATYYCLQHNSSPYTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO:40	DLL3#2 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVR QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARGEAVGGNYYYYGMDVW GQGTTVTVSS
SEQ ID NO:41	DLL3#3 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITTCRASQGISNYLVWFQQK PGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE EDFATYYCLQHDSYPYTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO:42	DLL3#3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHVVR QAPGQGLEWMVIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTSTN TVYMELKSLRSEDVAVYYCARGEAVTGNFYFGMDVWG QGTTVTVSS
SEQ ID NO:43	DLL3#4 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWY QQKPGQPPKLLIYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGGTKLEIK
SEQ ID NO:44	DLL3#4 VH	QVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTFTSYFMYWVKQ RPHGGLIEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTA YMLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGGGTTTLTVSS
SEQ ID NO:45	DLL3#5 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITVTCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPE EDIATYYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:46	DLL3#5 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSIN TAFMELSRLTSSDITAVYYCAAGWDYWGGGTLTVSS
SEQ ID NO:47	DLL3#6 VL	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVITTCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCQQLNSYPYTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO:48	DLL3#6 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYTSNSTNYPNSLNSRLTMSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGGGTVTVSS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:49	DLL3#1 scFab	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFALYYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYMHVWRQAPGPGLWMIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFLDLYSLRSEDVAVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC
SEQ ID NO:50	DLL3#2 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQKPGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYMHVWRQAPGQGLEWMIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGEAVGGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC
SEQ ID NO:51	DLL3#3 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYVHWVRQAPGQGLEWMIINPGGGTTSYKQFLGRVTMTTRDTSTNTVYMEKSLRSEDVAVYYCARGEAVTGNFYFYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC
SEQ ID NO:52	DLL3#4 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTSYFMYWVKRPGHGLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		TRGGDGYLDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:53	DLL3#5 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPTWTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSINTAFMELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:54	DLL3#6 scFab	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAGKLEWIGRIYTSNSTNYNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGDWGFDFIWGQGTVVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:55	CD3#1 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:56	CD3#1 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:57	CD3#1 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:58	CD3#1 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:59	CD3#1 HCCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO:60	CD3#1 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:61	CD3#2 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:62	CD3#2 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:63	CD3#2 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID	CD3#2	GFTFNTYAMN

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:64	HCCDR1	
SEQ ID NO:65	CD3#2 HCCDR2	RIRSKYINYATYYADSVKD
SEQ ID NO:66	CD3#2 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:67	CD3#1 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:68	CD3#1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW QGGLTVTVSA
SEQ ID NO:69	CD3#2 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:70	CD3#2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGGLTVTVSA
SEQ ID NO:71	CD3#1 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSES TEGKSSGSGSESSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:72	CD3#2 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSES TEGKSSGSGSESSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYIN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK SNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:73	Cadena DLL3#1	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSNFWYQQK PGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEP EDFALYYCQQYGDSPTYTFGGGTTLEIKRTVAAPSVFIFPP

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGNTFTNYYMHWVRQAPGPGLEWMGIIDPSVGSKSY AQKFLGRVTIARDTSTSTVFLDLYSLRSEDNAVYFCARAG KRFGESYFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK G FYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:74	Cadena DLL3#2	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQK PGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQ EDFATYYCLQHNSPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDNAVYYCARG EAVGGNYYYYGMDVWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PG
SEQ ID NO:75	Cadena DLL3#3	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQK PGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ EDFATYYCLQHDSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIINPGGGTTSYA QKFLGRVTMTRDTSTNTVYMEKSLRSEDNAVYYCARGE AVTGNFYFYGMDVWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:76	Cadena DLL3#4	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPQASVKLSCKASVYFTFSYFMYWVKQRPQHGLEWIGESPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:77	Cadena DLL3#5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPTWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDSSINTAFMELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:78	Cadena DLL3#6	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCT

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		VSGGSISSYFWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSL NSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGDWG GFDIWGQGT VVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:79	Cadena CD3#1	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAAL TLS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSES KS TEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQK SLSLSPG
SEQ ID NO:80	Cadena CD3#2	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAAL TLS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSES KS TEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYIN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSL

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		SLSPG
SEQ ID NO:81	Dominio Fc* (IgG1)	<u>DKTHTCPPCP</u> APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:82	Dominio Fc W (IgG1, LALA)	<u>DKTHTCPPCP</u> APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:83	Dominio Fc SAV (IgG1, RF/LALA)	<u>DKTHTCPPCP</u> APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPG
SEQ ID NO:84	Dominio Fc (IgG4Pro)	<u>ESKYGPPCPPCP</u> APAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGL
SEQ ID NO:85	Dominio Fc W (IgG4Pro)	<u>ESKYGPPCPPCP</u> APAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGL
SEQ ID NO:86	Dominio Fc SAV (IgG4Pro, RF)	<u>ESKYGPPCPPCP</u> APAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSLGL
SEQ ID NO:87	región constante de una cadena liviana kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:88	región constante de una cadena liviana lambda	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC
SEQ ID NO:89	Ligador	GGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:90	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
SEQ ID NO:91	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
SEQ ID NO:92	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
SEQ ID NO:93	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
SEQ ID NO:94	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGG
SEQ ID NO:95	Ligador	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GSGGGG
SEQ ID NO:96	CD3#3 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:97	CD3#3 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:98	CD3#3 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:99	CD3#3 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:100	CD3#3 HCCDR2	RIRSKYANYATYYADSVKD
SEQ ID NO:101	CD3#3 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:102	CD3#3 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:103	CD3#3 HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSA
SEQ ID NO:104	CD3#3 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS SHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEKSSGSGSESKS TEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYA NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:105	Cadena CD3#3	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTS GAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		PVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSESKS TEGKSSGSGSESSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYA NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPG
SEQ ID NO:133	DLL3#7 LCCDR1	RASQSVNSNFLA
SEQ ID NO:134	DLL3#7 LCCDR2	GTSSRAT
SEQ ID NO:135	DLL3#7 LCCDR3	QQYGSSPWT
SEQ ID NO:136	DLL3#7 HCCDR1	GFTFSSYGMF
SEQ ID NO:137	DLL3#7 HCCDR2	VIWLDGDEDEDYVDSVKG
SEQ ID NO:138	DLL3#7 HCCDR3	VLDY
SEQ ID NO:139	DLL3#8 LCCDR1	KSSQSVLDTSNNKNYLV
SEQ ID NO:140	DLL3#8 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:141	DLL3#8 LCCDR3	QHYYNSPYT
SEQ ID NO:142	DLL3#8 HCCDR1	GYTFTDYMH
SEQ ID NO:143	DLL3#8 HCCDR2	WINPNSGGTNYEQKFQG
SEQ ID NO:144	DLL3#8 HCCDR3	DAVVIPMDY
SEQ ID NO:145	DLL3#9 LCCDR1	RASQSISRSYLA
SEQ ID NO:146	DLL3#9 LCCDR2	GASSRAT
SEQ ID NO:147	DLL3#9 LCCDR3	QQYGTSPIT
SEQ ID NO:148	DLL3#9 HCCDR1	GGSISSYYWS
SEQ ID	DLL3#9	YRYYSNNTNYPNPSLKS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:149	HCCDR2	
SEQ ID NO:150	DLL3#9 HCCDR3	IGVAGFYFDY
SEQ ID NO:151	DLL3#10 LCCDR1	RASQSLNSIFLA
SEQ ID NO:152	DLL3#10 LCCDR2	GASSRAT
SEQ ID NO:153	DLL3#10 LCCDR3	QQYGGSMNT
SEQ ID NO:154	DLL3#10 HCCDR1	GYTFTGYMH
SEQ ID NO:155	DLL3#10 HCCDR2	WINPNSGGTIFAQRFQG
SEQ ID NO:156	DLL3#10 HCCDR3	DFGDTVGNAFDI
SEQ ID NO:157	DLL3#11 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:158	DLL3#11 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:159	DLL3#11 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:160	DLL3#11 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:161	DLL3#11 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:162	DLL3#11 HCCDR3	LYYYGSHYLD
SEQ ID NO:163	DLL3#12 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:164	DLL3#12 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:165	DLL3#12 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:166	DLL3#12 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:167	DLL3#12 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:168	DLL3#12 HCCDR3	LYYYGSYYLD
SEQ ID NO:169	DLL3#13 LCCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:170	DLL3#13 LCCDR2	KVSNRFS
SEQ ID NO:171	DLL3#13 LCCDR3	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:172	DLL3#13 HCCDR1	GYTFTNYGVT
SEQ ID	DLL3#13	WINTYSGAPTYADDFNG

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:173	HCCDR2	
SEQ ID NO:174	DLL3#13 HCCDR3	LDDYDLYYFDY
SEQ ID NO:175	DLL3#14 LCCDR1	KASQSVDDYDGDSYMN
SEQ ID NO:176	DLL3#14 LCCDR2	AASTLES
SEQ ID NO:177	DLL3#14 LCCDR3	QQSDEDPWT
SEQ ID NO:178	DLL3#14 HCCDR1	GYTFTDYIYH
SEQ ID NO:179	DLL3#14 HCCDR2	YIYPGNSYTAYNQKFKD
SEQ ID NO:180	DLL3#14 HCCDR3	SGGSAMDY
SEQ ID NO:181	DLL3#15 LCCDR1	KASQSVDDYDGDSYLN
SEQ ID NO:182	DLL3#15 LCCDR2	AASNLES
SEQ ID NO:183	DLL3#15 LCCDR3	QQSSEDPRT
SEQ ID NO:184	DLL3#15 HCCDR1	GYTFTNYGMN
SEQ ID NO:185	DLL3#15 HCCDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
SEQ ID NO:186	DLL3#15 HCCDR3	FHFSSNGDAMDN
SEQ ID NO:187	DLL3#16 LCCDR1	RASQSVSDWLA
SEQ ID NO:188	DLL3#16 LCCDR2	RASSLES
SEQ ID NO:189	DLL3#16 LCCDR3	QLYNSYSPT
SEQ ID NO:190	DLL3#16 HCCDR1	GFTFSSYWMT
SEQ ID NO:191	DLL3#16 HCCDR2	NIKEDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:192	DLL3#16 HCCDR3	DWGYFDY
SEQ ID NO:193	DLL3#17 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:194	DLL3#17 LCCDR2	NTNSLED
SEQ ID NO:195	DLL3#17 LCCDR3	KQAYDFPLT
SEQ ID NO:196	DLL3#17 HCCDR1	GYTFISYYIH
SEQ ID	DLL3#17	WIYPGDGSTNNNEKFKG

