AGENTES AGLUTINANTES DEL PSMA Y USOS DE ESTOS

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presenta electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 30 de abril de 2019, se denomina JBI5156WOPCT1_SL.txt y su tamaño es de 272.443 bytes.

CAMPO TÉCNICO

La descripción proporcionada en la presente descripción se relaciona con los anticuerpos monoclonales que se unen inmunoespecíficamente al antígeno de la membrana específica de próstata (PSMA, por sus siglas en inglés), los anticuerpos multiespecíficos que se unen inmunoespecíficamente al PSMA y el grupo de diferenciación 3 (CD3), y métodos para producir y usar los anticuerpos descritos.

ANTECEDENTES

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más común en los hombres en todo el mundo, y la sexta causa principal de muerte relacionada con el cáncer. A nivel mundial, existen aproximadamente 1.100.000 nuevos casos y 300.000 muertes cada año, que comprende 4 por ciento de todas las muertes por cáncer. Se estima que 1 de cada 6 hombres será diagnosticado con la enfermedad durante su vida. En los Estados Unidos, más del 90 % de los cánceres de próstata se encuentran en las etapas locales o regionales. En las primeras etapas, la tasa de supervivencia a 5

años se acerca al 100 %. Sin embargo, cuando el cáncer se ha metastatizado, la tasa de supervivencia a 5 años desciende al 28 % y sigue existiendo la necesidad de tratamientos eficaces para el cáncer de próstata en estado avanzado.

El antígeno de la membrana específica de próstata (PSMA), es una proteína de membrana tipo II que se expresa altamente en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN, por sus siglas en inglés), una condición en la que algunas células de la próstata han comenzado a verse y comportarse de manera anormal, y en cánceres de próstata primarios y metastáticos [Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A study of 184 cases. Cancer 1998;82 (11):2256–2261.]. La expresión del PSMA en tejidos con cáncer se correlaciona con el estadío de la enfermedad y el puntaje de Gleason [Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. Cancer Res 1997;57(12):2321–2324.]. La expresión del PSMA es también más alta en las células de cáncer de próstata de pacientes refractarios con hormonas [Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, KonchubaA, Schellhammer PF, Moriarty R. Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen- deprivation therapy. Urology 1996;48(2):326–334] y se ha demostrado que el aumento de la expresión del PSMA es un marcador independiente de la recurrencia de la enfermedad [Mitsiades CS, Lembessis P, Sourla A, Milathianakis C, TsintavisA, Koutsilieris M. Molecular staging by RT-pCR analysis for PSA and PSMA in peripheral blood and bone marrow samples is an independent predictor of time to biochemical failure followingradical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. Clin Exp Metastasis 2004;21(6):495–505.]. La expresión

del PSMA de alto nivel se correlaciona con la recurrencia temprana del antígeno específico de próstata (PSA, por sus siglas en inglés) en el cáncer de próstata tratado quirúrgicamente. Los niveles de expresión del PSMA se correlacionan con la agresividad de la enfermedad, y de esta manera respaldan firmemente el PSMA como un excelente objetivo para la caracterización del cáncer de próstata y la terapia posterior.

Los tratamientos actuales para el cáncer de próstata incluyen cirugía, radiación y terapias hormonales. Cuando los cánceres de próstata crecen a pesar de la disminución de los niveles de testosterona por la terapia hormonal, las opciones de tratamiento son limitadas. Típicamente, la vacuna contra el cáncer sipuleucel-T, un agente radiofármaco (tal como cloruro de radio-223), terapias hormonales secundarias (tal como abiraterona o enzalutamida) y/o quimioterapias (docetaxel y cabazitaxel) se añaden en secuencia a la terapia hormonal. Si bien cada uno de estos tratamientos puede retrasar el crecimiento del cáncer durante varios meses y paliar los síntomas producidos por la enfermedad, la enfermedad se vuelve eventualmente resistente a estos. Esto subraya la necesidad de un tratamiento más mejorado y terapias eficaces para el cáncer de próstata avanzado que expresa PSMA.