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
NO:197	HCCDR2	
SEQ ID NO:198	DLL3#17 HCCDR3	GEGNAMDD
SEQ ID NO:199	DLL3#18 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:200	DLL3#18 LCCDR2	NANSLED
SEQ ID NO:201	DLL3#18 LCCDR3	KQAYDVPLT
SEQ ID NO:202	DLL3#18 HCCDR1	GYTFTAYFIH
SEQ ID NO:203	DLL3#18 HCCDR2	YIDPFNDDTNYNVKFKG
SEQ ID NO:204	DLL3#18 HCCDR3	GTSATLDY
SEQ ID NO:205	DLL3#7 VL	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQK PGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIR
SEQ ID NO:206	DLL3#7 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVR QAPGKGLEWVAVIWLDGDDDEDYVDSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNLSLRVDDTAIYYCARVLDYWGGGTLTVSS
SEQ ID NO:207	DLL3#8 VL	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNKYNLV WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:208	DLL3#8 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWWVR QAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELNRLRSDDTAVYYCTRDAVVIPMDYWGGGTLVT VSS
SEQ ID NO:209	DLL3#9 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISRSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO:210	DLL3#9 VH	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ TPGKGLDWIGYRYYSGNTNYPNLSKSRVTISLDMNNQF SLKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGGGTLTVSS
SEQ ID NO:211	DLL3#10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQK PGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:212	DLL3#10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWWVR LAPGQGLEWMGWINPNSGGTIFAQRFQGRVTMTRDTSIS TVYMDLNRLRSDDTAVYYCARDGDTVGNAFDIWGGGT MVTVSS
SEQ ID NO:213	DLL3#11 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGT SPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAD AATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:214	DLL3#11 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVK QRPQGQLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFNKATLTADTSSSK AYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGGGTTLTV SS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:215	DLL3#12 VL	QVVL TQSPA IMSASPGEKV TITCSASSSV TYIHW FQQNPG TSPKLWIYRTSYLASGV PARFSGSGSGTSYSLTISRMEAE DAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:216	DLL3#12 VH	QVQLQQPGA E FVQPGSSVKMSCKASGYAFSDY WITWVK QRPQGQLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTSSST AYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYG SYYLDTWGQGTTLT VSS
SEQ ID NO:217	DLL3#13 VL	DVLTQTPLSLPVS LGDQA AISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKVL IYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLG VYYCFQGSHPYTFGGG TKLEIK
SEQ ID NO:218	DLL3#13 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF TNYGVTWVKQA PGKGLKWMGWINTYSGAPTYADDFNGRFALSLETSASTA YLQINN LKNEDTATYFCARLDDYDLYYFDYWGGGTALT VSS
SEQ ID NO:219	DLL3#14 VL	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSV D YDGD SYMNW YQQKPGQPPKLLIYAAS TLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGG TKLEIK
SEQ ID NO:220	DLL3#14 VH	QIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYTFDYYIHW MKQRP GQGLEWIGYIYPGNSY TAYNQKF KD KATLTADNPSS TAY MQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGSTVTVSS
SEQ ID NO:221	DLL3#15 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV D YDGD SYLNWY YQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSSEDPRTFGGG TKLEIK
SEQ ID NO:222	DLL3#15 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF TNYGMNWVKQ APGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSAST AYLQINN LKNEDMATYFCTKFHFSSNGDAMD NWGQGST VTVSS
SEQ ID NO:223	DLL3#16 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQQK PGKAPKFLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP ADFATYYCQLYNSYSPTFGQG TKVEIK
SEQ ID NO:224	DLL3#16 VH	EVHLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM TWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLR AEDTALYYCARDWGYFDYWGGGT LTVSS
SEQ ID NO:225	DLL3#17 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQ PEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:226	DLL3#17 VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYYIHWVKQR PGQGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTA YMLSSLTSEDSAVYFCARGE GNAMDDWGQGSTVTVSS
SEQ ID NO:227	DLL3#18 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINNMQ PEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:228	DLL3#18 VH	QVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTF TAYFIHWVKQ KPGQGLEWIGYIDPFND TNYNVKFKGKATLTSDTSSSIA YMELSSLTSEDS SFYYCARGTSATLDYWG HGTTLT VSS
SEQ ID NO:229	DLL3#7 scFab	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSN FLAWYQQK PGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		EDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAVIWLDDGDEEDY VDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRVDDTAIYYCARVL DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:230	DLL3#8 scFab	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLV WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTDYYMHVVRQAPGQGLEWMGWIN PNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDT AVYYCTRDAVVIPMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:231	DLL3#9 scFab	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VSGGSISSYYWSWIRQTPGKGLDWIGYRYYSNTNYPNPS LKSRVTISLDMSSNQFSLKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGF YFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:232	DLL3#10 scFab	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQK PGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEG KSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTI FAQRFQGRVTMTRDTSISTVYMDLNRLRSDDTAVYYCAR DFGDTVGNAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSC

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:233	DLL3#11 scFab	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPQT SPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAED AATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGAELVQPGSSVKMSC KASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPGSGSTKSS EKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYY GSHYLDTWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSC
SEQ ID NO:234	DLL3#12 scFab	QVVLQSPAISASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPQT TSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAED DAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGAELVQPGSSVKMS CKASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPGSGSTKS SEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYY YGSYYLDTWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSC
SEQ ID NO:235	DLL3#13 scFab	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPYTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETV KISCKASGYFTFTNYGVTWVKQAPGKGLKWMGWINTYSG APTYADDFNGRFALSLETSASTAYLQINNLKNEDETATYFC ARLDDYDLYYFDYWGGGTALTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSC
SEQ ID NO:236	DLL3#14 scFab	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVSDYDGDSYMNW YQKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTLNIIH PVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGGTKEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELVKPGVKI SCKASGYFTFDYYIHWKQRPQGQGLEWIGYIYPGNSYTA YNQKFKDKATLTADNPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		SGGSAMDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
SEQ ID NO:237	DLL3#15 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVSDYDGD SYLNWY QQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSSEDPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGE PTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCT KFHFSSNGDAMDNDWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
SEQ ID NO:238	DLL3#16 scFab	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQQK PGKAPKFLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ ADFATYYCQLYNSYSPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSEVHVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLR AEDTALYYCARD WGYFDYWGQGTSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSC
SEQ ID NO:239	DLL3#17 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQ PEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCK ASGYTFISYYIHVVKQRPQGQGLEWIGWIYPGDGSTNNNE KFKGKTTLTADKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARGE GNAMDDWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS C
SEQ ID NO:240	DLL3#18 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINNMQ PEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSC EASGYTFTAYFIHWVKQKPGQGLEWIGYIDPFNDNTNINV KFKGKATLTSDTSSSIAYMELSSLTSEDSSFYYCARGTSA TLDYWGHGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC
SEQ ID NO:241	Cadena DLL3#7	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQK PGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAVIWLDDDEDY VDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRVDDTAIYYCARVL DYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:242	Cadena DLL3#8	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLV WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGKTLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSE SKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWIN PNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDT AVYYCTRDAVVIPMDYWGGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
SEQ ID NO:243	Cadena DLL3#9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSSISRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGGSISSYYWSWIRQTPGKGLDWIGYRYYSNTNYPNPS LKSRVTISLDMNSNNQFSLKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGF YFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:244	Cadena DLL3#10	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQK PGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEG KSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYMHVWRLAPGQGLEWMGWINPNSGGTI FAQRFQGRVTMTRDTSISTVYMDLNRRLSDDTAVYYCAR DFGDTVGNAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:245	Cadena DLL3#11	QIVLTQSPAISASPGKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGT SPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAD AATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGAELVQPGSSVKMSC KASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPGSGSTKSS EKFKNAKTLTADTSSSKAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYY GSHYLDTWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPE KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYF

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:246	Cadena DLL3#12	QVVL TQSPA IMSASPGEKV TITCSASSSVTYIHW FQQNPG TSPKLWIYRTSYLASGV PARFSGSGSGTSYSLTISRMEAE DAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQPGA E FVQPGSSVKMS CKASGYAFSDYWITWVKQRPGQGLEWIGDIYPGSGSTKS SEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYY YGSYYLDTWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:247	Cadena DLL3#13	DVLM TQTPLSLPVS LGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKVL IYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLG VYYCFQGSHPYTFGGGT KLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETV KISCKASGYTFTNYGVTWVKQAPGKGLKWMGWINTYSG APTYADDFNGRFALSLETSASTAYLQINN LKNEDTATYFC ARLDDYDLYYFDYWGGGTALTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
SEQ ID NO:248	Cadena DLL3#14	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSV DYGDSYMNW YQKPGQPPKLLIYA ASTLES GIPARFSGSGSGTDFTLNHI PVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGGT KLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELVKPGVKI SCKASGYTFTDYYIHW MKQRPGQGLEWIGYIYPGNSYTA YNQKFKDKATLTADNPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		SGGSAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:249	Cadena DLL3#15	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVSDYDGD SYLNWY QQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSSEDPRTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGE PTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCT KFHFSSNGDAMDNDWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
SEQ ID NO:250	Cadena DLL3#16	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQQK PGKAPKFLIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ ADFATYYCQLYNSYSPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSEVHLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARD WGYFDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:251	Cadena DLL3#17	DIQMTQSPASLAASVGETVITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQ

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
		PEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCK ASGYTFISYYIHVWKQRPQGQLEWIGWIYPGDGSTNNNE KFKGKTTLTADKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARGEEN AMDDWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:252	Cadena DLL3#18	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQ GKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINMQ PEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGK SSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGPDVLPKPGASVKMSC EASGYTFTAYFIHWVKQKPGQLEWIGYIDPFNDTNYNV KFKGKATLTSDTSSSIAYMELSSLTSEDSFFYYCARGTSA TLDYWGHGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:253	región constante de la cadena pesada CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:254	HC de IgG2a de ratón	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWV NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGK EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEP VLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK

Número de SEQ ID	Breve descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:255	LC kappa de ratón	RADAAPT ^{VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY} PKDINVK WKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLT ^{LT} KDEY ERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

*La secuencia subrayada indica la región bisagra

Ejemplo 3: Producción de proteínas recombinantes

• DLL3-His humana

Se generó una línea celular para producir DLL3-His humana usando células HEK-293 (Thermo Fisher), el sistema lentiviral Lenti-X (Clontech), y plásmido que codifica DLL3-His humana (DLL3 humana N.º de acceso Q9NYJ7 huDLL3-His: SEQ ID NO:106). Para la expresión, las células se cultivaron y se expandieron a 37 °C, 5 % de CO₂, y se agitaron a 140 rpm. El día 0 de la expresión, las células se convirtieron en pelets y se volvieron a suspender en medio Expi 293. El día 3 de la expresión, el sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó mediante peleteo de las células durante 40 minutos a 4700 rpm. Se agregaron inhibidores de proteasa a la biomasa antes de la purificación. La expresión se confirmó mediante transferencia western. El sobrenadante de cultivo condicionado se ajustó con 0,5 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, 10 mM de imidazol. La purificación se llevó a cabo en una columna HisTrap Ni Excel y amortiguador A: 50 mM de MES, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, pH 6,5. La proteína de interés se eluyó en amortiguador A complementado con 0,5 M de imidazol, pH 8,5, usando un gradiente de elución de 20 mM de imidazol a 500 mM de imidazol. Las fracciones agrupadas se dializaron en amortiguador: 50 mM de MES, 50 mM de NaCl, 1 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, 0,2 M de arginina, 3 % de glicerol, pH 6,5. El material purificado se calificó mediante espectrometría de masa y ultracentrifugación analítica.

• DLL3-His de *Macaca fascicularis*

Se generó una línea celular para producir DLL3-His de *Macaca fascicularis* usando células HEK-293 (Thermo Fisher), el sistema lentiviral Lenti-X (Clontech), y plásmido que codifica DLL3-His de *Macaca fascicularis* (DLL3 de *Macaca fascicularis* N.º de acceso Q9NYJ7 huDLL3-His: XM_005589196.1 (RefSeq); DLL3-His de *Macaca fascicularis*: SEQ ID NO:107). Para la expresión, las células se cultivaron y se expandieron a 37 °C, 5 % de CO₂, y se agitaron a 140 rpm. El día 0 de la expresión, las células se convirtieron en pelets y se volvieron a suspender en medio Expi 293. El día 3 de la expresión, el sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó mediante

peleteo de las células durante 40 minutos a 4700 rpm. Se agregaron inhibidores de proteasa a la biomasa antes de la purificación. La expresión se confirmó mediante transferencia western. El sobrenadante de cultivo condicionado se ajustó con 0,5 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, 10 mM de imidazol. La purificación se llevó a cabo en una columna HisTrap Ni Excel y amortiguador A: 50 mM de MES, 50 mM de NaCl, 0,5 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, pH 6,5. La proteína de interés se eluyó en amortiguador A complementado con 0,5 M de imidazol, pH 8,5, usando un gradiente de elución de 20 mM de imidazol a 500 mM de imidazol. Las fracciones agrupadas se dializaron en amortiguador: 50 mM de MES, 50 mM de NaCl, 1 mM de TCEP, 0,02 % de CHAPS, 0,2 M de arginina, 3 % de glicerol, pH 6,5. El material purificado se calificó mediante espectrometría de masa y ultracentrifugación analítica.

- **CD3 E+G HuFc-6xHis humana (*E+G indica subunidades E* y *γ*)**

Se generó una línea celular para producir CD3 E+G HuFc-6xHis humana usando células HEK-293 (Thermo Fisher), el sistema lentiviral Lenti-X (Clontech), y plásmido que codifica CD3 E+G HuFc-6xHis humana (CD3E humano N.º de acceso: P07766; CD3E+G-HuFc-His humana: SEQ ID NO:108). Para la expresión, las células se cultivaron y se expandieron en medio Freestyle 293, a 37 °C, se humedecieron en entorno de 8 % de CO₂, y se agitaron a 135 rpm. El sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó el día 6 mediante centrifugación durante 30 minutos a 9300xg. La expresión se controló mediante SDS-PAGE y transferencia Western. El sobrenadante de cultivo condicionado se ajustó con 0,2 M de sacarosa, 5 % de glicerol, 0,01 % de CHAPS y 10 mM de imidazol. El pH luego se ajustó a 7,2. La purificación se llevó a cabo en un proceso de dos etapas: purificación de afinidad usando resina Ni/NTA (incubación durante la noche a 4 °C, y elución con 250 mM de imidazol); luego, cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 en amortiguador PBS de destino con 0,2 M de sacarosa, 5 % de glicerol, 0,01 % de CHAPS, 1 mM de TCEP, pH 7,2. El material agrupado se concentró usando un dispositivo de centrifugación Vivacell 100 con membrana PES 10K MWCO antes del análisis final y almacenamiento. El material purificado se calificó mediante espectrometría de masa y ultracentrifugación analítica.

- **CD3 E+G HuFc-6xHis de *Macaca fascicularis* (*E+G indica subunidades E* y *γ*)**

Se generó una línea celular para producir CD3 E+G HuFc-6xHis de *Macaca fascicularis* usando células HEK-293 (Thermo Fisher), el sistema lentiviral Lenti-X (Clontech), y plásmido que codifica CD3 E+G HuFc-6xHis de *Macaca fascicularis* (CD3E de *Macaca fascicularis* N.º de acceso: Q95LI5 <, CD3 E+G huFc-His de

Macaca fascicularis: SEQ ID NO:109). Para la expresión, las células se cultivaron y se expandieron en medio Freestyle 293, a 37 °C, se humedecieron en entorno de 8 % de CO₂, y se agitaron a 135 rpm. El sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó el día 6 mediante centrifugación durante 30 minutos a 9300xg. La expresión se controló mediante SDS-PAGE y transferencia Western. El sobrenadante de cultivo condicionado se ajustó con 0,2 M de sacarosa, 5 % de glicerol, 0,01 % de CHAPS y 10 mM de imidazol. El pH luego se ajustó a 7,2. La purificación se llevó a cabo en un proceso de dos etapas: purificación de afinidad usando resina Ni/NTA (incubación durante la noche a 4 °C, y elución con 250 mM de imidazol); luego, cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 en amortiguador PBS de destino con 0,2 M de sacarosa, 5 % de glicerol, 0,01 % de CHAPS, 1 mM de TCEP, pH 7,2. El material agrupado se concentró usando un dispositivo de centrifugación Vivacell 100 con membrana PES 10K MWCO antes del análisis final y almacenamiento. El material purificado se calificó mediante espectrometría de masa y ultracentrifugación analítica.

Ejemplo 4A: Determinación de afinidades a subunidades DLL3 y CD3 $\epsilon\gamma$ recombinantes y reactividad cruzada interespecie según SPR

La afinidad de fijación de constructos biespecíficos para DLL3/CD3 purificados para DLL3-ECD humano y de *Macaca fascicularis* recombinantes y proteínas de fusión Fc de subunidades de CD3 $\epsilon\gamma$ humana y de *Macaca fascicularis* se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), usando un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). El amortiguador de corrida y todas las diluciones (excepto cuando indique) se realizaron en PBS-T-EDTA. El chip sensor de GLM (Bio-Rad) se normalizó y se preestableció conforme a las recomendaciones del fabricante. El chip sensor se activó con una mezcla equitativa de EDC/s-NHS en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 μ l/min y se inmovilizó con una proteína A/G (20 μ g/ml en 10 mM de acetato pH 4,5) en dirección horizontal durante 300 segundos a una velocidad de flujo de 30 μ l/min, lo que produjo ~ 5000 RU de la proteína A/G en la superficie. El chip sensor se desactivó con etanolamina HCl 1 M en dirección horizontal durante 300 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min. El chip sensor se estabilizó con 18 s de ácido fosfórico al 0,85 % a una velocidad de flujo de 100 μ l/min 3 veces horizontalmente y 3 veces verticalmente.

Para la determinación cinética de fijación a DLL3, las moléculas biespecíficas se capturaron de manera individual en la superficie de la proteína A/G verticalmente durante 250 s a una velocidad de flujo de 25 μ l/min. El valor inicial se estabilizó mediante inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 40 μ l/min

horizontalmente. El analito (hu DLL3 o cy DLL3) se inyectó horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 600 s a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una disociación durante 2700 s. La concentración de analito era 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM y 1,25 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de solución de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ una vez horizontalmente y una vez verticalmente.

Para la determinación cinética de fijación a CD3, se inmovilizó hu CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc y cy CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc (disuelto en pH 4,5 de acetato) directamente en la superficie del sensor a través de acoplamiento de amina durante 140 s a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ verticalmente. El valor inicial se estabilizó mediante inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ horizontalmente. El analito (la molécula biespecífica) se inyectó horizontalmente en el constructo CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc capturado durante 600 s a una velocidad de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una disociación durante 600 s. La concentración de analito era 250 nM, 125 nM, 62,5 nM, 31,3 nM, y 15,6 nM o 2 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,25 μM , y 0,125 μM . La superficie se regeneró mediante la inyección de solución de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ una vez horizontalmente y una vez verticalmente.

El área de interacción (interacciones con la superficie del sensor) y el blanco (PBS-T-EDTA) se sustrajeron de los datos sin procesar. Luego, los sensogramas se adaptaron a un modelo cinético 1:1 para proporcionar constantes de velocidad (k_a , k_d) así como el valor de afinidad (KD) para hu DLL3 and cy DLL3, y se adaptaron de manera global a equilibrio para proporcionar valor de afinidad (KD) para hu CD3 $\epsilon\gamma$ y cy CD3 $\epsilon\gamma$.

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 descritas en la presente mostraron afinidades a DLL3 en el rango pM. Las afinidades a la subunidad CD3 $\epsilon\gamma$ estuvieron en el rango nM menor. La diferencia interespecie entre ser humano y *Macaca fascicularis* se equilibró. Las afinidades de tres proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 o SEQ ID NO:105, respectivamente) se muestran en Tabla 2A.

Tabla 2A: Afinidades (KD) de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 con respecto a subunidades DLL3 y CD3 $\epsilon\gamma$ humana y de *Macaca fascicularis* según se determinó mediante análisis SPR, y diferencias interespecie

Proteína de fijación a DLL3/CD3	DLL3 humana recombinante	DLL3 de <i>Macaca fascicularis</i> recombinante	Diferencia de afinidad KD hu/cyno DLL3	CD3 $\epsilon\gamma$ humana recombinante	CD3 $\epsilon\gamma$ de <i>Macaca fascicularis</i> recombinante	Diferencia de afinidad KD hu/cyno CD3 $\epsilon\gamma$
DLL3#3/CD3#1	< 10 pM	< 10 pM	1	7 nM	8 nM	1,1
DLL3#3/CD3#2	< 10 pM	< 10 pM	1	90 nM	100 nM	1,1
DLL3#3/CD3#3	< 10 pM	< 10 pM	1	68 nM	71 nM	1,04

Ejemplo 4B: Determinación de afinidades a DLL3 y CD3 $\epsilon\gamma$ recombinante según SPR

La afinidad de fijación de constructos biespecíficos para DLL3/CD3 purificados para DLL3-ECD humano recombinante y proteína de fusión Fc de subunidades de CD3 $\epsilon\gamma$ humana se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), usando un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). El método es similar al del Ejemplo 4A con algunas diferencias como se describe a continuación.

Para la determinación cinética de fijación a DLL3, las moléculas anti-DLL3/CD3 se capturaron de manera individual en la superficie de la proteína A/G verticalmente durante 200 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min. El valor inicial se estabilizó mediante inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min horizontalmente. El analito (hu DLL3) se inyectó horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 300 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min y una disociación durante 1800 s. La concentración de analito era 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM y 1,25 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de solución de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 μ l/min una vez horizontalmente y una vez verticalmente.

Para la determinación cinética de fijación a CD3, se inmovilizó HuCD3E_HuCD3G-Fc (disuelto en pH 4,5 de acetato) directamente en la superficie del sensor a través de acoplamiento de amina durante 360 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min verticalmente. El valor inicial se estabilizó mediante inyección de PBS-T-EDTA durante 60 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min horizontalmente. Los analitos (todas moléculas anti-DLL3/CD3) se inyectaron horizontalmente en el anticuerpo capturado durante 600 s a una velocidad de flujo de 30 μ l/min y una disociación durante 1800 s. La concentración de analito era 250 nM, 83,3 nM, 27,8 nM, 9,3 nM y

3,1 nM. La superficie se regeneró mediante la inyección de solución de ácido fosfórico al 0,85 % durante 18 s a una velocidad de flujo de 100 µl/min una vez horizontalmente y una vez verticalmente.

Las afinidades de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:105) se muestran en 2B.