SUMARIO

En la presente descripción, se proporcionan anticuerpos que se unen de manera inmunoespecífica a *Pan troglodytes* (chimpancé, chimp), *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o humano, PSMA y fragmentos de unión al antígeno de estos. Se describen también polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos específicos para PSMA y los fragmentos de unión al antígeno

proporcionados, las células que expresan los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno proporcionados, así como también vectores asociados y anticuerpos multiespecíficos marcados de manera detectable y fragmentos de unión al antígeno. Adicionalmente, se describen métodos para usar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para PSMA y fragmentos de unión al antígeno podrían usarse para diagnosticar o monitorear la progresión, la regresión o la estabilidad del cáncer que expresa PSMA; para determinar si un paciente debe recibir o no tratamiento para cáncer; o para determinar si un sujeto sufre o no de un cáncer que expresa PSMA y, por lo tanto, podría ser susceptible al tratamiento con un agente terapéutico contra el cáncer específico para PSMA, tal como los anticuerpos multiespecíficos (biespecíficos, triespecíficos, etc.) contra PSMA y CD3 descritos en la presente descripción.

En la presente descripción se proporcionan además anticuerpos multiespecíficos que se unen inmunoespecíficamente al PSMA y CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos. Se describen también polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos PSMAxCD3 provistos, las células que expresan los anticuerpos proporcionados, así como también vectores asociados y anticuerpos multiespecíficos marcados de manera detectable. Adicionalmente, se describen métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos PSMA x CD3 podrían usarse para diagnosticar o monitorear la progresión, la regresión o la estabilidad del cáncer que expresa PSMA; para determinar si un paciente debe recibir o no tratamiento para cáncer; o para determinar si un sujeto sufre de un cáncer que expresa PSMA y, por lo tanto, podría ser susceptible al

tratamiento con un agente terapéutico contra el cáncer específico para PSMA, tal como los anticuerpos multiespecíficos PSMA x CD3 descritos en la presente descripción.

Anticuerpos específicos para PSMA

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 42 y 43, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 11, 12 y 13 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26 y 27, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.:

25, 26, 27, respectivamente, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 28, 29 y 30 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 22, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 22, respectivamente, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16, respectivamente, o las sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16, respectivamente, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núm. de ident.: 17, 18 y 19 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que

comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 38, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 38, respectivamente, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núm. de ident.: 39, 40 y 41 respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123 y 124, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprenden una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123 y 124, respectivamente, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núm. de ident.: 23, 12, y 24, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44 y 45, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que

comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44 y 45, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 46, 29 y 27, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 48, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 48, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 49, 50 y 51, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 52, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.:

36, 37 y 52, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 49, 50 y 51, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 11, 12 y 13, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32 y 33, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32 y 33, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de

cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 34, 12 y 35, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus, macaco, cyno) y/o PSMA humano, que comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54 y 55, respectivamente.

La invención proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54 y 55, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 35, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se unen específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende ciertas secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se describe en la presente descripción.

La invención también proporciona un anticuerpo aislado y fragmentos de este, que se une específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA humano, que comprende ciertas secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) y región de cadena ligera variable (VL) como se describe en la presente descripción.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 que se une específicamente a *Pan troglodytes, Macaca fascicularis* y/o PSMA

humano y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 que se une específicamente a Pan troglodytes, Macaca fascicularis y/o al PSMA humano y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, que comprenden ciertas secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, VH, VL, de cadena pesada o de cadena ligera como se describe en la presente descripción.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une

específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12 y 24, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12, y 24, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29, y 47, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50, y 51, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50, y 51, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12, y 13, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12, y 35, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12, y 35, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la

LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en

donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une

específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 74 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 61 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 74 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 61 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 66 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 67 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 66 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 67 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une

específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 64 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 64 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 62 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 63 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH)

de la sec. con núm. de ident.: 62 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 63 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 75 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 76 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 75 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 76 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 160 y una región variable de cadena ligera (VL) de la

sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 y fragmentos de este, que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 160 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 152 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 153.

La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este de la invención unido a un agente terapéutico o a un agente de formación de imágenes.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptado.