Tabla 2B: Afinidades (KD) de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 con respecto a una subunidad de DLL3 y CD3 $\epsilon\gamma$ humana según se determinó mediante análisis SPR

Proteína de fijación a DLL3/CD3	huDLL3 humana recombinante	DLL3 de <i>Macaca fascicularis</i> humana huCD3 $\epsilon\gamma$
DLL3#1/ CD3#1	52 pM	2 nM
DLL3#2/ CD3#1	91 pM	3 nM
DLL3#3/ CD3#1	75 pM	2 nM
DLL3#3/ CD3#2	120 pM	7 nM
DLL3#3/ CD3#3	116 pM	4 nM
DLL3#4/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#5/ CD3#1	< 20 pM	3 nM
DLL3#6/ CD3#1	152 pM	2 nM
DLL3#7/ CD3#1	637 pM	1 nM
DLL3#8/ CD3#1	40 pM	2 nM
DLL3#9/ CD3#1	46 pM	2 nM
DLL3#10/ CD3#1	141 pM	na
DLL3#11/ CD3#1	37 pM	2 nM

DLL3#12/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#13/ CD3#1	23 pM	3 nM
DLL3#14/ CD3#1	60 pM	3 nM
DLL3#15/ CD3#1	na	na
DLL3#16/ CD3#1	228 pM	2 nM
DLL3#17/ CD3#1	< 20pM	2 nM
DLL3#18/ CD3#1	< 20 pM	3 nM

Ejemplo 5: Generación de células HEK293 que expresan el dominio extracelular y sus subdominios en la superficie celular

Para la generación de células HEK293 estables que expresan DLL3 humana de longitud completa (Uniprot: Q9NYJ7), DLL3 de *Macaca fascicularis* (UPI0003AB95BD), DLL1 humana (Q00548) y DLL4 humana (Q9NR61), respectivamente, la secuencia codificante respectiva se clonó en pcADN3.1 (Thermo Fisher Scientific) y se insertó una etiqueta FLAG entre la secuencia de señal y el dominio extracelular. La expresión en la superficie celular se verificó mediante el uso de un anticuerpo anti-FLAG (clon M2, Sigma) y luego un anti-IgG1 de ratón monoclonal (Acris).

El dominio extracelular de DLL3 consiste en subdominios diferentes:

- Hu DLL3 péptido de señal: aa 1-26
- Hu DLL3 dominio ECD terminal N: aa 27-175
- Hu DLL3 DSL: aa 176-215
- Hu DLL3 EGF1: aa 216-249
- Hu DLL3 EGF2: aa 274-310
- Hu DLL3 EGF3: aa 312-351
- Hu DLL3 EGF4: aa 353-389
- Hu DLL3 EGF5: aa 391-427
- Hu DLL3 EGF6: aa 429-465
- Péptido próximo a la membrana: aa 466-492

Los siguientes subdominios de DLL3 se expresaron en la superficie celular de células HEK293:

- Hu DLL3 EGF1+2: Uniprot: Q9NYJ7 aa 216-310

- Hu DLL3 EGF 2+3: Uniprot: Q9NYJ7 aa 274-351
- Hu DLL3 EGF3+4: Uniprot: Q9NYJ7 aa 312-389
- Hu DLL3 EGF4+5: Uniprot: Q9NYJ7 aa 353-427
- Hu DLL3 EGF5+6: Uniprot: Q9NYJ7 aa 391-465
- Hu DLL3 EGF6+péptido próximo a la membrana: Uniprot: Q9NYJ7 aa 429-492

Para la generación de células HEK293 que expresan subdominios con etiqueta 6-His-myc de DLL3 humana, las secuencias codificantes respectivas se clonaron en pcADN 3.1 (Thermo Fisher Scientific). Los constructos contienen una secuencia inicial Vk IgG de ratón de terminal N, seguida por una etiqueta 6-Histidina-myc y el dominio de DLL3 humana respectivo. Para asegurar la localización de la superficie celular de los dominios de DLL3 humana, todos los constructos se encontraban seguidos por un ligador Ser/Gly, el dominio transmembrana (aa266-288) y el dominio intracelular (aa 289-314) de EpCAM humana (P16422). La expresión de los subdominios se verificó usando anticuerpos IgG2a monoclonales de ratón contra distintos dominios como se describió en WO 2013126746. El anticuerpo monoclonal unido se detectó con un (F(ab')₂)-RPE anti-IgG de ratón en cabra (Jackson Immuno Research). Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. La expresión de DLL1 y DLL4 humana se confirmó mediante análisis FACS usando anticuerpos anti-DLL1 (R&D Systems, MAB1818) y anti-DLL4 (R&D Systems, MAB1506) seguidos de anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-rata con etiqueta PE (ver Figura 5, panel derecho).

Tabla 3: Secuencias de distintos subdominios DLL3 expresados en células HEK293

ID	Constructo	Secuencia
SEQ ID NO:110	DLL3 humana de longitud completa con etiqueta FLAG	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPDYKDDDDKAGVFELQI HSFGPGPGGAPRSPCSARLPCLFFRVCLKPGLSEEAEE SPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRD AWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAA GGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRP RSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCE QPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLV PGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEV SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE HDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCR ERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEF PVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVA GAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNN LRTQEGSGDGPSSSVVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYARE VATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

ID	Constructo	Secuencia
SEQ ID NO:111	DLL3 de <i>Macaca fascicularis</i> de longitud completa con etiqueta FLAG	MVSPRMSRLLSQTIVILALIFIPQARPDYKDDDDKAGVFELQI HSFGPGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRVCLKPGLSEEAEE SPCALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRD AWPGTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAG GPWARDIQRAGAWELRFSYRARCELPVGTACTRLCRPR SAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCEQ PGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSTTTGCLV PGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEV SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE HDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCR ERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVCAAPGYMGARCEF PVHPDGVSAALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVA GAALLLVHVRRRGHAQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNN LRTQEGPGDVPSSVDWNRPEDVDSRGIYVISAISIAREV AMPLFPPLHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK
SEQ ID NO:112	DLL1 humana de longitud completa con etiqueta FLAG	MGSRCALALAVLSALLCDYKDDDDKQVWSSGVFELKLQEF VNKKGLLGNRNCCRGAGPPPCACRTFFRVCLKHYQASV SPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFNSPIRFPF GFTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLT VGEESQDLHSSGRTDLKYSYRFVCEHYGEGCSVFCE PRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDE QHGFCDKPGECKCRVWQGRYCECIRYPGCLHGTCQQ PWQCNCQEGWGGGLFCNQDLNYCTHHKPKNGATCTNTG QGSYTCSCRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCDLEN SYSCTCPPPGFYGKICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSPDG GYSCRCVPVGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLGD YLCRCQAGFSGRHCDNVDDCASSPCANGGTCRDGVND FSCTCPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRY VCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTKLEGQGGPF PWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPPADPC RGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGD HSADKNGFKARYPAVDYNLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDT KCQPPQSSGEEKGTPTTLRGGEASERKRPDSGCSTSKDT KYQSVYVISEEKDECVIATEV
SEQ ID NO:113	DLL4 humana de longitud completa con etiqueta FLAG	MAAASRSASGWALLLLVALWQRAAGDYKDDDDKSGVFQ LQLQEFINERGLASGRPCPGCRTFFRVCLKHFQAVVSP GPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFT WPGTFSLIIEAWHAPGDDLREALPPDALISKIAIQGSLAVG QNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKR DHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNG YCSKPAECLCRPGWQGRCLNECIPHNGCRHGTCSTPWQ CTCDEGWGGFLCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRS YTCTCRPGYTGVDCLELSECDSPNCRNGGSCDKQEDGY HCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGAN YACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGQPSR MCRCRPGFTGTGTYCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLM CTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRTCYTDLSTDT FVCNCPYGFVGSRCFVGLPSPFWVAVSLGVGLAVLLV LLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPIAA QLKNTNQKKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPL GRGTMPGKFPKSLGKAPLRLHSEKPECRISAICSPRD SMYQSVCLISEERNECVIATEV
SEQ ID NO:114	Etiqueta FLAG	DYKDDDDK
SEQ ID NO:115	Vk principal	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD

ID	Constructo	Secuencia
SEQ ID NO:116	Etiqueta 6His-myc	HHHHHHEQKLISEEDL
SEQ ID NO:117	Ligador Ser/Gly	SGGGGS
SEQ ID NO:118	Dominio transmembrana EpCAM	AGVIAVIVVVVIAVVAGIVLVI
SEQ ID NO:119	Dominio intracelular EpCAM	SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
SEQ ID NO:120	EGF1	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCT
SEQ ID NO:121	Hu DLL3 EGF 1+2	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:122	EGF2	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:123	Hu DLL3 EGF 2+3	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE
SEQ ID NO:124	EGF3	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE
SEQ ID NO:125	Hu DLL3 EGF 3+4	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:126	EGF4	RVDRC SLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:127	Hu DLL3 EGF 4+5	RVDRC SLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGGRDCR
SEQ ID NO:128	EGF5	DLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGGRDCR
SEQ ID NO:129	Hu DLL3 EGF 5+6	DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:130	EGF6	RADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:131	Hu DLL3 EGF6-péptido próximo a la membrana	RADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL
SEQ ID NO:132	Péptido próximo a la membrana	FPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

Ejemplo 6: Mapeo de dominio de epítipo de proteínas de fijación a DLL3/CD3

Los dominios de epítipo se determinaron mediante la fijación de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 a las líneas celulares recombinantes que expresan los subdominios de DLL3 (ver Figura 2). La generación de estas líneas celulares se describe en el Ejemplo 5.

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E con los vectores pTT5 que tienen los genes que codifican la cadena, como se describe en el Ejemplo 2.

Las células que expresan los subdominios de DLL3 se tiñeron con proteínas de

fijación a DLL3/CD3 purificadas en dos etapas a 1,6 nM en amortiguador FACS (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de azida de sodio). Las moléculas unidas se detectaron con anticuerpo secundario anti-humano conjugado con PE (Sigma-Aldrich, #P8047). Como control negativo, las células se incubaron solo con anticuerpo secundario. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. Las Figuras 3A-C muestran aglutinantes de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) que se fijan a diferentes regiones de DLL3. Las secuencias de los dominios de epítipo se enumeran en el Ejemplo 5, Tabla 3.

Ejemplo 7: Reactividad cruzada interespecie

La reactividad cruzada interespecie se determinó mediante la fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 a células NCI-H82 (HTB-175TM) y SHP77 (ATCC®, CRL-2195TM), dos líneas celulares de SCLC, así como una línea celular recombinante que expresa DLL3 de *Macaca fascicularis* (generación de línea celular descrita en el Ejemplo 5).

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E con los vectores pTT5 que tienen los genes que codifican la cadena, como se describe en el Ejemplo 2. Las células que expresan DLL3 humana o de *Macaca fascicularis* se tiñeron con 1,6 nM de proteínas de fijación a DLL3/CD3 purificadas en dos etapas con concentraciones crecientes en amortiguador FACS (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de azida de sodio). Las moléculas unidas se detectaron con anticuerpo secundario anti-humano conjugado con PE (Sigma-Aldrich, #P8047). Como control negativo, las células se incubaron solo con anticuerpo secundario. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. La Figura 4 muestra la fijación a células que expresan DLL3 humana y de *Macaca fascicularis* de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:74 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, una cadena DLL3 de SEQ ID

NO:76 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:77 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79 o una cadena DLL3 de SEQ ID NO:78 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79).

Ejemplo 8: Confirmación de la ausencia de fijación a DLL1 y DLL4 humana

La ausencia de reactividad cruzada a DLL1 y DLL4 humana se determinó mediante la fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 a células recombinantes que expresan DLL1 o DLL4 humana (generación de líneas celulares descritas en el Ejemplo 5).

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E con los vectores pTT5 que tienen los genes que codifican la cadena, como se describe en el Ejemplo 2.

Las células que expresan DLL1 y DLL4 se tiñeron con 1,6 nM de proteínas de fijación a DLL3/CD3 purificadas en dos etapas con concentraciones crecientes en amortiguador FACS (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de azida de sodio). Las moléculas unidas se detectaron con anticuerpo secundario anti-humano conjugado con PE (Sigma-Aldrich, #P8047). Como control negativo, las células se incubaron solo con anticuerpo secundario. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo. La expresión de DLL1 y DLL4 humana se confirmó mediante análisis FACS usando anticuerpos anti-DLL1 (R&D Systems, MAB1818) y anti-DLL4 (R&D Systems, MAB1506) seguidos de anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-rata con etiqueta PE. La Figura 5 muestra la fijación de siete proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:74 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:76 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una cadena DLL3 de SEQ ID NO:77 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79 o una cadena DLL3 de SEQ ID NO:78 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79) a células que expresan DLL1 y DLL4 humana.

Ejemplo 9: Fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 a líneas celulares de SCLC y linfocitos T

La fijación de proteínas de fijación a DLL3/CD3 a líneas celulares de SCLC humanas se evaluó mediante citometría de flujo de NCI-H82 (HTB-175TM) y SHP77 (ATCC®, CRL-2195TM). Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se prepararon mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas), un subproducto de los bancos de sangre que extraen sangre para transfusiones. Todas las capas leucocíticas se obtuvieron luego del consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la aprobación del comité de ética cantonal en Austria, y las PBMC se prepararon el mismo día de la extracción. Por ende, las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (35 min sin pausa a 1400 rpm) y se lavaron exhaustivamente con PBS. Los eritrocitos restantes se eliminaron mediante la incubación durante 3 minutos en amortiguador de lisis ACK (Thermo Fisher Scientific, A1049201), y luego se lavaron en PBS, antes de suspenderse en un medio de ensayo que contenía RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco #61870-010), 5 % de suero AB humano AB (Gemini, GemCell N.º de cat. 100-512 LOT#H56500I) + 1 % de MEM-NEAA (Gibco #11140-035), 10 mM de HEPES (Affymetrix #7365-49-9), 10 µM de beta-mercaptoetanol (Gibco #21985-023) y piruvato de sodio (Gibco #11360-039).

Los linfocitos T se aislaron mediante selección negativa usando kit de aislamiento de linfocitos T Pan II (Miltényi Biotec #130-091-156). En síntesis, las células se volvieron a suspender en 40 µl de amortiguador PBS/0,5 % de BSA (Gibco ref#041-94553 M)/2 mM de EDTA (Invitrogen ref# 15575-038) cada 10 células Mio y se incubaron con 10 µl de cóctel de biotina-anticuerpo cada 10 células Mio durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, 30 µl de amortiguador y 20 µl de microesferas anti-biotina/10 millones de células se agregaron y se incubaron durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se colocó en una columna 25LS enjuagada previamente (Miltényi Biotec #130-042-401) en el campo magnético de un separador MACS adecuado (Miltényi Biotec). El flujo se recolectó y lavó en un medio de ensayo.

Las células (linfocitos T o células de SCLC humanas) se tiñeron con concentraciones crecientes de proteínas de fijación a DLL3/CD3 purificadas en dos etapas con concentraciones crecientes en amortiguador FACS (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de azida de sodio). Las moléculas unidas se detectaron con anticuerpo secundario anti-humano conjugado con PE (Sigma-Aldrich, #P8047). Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 que actúan sobre los dominios DSL (DLL3#6), EGF1 (DLL3#5) o EGF4 (DLL#4) muestran una fijación más fuerte a líneas celulares de SCLC que expresan DLL3, en comparación con proteínas de fijación a DLL3/CD3 que actúan sobre el péptido próximo a la membrana (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3). La fijación a

SHP77, células NCI-H82 y linfocitos T de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) contra diferentes dominios de epítipo se muestran en Figura 6A-V.

Ejemplo 10A: Potencia de la redirección de PBMC no estimuladas contra líneas celulares de SCLC humanas

La potencia de las PBMC no estimuladas contra líneas celulares de SCLC se determinó usando liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) como lectura para la lisis celular. En este ensayo, las líneas celulares de SCLC que expresan DLL3, SHP77 y NCI-H82, se cocultivaron con PBMC humanas como células efectoras y concentraciones crecientes de proteínas de fijación a DLL3/CD3 durante 72 horas en una relación de células efectoras con respecto a células diana de 10:1. Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E con vectores pTT5 que tienen genes que codifican cadenas, como se describe en el Ejemplo 2.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se prepararon mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas), un subproducto de los bancos de sangre que extraen sangre para transfusiones. Todas las capas leucocíticas se obtuvieron luego del consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la aprobación del comité de ética cantonal en Austria, y las PBMC se prepararon el mismo día de la extracción. Por ende, las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (35 min sin pausa a 1400 rpm) y se lavaron exhaustivamente con PBS. Los eritrocitos restantes se eliminaron mediante la incubación durante 3 minutos en amortiguador de lisis ACK (Thermo Fisher Scientific, A1049201), y luego se lavaron en PBS, antes de

suspenderse en un medio de ensayo que contenía RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco #61870-010), 5 % de suero AB humano AB (Gemini, GemCell N.º de cat. 100-512 LOT#H56500I) + 1 % de MEM-NEAA (Gibco #11140-035), 10 mM de HEPES (Affymetrix #7365-49-9), 10 µM de beta-mercaptoetanol (Gibco #21985-023) y piruvato de sodio (Gibco #11360-039).

Posteriormente, las células diana, SHP77 y NCI-H82, y las PBMC en una relación de 1:10 se incubaron con proteínas de fijación a DLL3/CD3 a concentraciones de 0,0001 nM a 100 nM durante 72 horas.

La actividad citotóxica se determinó usando el Kit^{PLUS} de detección de citotoxicidad (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En síntesis, este método se basa en el uso de la liberación de LDH de células inactivas o con la membrana plasmática dañada. El sobrenadante del cultivo celular se incubó con la mezcla de reacción del kit durante 30 minutos y la formación de formazán, como resultado de la actividad de LDH, se mide en un espectrofotómetro a 500 nm como un sustituto para la lisis celular. El porcentaje de citotoxicidad relativa al control de lisis máxima se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (con respecto al control)} = \frac{\text{valor medido} - \text{fondo}}{\text{lisis máxima} - \text{lisis mínima}}$$

Antecedentes: células diana + células efectoras

Lisis máxima: células diana + 5 % de Triton X-100

Lisis mínima: células diana

Usando el *software* GraphPad Prism 5, el porcentaje de citotoxicidad relativa al control de lisis máxima se representó contra las concentraciones de proteína de fijación a DLL3/CD3 correspondientes. Las curvas de respuesta de dosis se analizaron con un modelo de ecuación logística de 4 parámetros para la evaluación de la curva dosis-respuesta sigmoidea, y se calcularon los valores de EC₉₀ (los valores de EC₉₀ se muestran en Tabla 4A).

La Figura 7A muestra un ejemplo de potencia en la lisis celular de 7 proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77 o SEQ ID NO:78, y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) que se fijan a diferentes dominios de epítipo.

Tabla 4A: Valores de EC₉₀ [nM] de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 según se midieron en un ensayo de citotoxicidad de 72 horas con PBMC no estimuladas como

células efectoras y líneas celulares de SCLC, NCI-H82 y SHP77 como células diana.

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	1,7	1,4
DLL3#2/CD3#1	2,9	3,4
DLL3#3/CD3#1	0,9	1,5
DLL3#3/CD3#2	3,9	16,5
DLL3#4/CD3#1	Sin saturación a 100 nM	Sin saturación a 100 nM
DLL3#5/CD3#1	Sin saturación a 100 nM	Sin saturación a 100 nM
DLL3#6/CD3#1	Sin saturación a 100 nM	Sin saturación a 100 nM

Ejemplo 10B: Potencia de redirección de linfocitos T no estimulados contra líneas celulares de SCLC humanas

Los linfocitos T se aislaron como se describe en el Ejemplo 9. Posteriormente, los linfocitos T purificados se usaron como células efectoras en un ensayo de citotoxicidad con células SHP77 y NCI-H82 como células diana, como se describe en el Ejemplo 10A. Las curvas de respuesta de dosis se muestran en las Figuras 7B-H (células SHP77) y Figuras 7I-O (células NCI-H82). Los valores de EC₉₀ calculados se muestran en la Tabla 4B.

Las Figura 7B-O muestran ejemplos de potencia en la lisis celular de 19 proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252) Tabla 4B: Valores de EC₉₀ [nM] de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 según se midieron en un ensayo de citotoxicidad de 72 horas con linfocitos T purificados como células efectoras y líneas celulares SCLC y NCI-H82 como células diana.

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	0,66	0,15
DLL3#2/CD3#1	1,51	0,16
DLL3#3/CD3#1	0,27	0,02
DLL3#3/CD3#2	2,50	3,00
DLL3#4/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#5/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#6/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#7/CD3#1	21,84	8,37
DLL3#8/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#9/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#10/CD3#1	sin actividad	sin actividad

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	NCI-H82	SHP77
DLL3#11/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#12/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#13/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#14/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#15/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#16/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#17/CD3#1	sin actividad	sin actividad
DLL3#18/CD3#1	sin actividad	sin actividad

Ejemplo 11: Ensayo de internalización *in vitro*

Se midieron los cambios en la potencia de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 después de preincubarse con células SHP77 que expresan DLL3 como células diana. Si la proteína de fijación a DLL3/CD3 se internaliza, debería disminuir la concentración eficaz y, por lo tanto, debería disminuir la potencia aparente.

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se produjeron como se describe en el Ejemplo 2. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se prepararon como se describe en el Ejemplo 10.

Las células SHP77 diana se colocaron en placas y se incubaron con proteínas de fijación a DLL3/CD3 en concentraciones de 0,0001 a 100 nM durante 2 y 4 horas antes de agregar PBMC no estimuladas durante 48 horas. La relación de las células efectora con respecto a las células diana fue 10:1. La actividad citotóxica se determinó usando el Kit^{PLUS} de detección de citotoxicidad (Roche) como se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 8 no muestra diferencias entre la potencia y la eficacia en la lisis de las células de dos proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80). La potencia y la eficacia se observaron en comparación con las muestras que no se incubaron previamente (0 h). Los resultados sugieren que no se produce una internalización significativa con las proteínas de fijación a DLL3/CD3.