La invención también proporciona un polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo, la VL del anticuerpo o la VH del anticuerpo y la VL del anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona un vector que comprende el polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo, la VL del anticuerpo o la VH del anticuerpo y la VL del anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención.

La invención también proporciona un método para producir el anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en las que se expresa el anticuerpo, y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.

La invención también proporciona un método para tratar una enfermedad y/o cáncer que sobreexpresa el PSMA en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de la invención al sujeto con necesidad de este durante un periodo de tiempo suficiente para tratar el cáncer.

La invención también proporciona un kit que comprende el anticuerpo de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las curvas de valoración para los aciertos de selección de fagos anti-PSMA que se unen a las células LNCaP.

La Figura 2 muestra las curvas de titulación para los aciertos de selección de fagos anti-PSMA que se unen a las células HEK que expresan PSMA de chimpancé.

La Figura 3 muestra las curvas de valoración para los aciertos de selección de fagos anti-PSMA que se unen a células HEK que expresan PSMA de mono cynomolgus.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de SP34 con numeración secuencial. Los CDR en la definición de AbM (K.R. Abhinandan y A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839) están subrayados. Ser230 es el último residuo de HC presente en el Fab clivado con papaína. Los residuos 231-455 son de IGHG3_MOUSE (IgG3 de ratón, isoforma 2).

La Figura 5 muestra las variantes de adaptación del marco humano (“HFA”, por sus siglas en inglés) para V_H (sec. con núms. de ident.: 104, 102, 115 y 116, respectivamente, en orden de aparición) y V_L (sec. con núm. de ident.: 103, 117 y 105, respectivamente, en orden de aparición). La numeración es secuencial; Se subrayan las CDR en la definición de AbM; los residuos que difieren de SP34 se resaltan en negrita; las mutaciones reversas en variantes HFA se encuentran subrayadas y en negrita. La Figura describe las secuencias sp34 de VH y VL como la sec. con núms. de ident.; 128 y 129, respectivamente.

La Figura 6 muestra la unión de las variantes de HFA de SP34 a las células T humanas primarias.

La Figura 7 muestra la unión de las variantes de HFA de SP34 a las células T primarias de cynomolgus.

La Figura 8 muestra que las variantes de HFA de SP34 activan las células T humanas primarias in *vitro*. Los controles negativos se muestran en blanco y los controles positivos se muestran en color negro.

La Figura 9 muestra que las variantes de HFA de SP34 activan las células T primarias de cynomolgus in *vitro*. Los controles negativos se muestran en blanco y los controles positivos se muestran en color negro. El anticuerpo G11 sin reactividad cruzada con CD3e sirvió como un control negativo adicional.

Las Figuras 10A y 10B muestran la correlación de unión y activación por las variantes de HFA de SP34. Los valores promedio de unión e intensidad de fluorescencia media (“MFI”, por sus siglas en inglés) de CD69 para humanos (Figura 10A) y cynomolgus (Figura 10B) se trazaron uno contra el otro.

Las Figuras 11A-11F muestran las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 que se unen a las células LNCaP.

La Figura 12 muestra las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 a las células HEK que expresan PSMA de chimpancé.

La Figura 13 muestra las curvas de titulación para los anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 que se unen a las células HEK que expresan PSMA de mono Cynomolgus.

La Figura 14 muestra las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 que se unen a las células HEK que expresan PSMA humano.

La Figura 15 muestra las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 para células HEK que expresan PSMA humano en un ensayo de toxicidad de liberación de cromo mediado por células T.

La Figura 16 muestra la comparación de los brazos de CD3 de afinidad alta en los anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 en un ensayo de toxicidad de liberación de cromo mediado por células T.

La Figura 17 muestra las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 para células LNCaP en un ensayo de toxicidad de liberación de cromo mediado por células T.

La Figura 18 muestra las curvas de titulación para anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 para células HEK que expresan PSMA de mono cynomolgus en un ensayo de toxicidad de liberación de cromo mediado por células T.

Las Figuras 19A, 19B y 19C muestran curvas de titulación para PS3B27 y controlan anticuerpos biespecíficos para células HEK que expresan PSMA de mono cynomolgus y células LNCaP en un ensayo de toxicidad de liberación de cromo mediado por células T.