Ejemplo 12: Estudio PK en ratón

La PK de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se evaluó en ratones C57BL/6, con una dosis única i.v. de 1 mg/kg. Las concentraciones séricas de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se determinaron usando un ensayo de captura de DLL3/detección de CD3.

En síntesis, los ratones C57BL/6 macho recibieron una dosis única intravenosa (IV) de 1 mg/kg ($n = 3$ por molécula). Las muestras de sangre se recolectaron antes de la dosis y 0,15, 2, 8, 24, 72, 96, 168, 240 y 336 horas después de la dosis. Los niveles de suero en el fármaco se midieron con un ensayo de fijación al ligando basado en MSD, usando DLL3 biotinilada como reactivo de captura y CD3 etiquetada con sulfo como el agente de detección. Los parámetros farmacocinéticos (PK) se calcularon de los perfiles tiempo-concentración sérica usando análisis no compartimental. Se evaluaron los siguientes parámetros PK: AUC_{last} (área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo cero hasta el último punto temporal cuantificable), AUC_{inf} (área bajo la curva de concentración-tiempo extrapolado hasta infinito), CL (depuración sistémica), V_{ss} (volumen de distribución en estado estacionario) y $t_{1/2}$ (semivida terminal).

La media de los perfiles de tiempo-concentración sérica (SD) para proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) se resume en la Figura 9. La media de los parámetros PK (SD) para estas proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Media de los parámetros PK (SD) de proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo en ratones C57BL/6 macho, y dosis única intravenosa de 1 mg/kg

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	AUC _{0-último} (µg*d/ml)	AUC _{0-inf} (µg*d/ml)	CL (ml/día/kg)	V _{ss} (ml/kg)	$t_{1/2}$ (días)
DLL3#3/CD3#1	1180 (127)	1760 (179)	13,7 (1,48)	178 (57,7)	10,6 (4,67)
DLL3#3/CD3#2	1260 (170)	1440 (154)	16,8 (1,74)	109 (19,5)	4,97 (0,78)

Ejemplo 13: Estudio de eficacia de xenoinjerto *in vivo*

Los estudios de eficacia se realizaron usando un modelo de xenoinjerto humano en ratón reconstituido con linfocitos T humanos. En detalle, las células de cáncer de pulmón de células pequeñas SHP77 humanas (2×10^7) se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en el flanco dorsal derecho de ratones hembra NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac (día 1) con irradiación subletal (2 Gy, día -1). En paralelo, los linfocitos T que expresan CD3 humana (aislados de sangre de donante humano sano) se expandieron *in vitro*.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se prepararon como se describe en el Ejemplo 10.

Los linfocitos T se aislaron mediante selección negativa usando kit de aislamiento de linfocitos T Pan II (Miltenyi Biotec #130-091-156). En síntesis, las células se suspendieron en 40 µl de amortiguador PBS/0,5 % de BSA (gibco ref#041-94553 M)/2 mM de EDTA (Invitrogen ref# 15575-038) cada 10 células Mio y se incubaron con 10 µl de un cóctel de biotina-anticuerpo cada 10 células Mio durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, 30 µl de amortiguador y 20 µl de microesferas anti-biotina/10 millones de células se agregaron y se incubaron durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se colocó en una columna 25LS previamente enjuagada (Miltenyi Biotec #130-042-401) en el campo magnético de un separador MACS adecuado (Miltenyi Biotec). El flujo se recolectó y lavó en un medio de ensayo.

Posteriormente, los linfocitos T se expandieron usando el kit de activación/expansión de linfocitos T humanos (Miltenyi Biotec Cat#130-091-441, Lot#5170720843) durante 20 días. En síntesis, las partículas MACSiBead™ anti-biotina se cargaron con biotina CD2-, CD3-, CD28 y se transfirieron a los linfocitos T purificados en una relación de 2 células por partícula, y se incubaron en presencia de 20 unidades de IL-2 recombinante (R&D#202-IL-050/CF) en una densidad de 0,5-1 10⁶ células/ml durante 20 días. Las células se enriquecieron con 20 unidades de IL-2 nuevas cada 3 días. Tres días antes de la inyección en los animales, los linfocitos T se volvieron a estimular con partículas MACSiBead™, cargadas con biotina CD2-, CD3-, CD28 en una relación de 1 esfera cada 4 células durante 3 días más. Por último, las esferas se eliminaron con un separador MACSiMAG (Miltenyi Biotec) y los linfocitos T se lavaron en PBMC.

El día 14, los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento en función del volumen tumoral, y 2 x 10⁷ linfocitos T humanos se inyectaron por vía intraperitoneal (*i.p.*). El tratamiento se inició el día 17, y se administró proteína de fijación a DLL3/CD3 (proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, y proteína de fijación a DLL3/CD3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80) o amortiguador de vehículo (50 mM de NaOAc, 100 mM de NaCl, pH 5,0) en un régimen de dosis q7d por medio de inyecciones de bolo intravenosas (*i.v.*) en la vena lateral de la cola. El crecimiento tumoral se controló mediante mediciones de calibre externas, y el volumen de los tumores se calculó usando una fórmula de hemielipsoide estándar. Los injertos de linfocitos T humanos se evaluaron en el bazo mediante

tinción de inmunohistoquímica (IHC) para determinar la CD3 humana al final del estudio. Solo los ratones que presentaron injertos de linfocitos T humanos al final del estudio se incluyeron en el análisis estadístico. Los animales que alcanzaron criterios de sacrificio se sometieron a eutanasia temprana durante los estudios por razones éticas. El tratamiento de ratones que tenían tumores con las proteínas de fijación a DLL3/CD3 una vez por semana i.v. a 0,25 mg/kg indujo una regresión tumoral significativa (Figura 10).

Ejemplo 14: Porcentaje del contenido de monómeros de las proteínas de fijación a DLL3/CD3

El porcentaje de monómeros se determinó para las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:105) mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (aSEC) (se muestra en la Tabla 6). La aSEC se llevó a cabo en un sistema Waters (Milford, MA, EE.UU.) Acquity UPLC usando una columna Protein BEH SEC 200 Å, 1,7 µm, 4,6x150 mm (Cat# 186005225). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: Fase móvil: 50 mM de fosfato de sodio, 200 mM de arginina y 0,05 % de azida de sodio; velocidad de flujo: 0,5 ml/min; tiempo de corrida: 5 minutos; cantidad de carga de muestra: 10 µg; pico de detección: A280 nm; método de procesamiento automatizado de cromatogramas.

Tabla 6: Porcentaje de monómeros después de la primera y segunda etapa de purificación

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	Porcentaje de monómeros después de la 1.^a etapa de purificación	Porcentaje de monómeros después de la 2.^a etapa de purificación
DLL3#1/CD3#1	76,4	99,4
DLL3#2/CD3#1	54,4	98,0
DLL3#3/CD3#1	69,5	99,8
DLL3#3/CD3#2	77,6	99,5
DLL3#3/CD3#3	70,8	98,3
DLL3#4/CD3#1	72,2	99,1

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	Porcentaje de monómeros después de la 1. ^a etapa de purificación	Porcentaje de monómeros después de la 2. ^a etapa de purificación
DLL3#5/CD3#1	70,5	99,1
DLL3#6/CD3#1	55,2	99,9
DLL3#7/CD3#1	78,1	99,0
DLL3#8/CD3#1	54,8	99,5
DLL3#9/CD3#1	72,0	99,0
DLL3#10/CD3#1	70,2	98,3
DLL3#11/CD3#1	68,2	94,7
DLL3#12/CD3#1	66,2	98,7
DLL3#13/CD3#1	52,8	99,9
DLL3#14/CD3#1	52,6	87,0
DLL3#15/CD3#1	61,5	na
DLL3#16/CD3#1	71,8	99,5
DLL3#17/CD3#1	60,2	94,7
DLL3#18/CD3#1	61,5	98,2

Ejemplo 15A: Termoestabilidad

La termoestabilidad se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), y los resultados de las transiciones de fusión de primer orden (Tm1) de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se muestran en Tabla 7. Las fusiones térmicas en DSC proporcionan información sobre la estabilidad térmica de una proteína en solución con respecto a un amortiguador de control. El despliegue térmico y agregación de 1 mg/ml de solución de proteínas en 20 mM de citrato, 115 mM de NaCl, pH 6 se controló de 20 °C a 110 °C a una tasa de barrido de 60 °C/h mediante DSC capilar automatizado.

Tabla 7A

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	Tm1
DLL3#3/CD3#1	64
DLL3#3/CD3#2	60
DLL3#3/CD3#3	63
DLL3#4/CD3#1	63

Ejemplo 15B: Termoestabilidad

La termoestabilidad se determinó mediante análisis de intercambio térmico (TSA), y los resultados de las transiciones de fusión de primer orden (Tm1) de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248,

SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:105) se muestran en Tabla 7B. El perfil de intensidad de fluorescencia como una función de temperatura se obtuvo usando un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, Waltham, MA) con naranja SYPRO (Invitrogen, Carlsbad, CA) como fluoróforo extrínseco. La muestra se diluyó hasta 0,4 mg/ml en 10 mM de histidina, pH 6,0 con 40 mM de cloruro de sodio y 0,02 % de azida de sodio. La curva de fusión se generó con un incremento térmico de 25 °C a 95 °C a una velocidad de 2 °C/min, los datos se recolectaron alrededor de cada 0,4 °C mediante el conjunto de filtros 'ROX' (Ex: 580 ±10 nm, Em: 623 ±14 nm). Los datos se analizaron usando Protein Thermal Shift Software Version 1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Tabla 7B

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	Tm1 (°C)
DLL3#1/CD3#1	65,6
DLL3#2/CD3#1	65,5
DLL3#3/CD3#1	65,6
DLL3#3/CD3#2	63,0
DLL3#3/CD3#3	65,5
DLL3#4/CD3#1	65,8
DLL3#5/CD3#1	65,6
DLL3#6/CD3#1	65,8
DLL3#7/CD3#1	65,6
DLL3#8/CD3#1	65,8
DLL3#9/CD3#1	65,9
DLL3#10/CD3#1	64,6
DLL3#11/CD3#1	66,0
DLL3#12/CD3#1	65,9
DLL3#13/CD3#1	65,8
DLL3#14/CD3#1	65,9
DLL3#15/CD3#1	na
DLL3#16/CD3#1	65,8
DLL3#17/CD3#1	65,8
DLL3#18/CD3#1	65,8

Ejemplo 16: Puntuación de inmunogenicidad prevista *in silico* mediante EpiVax:

La inmunogenicidad de las secuencias se evaluó *in silico* con un algoritmo matemático. Específicamente, se determinaron puntuaciones EpiMatrix ajustadas a Treg (EpiVax Inc., Providence RI) como una medida de puntuaciones de inmunogenicidad para las proteínas de fijación a DLL3/CD3 (proteínas de fijación a

DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:105) y se compararon con las puntuaciones de diversas secuencias Fc. Estas puntuaciones consideran los epítomos de linfocitos T y los epítomos de Treg. A menor puntaje de inmunogenicidad, menor posibilidad de que una secuencia sea inmunógena. En general, se considera un puntaje negativo como un riesgo bajo de inmunogenicidad, mientras que un puntaje altamente positivo es visto como una indicación de inmunogenicidad potencial. Como se muestra en las Tablas a continuación, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 descritas en la presente tienen puntuaciones de inmunogenicidad muy bajas, lo que indica que el riesgo de ser inmunogénicas es bajo para estas proteínas de fijación.

Tabla 8: Puntuación Epivax ajustada de proteínas de fijación a DLL3/CD3

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	VH	VL	Cadena de polipéptidos completa (VL-CL-ligador-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3)
Cadena DLL3 DLL3#1	-36,88	-59,85	-43,31
Cadena DLL3 DLL3#2	-46,99	31,40	-33,53
Cadena DLL3 DLL3#3	-34,44	2,84	-35,50
Cadena DLL3 DLL3#4	25,97	28,92	-21,93
Cadena DLL3 DLL3#5	-59,87	-46,45	-44,95
Cadena DLL3 DLL3#6	29,70	-14,55	-27,26
Cadena CD3 CD3#1	-9,68	-50,52	-35,25
Cadena CD3 CD3#2	-15,54	-50,52	-36,23
Cadena CD3 CD3#3	-13,49	-50,52	-35,88
Cadena DLL3 DLL3#7	-48,55	-34,92	-41,60
Cadena DLL3 DLL3#8	-54,39	-37,79	-42,89
Cadena DLL3 DLL3#9	35,95	-60,37	-31,83
Cadena DLL3 DLL3#10	-33,82	-34,60	-40,73
Cadena DLL3	-24,00	26,66	-30,50

Proteínas de fijación a DLL3/CD3	VH	VL	Cadena de polipéptidos completa (VL-CL-ligador-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3)
DLL3#11			
Cadena DLL3 DLL3#12	-30,43	25,68	-31,67
Cadena DLL3 DLL3#13	8,64	18,63	-25,96
Cadena DLL3 DLL3#14	1,58	-10,63	-31,72
Cadena DLL3 DLL3#15	8,93	-8,31	-29,91
Cadena DLL3 DLL3#16	-55,14	13,98	-35,59
Cadena DLL3 DLL3#17	11,89	12,55	-26,52
Cadena DLL3 DLL3#18	5,82	15,85	-27,01

Tabla 9: Puntuación Epivax ajustada de dominios Fc

Cadena de proteína Fc	Puntuación Epivax ajustada
Fc-IgG1-WT	-25,64
Fc-IgG1-LALA	-29,83
Fc-IgG1-LALA-BOTÓN	-31,76
Fc-IgG1-LALA-OJAL	-18,01

Ejemplo 17A: Fijación no específica a superficies

La especificidad de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 de la invención se evaluó adicionalmente en un ensayo basado en SPR usando proteínas altamente cargadas. Se realizó un ensayo de fijación no específica utilizando tecnología de biosensor para determinar si las proteínas de fijación tenían una fijación significativa a las proteínas con carga no relacionadas. En este ensayo, las proteínas de fijación a DLL3/CD3 se hicieron pasar por dos superficies de SPR, una cubierta con una proteína con carga negativa (inhibidor de tripsina) y una cubierta con una proteína con carga positiva (lisozima). Cuando una proteína muestra una fijación no específica significativa a estas superficies, es posible que la causa de fijación sea la presencia de fragmentos de superficie con carga positiva o negativa en el candidato. La fijación no específica de las proteínas puede generar farmacocinética (PK) y biodistribución deficientes, y también puede tener impactos en la producibilidad corriente abajo.

El experimento se realizó en Biacore T200. Los experimentos de dilución, preparación de la superficie y fijación se realizaron a 25 °C en un amortiguador 1X HBS-EP preparado de 10X HBS-EP. La velocidad de flujo tanto para el protocolo de inmovilización como para el experimento de fijación era de 5 µl/min.

Para preparar la superficie para el experimento de fijación no específica, una lisozima de clara de huevo de gallina y un inhibidor de tripsina de soja *glycine max* se acoplaron manualmente en un chip CM5 serie S con una densidad de superficie de 3000-5000 RU utilizando el kit de acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las muestras se prepararon a 1 μ M en un amortiguador 1X HBS-EP. Las muestras se inyectaron en superficies activadas con una asociación de 10 min y una disociación de 10 min. Los datos se recolectaron utilizando un *software* Biacore T200 Control versión 2.0.1 y se analizaron utilizando un *software* Biacore T200 Evaluation versión 3.0.

Las proteínas de fijación a DLL3/CD3 no se fijaron a estas superficies altamente cargadas. La Tabla 10A muestra la ausencia de fijación a estas dos proteínas altamente cargadas, inhibidor de tripsina y lisozima, con dos proteínas de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo.

Tabla 10A:

Proteína de fijación a DLL3/CD3	Fijación no específica	
	Lisozima (positiva)	Inhibidor de tripsina (negativo)
DLL3#3/CD3#1	No	No
DLL3#3/CD3#2	No	No

Ejemplo 17B: Fijación no específica a superficies

La especificidad de las proteínas de fijación a DLL3/CD3 (proteínas de fijación a DLL3/CD3 que comprenden una cadena DLL3 de SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 o SEQ ID NO:252, y una cadena CD3 de SEQ ID NO:79, una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:80, y una proteína de fijación a DLL3 que comprende una cadena DLL3 de SEQ ID NO:75 y una cadena CD3 de SEQ ID NO:105) se evaluó adicionalmente en un ensayo basado en SPR usando proteínas altamente cargadas, como se describe en el Ejemplo 17a, con una asociación de 10 min y una disociación de 15 min. Los resultados se muestran en la Tabla 10B.

Tabla 10B: Baja cantidad de RU indica que la fijación a proteínas con carga no relacionadas es insignificante

Proteína de fijación a DLL3/CD3	Fijación no específica (RU)	
	Lisozima (positiva)	Inhibidor de tripsina (negativo)
DLL3#1/CD3#1	4	1
DLL3#2/CD3#1	7	2
DLL3#3/CD3#1	54	85
DLL3#3/CD3#2	44	36
DLL3#3/CD3#3	17	28
DLL3#4/CD3#1	16	37
DLL3#5/CD3#1	4	0
DLL3#6/CD3#1	6	0
DLL3#7/CD3#1	9	3
DLL3#8/CD3#1	39	18
DLL3#9/CD3#1	15	27
DLL3#10/CD3#1	25	12
DLL3#11/CD3#1	11	13
DLL3#12/CD3#1	8	9
DLL3#13/CD3#1	11	3
DLL3#14/CD3#1	18	6
DLL3#15/CD3#1	na	na
DLL3#16/CD3#1	6	0
DLL3#17/CD3#1	15	8
DLL3#18/CD3#1	23	81

Ejemplo 18: Inducción de lisis, activación de linfocitos T, desgranulación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T y secreción de citocina en presencia de células tumorales que expresan DLL3 y células tumorales que no expresan DLL3

Las PBMC se purificaron como se describe en el Ejemplo 9. Para determinar la activación de linfocitos T, desgranulación de linfocitos T y secreción de citocina, un ensayo de citotoxicidad con PBMC y células SHP77 que expresan DLL3 o células RKO-E6 que no expresan DLL3 como células diana se preparó como se describe en el Ejemplo 10B. La potencia de la lisis celular mediante la redirección de los linfocitos T hacia células SHP77 o RKO-E6 humanas se determinó como se describe en el Ejemplo 10A. Para determinar la activación de linfocitos T y desgranulación de linfocitos T, las células se centrifugaron y tiñeron con anticuerpos contra CD4 (BD #550630), CD8 (BD #557834), CD25 (BD#340907), posteriormente, las células se permeabilizaron usando la solución de fijación/permeabilización (BD #554714) y se tiñeron con anticuerpos contra perforina (BioLegend #308120) y granzima B (BD #560221), y se midieron mediante citometría de flujo. Los niveles de citocina en los sobrenadantes se determinaron mediante ensayos de grupo de biomarcadores 1 (hu) U-PLEX (MSD, #K15067L-2, Kit).

Para determinar la proliferación de linfocitos T, las PBMC se etiquetaron con 5

μ M de Cell Trace™ CFSE (Invitrogen, C34554) y linfocitos T teñidos con un anticuerpo anti-CD3 (BioLegend cat#: 317336). Posteriormente, las PBMC etiquetadas se incubaron con células SHP77 o RKO-E6 en una relación 10:1 y concentraciones crecientes de una proteína de fijación a DLL3/CD3 durante 6 días.

Las Figuras 11-15 muestran la inducción de la lisis redirigida por linfocitos T de células SHP77 o RKO-E6 (Figura 11) y la inducción de activación de linfocitos T dependiente de la dosis (Figura 12), desgranulación de linfocitos T (Figura 13), secreción de citocinas (Figura 14A: Interferón gamma; 14B: MCP-1) y proliferación de linfocitos T (Figura 15) en presencia de células SHP77 o RO-E6 y una proteína de fijación a DLL3/CD3.

Ejemplo 19: Redirección de subconjuntos de linfocitos T a células SHP77

Las PBMC se aislaron como se describe en el Ejemplo 10a. Posteriormente, los subconjuntos de linfocitos T se aislaron mediante los siguientes reactivos y protocolos:

Tabla 11: Reactivos y protocolos para aislamiento de subconjuntos de linfocitos T

Subconjunto de linfocitos T	Reactivos y protocolos usados
Linfocitos T indiferenciados	Miltenyi Biotech; #130-097-095
Linfocitos T CD4 ⁺	Miltenyi Biotech; #130-096-533
Linfocitos T efectores de memoria CD4 ⁺	Miltenyi Biotech; #130-094-125
Linfocitos T de memoria central CD4 ⁺	Miltenyi Biotech; #130-094-302
Linfocitos T CD8 ⁺	Miltenyi Biotech; #130-096-495
Linfocitos T efectores CD8 ⁺ CD45RA ⁺	Miltenyi Biotech; #130-094-485
Linfocitos T de memoria CD8 ⁺	Miltenyi Biotech; #130-094-412

Las Figuras 16-20 muestran la potencia de redirección de linfocitos T Pan (Figura 16), linfocitos T indiferenciados (Figura 16), linfocitos T CD4⁺ (Figuras 17, 18), linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ (Figura 18), linfocitos T de memoria central CD4⁺ (Figura 17), linfocitos T CD8⁺ (Figuras 19, 20), linfocitos T efectores CD8⁺CD45RA⁺ (Figura 19), linfocitos T de memoria CD8⁺ (Figura 20) contra células SHP77 humanas de una proteína de fijación a DLL3/CD3.

Ejemplo 20: Infiltración de linfocitos T en tejido tumoral de xenoinjerto SHP77 con una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo.

Los tejidos tumorales restantes de ratones en el estudio descrito en el Ejemplo 13 se prepararon, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Posteriormente, las secciones de tejido se prepararon y tiñeron para determinar la expresión de CD3 en linfocitos T (2GV6 Ventana). La infiltración de linfocitos T en tejido tumoral de xenoinjerto SHP77 con una proteína de fijación a DLL3/CD3 de ejemplo se muestra en la Figura 21. La calificación en la Tabla 12 se usó para cuantificar la expresión de CD3

en tejidos tumorales de xenoinjerto.

Tabla 12: Puntuación para la cuantificación de infiltración de linfocitos T que expresan CD3

Puntuación	Descripción
0	Sin células CD3+ en el plano de la sección
1	Pocas células dispersas o grupos pequeños, principalmente en el estroma
2	Pocas células dispersas o grupos pequeños, en el estroma y el margen
3	Baja cantidad de células o grupos en el estroma, el epitelio y el margen
4	Cantidad moderada de células o grupos en el estroma y el margen; baja cantidad de células intraepiteliales
5	Alta cantidad de células o grupos en el estroma y el margen; baja cantidad de células intraepiteliales

Ejemplo 21: Producción de anticuerpos anti-DLL3

Para obtener aglutinantes anti-DLL3, se cultivaron *in vitro* hibridomas o linfocitos B únicos derivados de ratones humanizados AlivaMab y de tipo silvestre inmunizados con DLL3 (Ablexis, San Francisco, CA, USA: AlivaMab transgenic mouse platform with human immunoglobulin loci). Los sobrenadantes se cribaron para determinar la reactividad contra DLL3 humana recombinante, mediante AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.), y contra células SHP-77 (ATCC®, CRL-2195TM) que expresan DLL3 humana, mediante citometría de flujo.

Luego, se amplificaron los genes de VH y VL de inmunoglobulina (Ig) a partir de clones positivos identificados. Para aislar el ARN de hibridomas, alrededor de 2×10^6 células de clones únicos se convirtieron en pelets y se usaron como material fuente. Para linfocitos B únicos, 100 a 500 células expandidas a partir de linfocitos B singularmente aislados se usaron como material fuente. El ARN se aisló mediante RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego, el cADN se sintetizó usando el kit de síntesis de cADN Smarter (Clontech, Mountain View, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para facilitar la síntesis de cADN, se usó oligodT para cebar la transcripción inversa de la totalidad del ARN mensajero seguido de "terminación 5'" con un oligonucleótido Smarter IIA. La amplificación subsiguiente de los fragmentos VH y VL se llevó a cabo mediante una amplificación de PCR en 2 etapas usando cebadores 5' que actúan sobre la terminación Smarter IIA y cebadores 3' que actúan sobre regiones de consenso en CH1. Brevemente, cada reacción PCR de 50 µl consiste en 20 µM de mezclas de cebadores directos e inversos, 25 µl de premezcla de ADN polimerasa PrimeStar Max (Clontech), 2 µl de cADN no purificado, y 21 µl de H₂O bidestilada. El programa de ciclos comienza a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos (94 °C durante 30 s, 50 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min), y

termina a 72 °C durante 7 min. La segunda ronda de PCR se llevó a cabo con cebadores de segunda ronda de VL y VH que contienen extensiones complementarias de 15 bp que se “superponen” a las regiones respectivas en su vector de origen pTT5 respectivo (VH y VL). La PCR de segunda ronda se llevó a cabo con el siguiente programa: 94 °C durante 3 min; 35 ciclos (94 °C durante 30 s, 50 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min), y termina a 72 °C durante 7 min.

Se usó el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Estados Unidos de América) para la clonación direccional del gen de VL en el vector pTT5 hulgK y del gen de VH en el vector pTT5 hulgG1KO. Para facilitar la clonación In-Fusion® HD, los productos de PCR se purificaron y se trataron con potenciador de clonación antes de la clonación In-Fusion HD. La clonación y la transformación se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Clontech, Estados Unidos de América). Las miniprep de ADN se sometieron a secuenciación Sanger para confirmar que se obtuvieran fragmentos de genes V completos.

Con el uso de esta metodología, se prepararon pares de dominios de fijación que codifican los genes de VH y VL de Ig con especificidad para DLL3. Los anticuerpos recombinantes se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO-E37 con los plásmidos que codifican las cadenas liviana y pesada correspondientes.

Análisis confirmatorio de anticuerpos recombinantes

Los sobrenadantes que contienen los anticuerpos recombinantes expresados se sometieron a ensayo mediante citometría de flujo para determinar la fijación a líneas celulares que expresan DLL3 humana. Brevemente, las células se incubaron con sobrenadantes recombinantes, se lavaron, y los mAb unidos de los sobrenadantes se detectaron con APC anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch 109-136-098). Las relaciones de señal con respecto a fondo (S/B) se calcularon al dividir la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de la muestra por la del control de isotipo.

Una resonancia de plasmones superficiales (SPR) en Biacore 400 se realizó a los sobrenadantes recombinantes. Brevemente, las IgG no optimizadas en los sobrenadantes HTP se capturaron mediante proteína A/G en la superficie del sensor durante 60 s a 10 ul/min. La fijación de 100 nM de DLL3 humana a las IgG capturadas se controló durante 180 s de asociación a 30 ul/min, y luego 120 s de disociación en el amortiguador HBS-EP. La regeneración de la superficie de proteína A/G se realizó con glicina pH 2,1 entre cada ciclo de fijación. En el presente ensayo se usaron los siguientes materiales: Reactivo de proteína: DLL3 humana expresada de manera

recombinante. Amortiguador de corrida del sistema: HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA y 0,005 % v/v de polisorbato P20). Reactivo de captura: proteína A/G, con especificidad hacia todos los isotipos de IgG humana.

Los clones de interés (con $K_d < 300$ pM) se seleccionaron y evaluaron adicionalmente en diversos ensayos de detección como se describe a continuación.

Ejemplo 22: Fijación de anticuerpos anti-DLL3 a proteína DLL3 humana recombinante

La fijación de anticuerpos se realizó en ELISA. En síntesis, los anticuerpos anti-DLL3 se recubrieron en una concentración de 2 µg/ml a 4 °C durante la noche. Después de lavar las placas, se bloquearon con un amortiguador de bloqueo (Gibco, Gibco#043-90309A) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado e incubación con proteína DLL3 recombinante en concentraciones crecientes. Para la detección, la proteína DLL3 unida se incubó con un anticuerpo anti-DLL3 policlonal (R&D Systems, AB4315) y luego un anticuerpo anti-cabra etiquetado con SULFO-TAG (R32AG-1) durante 1 hora. El anticuerpo unido se cuantificó usando un amortiguador de lectura (MSD) en un lector Sector imager 6000 (MSD). La Figura 22 muestra la fijación de 3 anticuerpos anti-DLL3 de ejemplo a la proteína recombinante. El anticuerpo anti-DLL3 que actúa sobre el dominio del péptido próximo a la membrana (DLL3#3) presenta mayor fijación a la proteína DLL3 recombinante, en comparación con los anticuerpos anti-DLL3 que actúan sobre el dominio EGF4 (DLL3#4) o EGF1 (DLL3#5).

Ejemplo 23: Fijación de anticuerpos anti-DLL3 a líneas celulares de SCLC

Las células (linfocitos T o células de SCLC humanas) se tiñeron con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-DLL3 con concentraciones crecientes en amortiguador FACS (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de azida de sodio). Las moléculas unidas se detectaron con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE (Jackson Immuno Research, 115-116-072) mediante análisis FACS. Los anticuerpos anti-DLL3 que actúan sobre dominios DSL (DLL3#6), EGF1 (DLL3#5) o EGF4 (DLL3#4) presentaron fijación más fuerte a líneas celulares de SCLC que expresan DLL3, en comparación con anticuerpos anti-DLL3 que actúan sobre el péptido del terminal C (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3) como se muestra en la Figura 23.

Ejemplo 24: (IHC)

Los anticuerpos anti-DLL3 se evaluaron en una muestra de SCLC que expresaba mRNA de DLL3 a una concentración de 20 µg/ml usando Ventana Discovery ultra (Ventana Medical Systems, Inc, Arizona) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. En síntesis, IHC se realizó en tejido fijado en formalina y embebido en parafina, y las secciones (4 µm) se tiñeron con anticuerpos anti-DLL3. Un ensayo IHC se llevó a cabo en una plataforma Ventana Discovery Ultra usando el protocolo RUO Discovery Universal. La tinción del anticuerpo anti-DLL3 se optimizó usando proteinasa K como recuperador de epítomos durante 12 minutos. El anticuerpo anti-DLL3 se incubó durante 60 minutos, seguido de sistema de detección de HQ anti-ratón y HRP anti HQ durante 12 minutos. Se realizaron controles negativos (anticuerpo IgG) para cada sección de tejido, que se trataron de manera idéntica a los portaobjetos de prueba.

La línea de células SHP77 de SCLC humano se usó como control positivo. Se adquirieron imágenes digitales de secciones de tejido completo usando un Leica SCN400 escáner de histología (Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido).

Un análisis de inmunohistoquímica de una muestra de SCLC humano con anticuerpos anti-DLL3 de ejemplo se muestra en la Figura 24.

Ejemplo 25: Determinación de niveles de expresión en líneas celulares de SCLC

La expresión en la superficie celular de los anticuerpos anti-DLL3 se cuantificó usando QIFIKIT (K0078; Dako). En síntesis, las líneas celulares de SCLC (SHP77, NCI-H82 y NCI-H2286) se etiquetaron con el anticuerpo anti-DLL3 (DL309, WO 2011/093097) o un anticuerpo irrelevante (control de isotipo) a 5 µg/ml. En un vial separado. Posteriormente, las células y esferas proporcionadas en el kit se etiquetaron en paralelo con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con fluoresceína. Las muestras se midieron en un fluorocitómetro BD Cantoll y, en consecuencia, la fluorescencia se correlaciona con la cantidad de anticuerpos anti-DLL3 fijados en las células y en las esferas. La Tabla 12 muestra moléculas DLL3 expresadas en la superficie celular de 3 líneas celulares de SCLC.

Tabla 13: Moléculas DLL3 expresadas en la superficie celular de líneas celulares de SCLC

LÍNEA DE CÉLULAS DE SCLC	Moléculas DLL3 en superficie celular/célula
SHP77 (ATCC®, CRL-2195™)	2061
NCI-H82 (HTB-175™)	824
NCI-H2286	129

Ejemplo 26: Determinación de sensibilidad de protocolo de IHC en bloques de líneas celulares de SCLC

Para evaluar la sensibilidad del protocolo de IHC, las líneas celulares de SCLC (SHP77, NCI-H82 y NCI-H2286) se procesaron como tejidos en hospitales, se fijaron

en formalina y posteriormente se embebieron en parafina.

Las líneas celulares de SCLC se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de la ATCC. Las células se rascaron de la placa y se fijaron en Formalina y, posteriormente, se agregaron a Histogel solubilizado (Thermo Fisher scientific, HG-4000-012) y se incubaron durante la noche a 4 °C, y luego, seguida de un procedimiento de embebido en parafina estándar realizado en un laboratorio de patología de rutina. En síntesis, el bloque de células se incubó en Etanol e Isopropanol antes de embeberse en parafina (roti-Plast, #6642.5). Se realizaron secciones del bloque del pelet celular y las secciones se tiñeron con el protocolo según se describe en Ejemplo 24. Los resultados mostrados en la Figura 25 demuestran que un protocolo de IHC con anticuerpo anti-DLL3 DLL3#5 puede detectar células con expresión de DLL3 muy baja.