La Figura 20 muestra la activación de células T por PS3B27.

La Figura 21 muestra la prevención de la tumorigénesis de xenoinjertos de HEK293-PSMA tratados con PS3B27 o anticuerpos biespecíficos de control en ratones GSN humanizados con PBMC.

La Figura 22 muestra pesos corporales medios de ratones GSN humanizados con PBMC que tienen xenoinjertos de HEK293-PSMA con PS3B27 y tratamiento con anticuerpos biespecíficos de control.

La Figura 23 muestra la eficacia de PS3B27 y los anticuerpos biespecíficos de control en la prevención de la tumorigénesis de xenoinjertos de HEK293-PSMA/células T en ratones macho desnudos CD1.

La Figura 24 muestra el peso corporal de los ratones macho desnudos CD1 que tienen xenoinjertos HEK293-PSMA/células T tratados con PS3B27 y anticuerpos biespecíficos de control.

La Figura 25 muestra la estructura general de Fab de PSMB83 (también conocida como “PSMM84”) unido a un homodímero ECD del PSMA humano.

La Figura 26 muestra una vista cercana de las principales interacciones de PSMA con la cadena ligera PSMB83 (también conocida como “PSMM84”).

La Figura 27 muestra una vista cercana de las principales interacciones de PSMA con la cadena pesada PSMB83 (también conocida como “PSMM84”).

La Figura 28 muestra la comparación de residuos del epítopo de PSMB83 (también conocida como “PSMM84”) dentro de las secuencias humanas (sec. con núm. de ident.: 3), ratón (sec. con núm. de ident.: 157) y mono cynomolgus (cyno) (sec. con núm. de ident.: 2) PSMA. Los residuos de epítopo están sombreados y la divergencia de secuencia se muestra mediante un subrayado.

La Figura 29 muestra los residuos del parátopo de PSMB83 (también conocida como “PSMM84”). Las CDR están subrayadas y los residuos de parátopo están sombreados. La figura describe la sec. con núms. de ident. 158 y 159, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 30 muestra un mapa de interacción con contactos directos elaborados entre PSMA y PSMM83 (también conocida como “PSMM84”). Las interacciones de Van der Waals se muestran como líneas discontinuas y los enlaces de H son líneas continuas con flechas que señalan a los átomos de la cadena principal.

La Figura 31 muestra los niveles de expresión de clones de Fab de anti-PSMA derivados de PSMB83 en comparación con la expresión de PSMB83 parental. Los números de luminiscencia sin procesar se representaron contra la concentración logarítmica.

La Figura 32 muestra la unión al PSMA humano de clones de Fab de anti-PSMA derivados de PSMM83 en comparación con la unión de PSMB83 parental. Los números de luminiscencia sin procesar se representaron contra la concentración logarítmica.

La Figura 33 muestra la unión a PSMA de cyno de clones de Fab de anti-PSMA derivados de PSMB83 en comparación con la unión de PSMB83 parental. Los números de luminiscencia sin procesar se representaron contra la concentración logarítmica.

La Figura 34 muestra la unión al PSMA humano de clones de Fab de anti-PSMA derivados de PSMM83 en comparación con la unión de PSMB83 parental. Los valores de luminiscencia en bruto se normalizaron por los niveles de expresión de Fab.

La Figura 35 muestra la unión a PSMA de cyno de clones de Fab de anti-PSMA derivados de PSMB83 en comparación con la unión de PSMB83 parental. Los valores de luminiscencia en bruto se normalizaron por los niveles de expresión de Fab.

La Figura 36 muestra la unión de células de LNCAP de un subconjunto de anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 madurados por afinidad.

La Figura 37 muestra la unión de células de LNCAP de un subconjunto de anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 madurados por afinidad.

La Figura 38 muestra los resultados de unión de células PC3 negativas para PSMA de anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 madurados por afinidad.

La Figura 39 muestra los resultados de los anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 madurados por afinidad en un ensayo de destrucción de células funcionales.

La Figura 40 muestra la eficacia antitumoral de PS3B79 en xenoinjertos de próstata humana de LnCAP AR.TB en ratones NSG humanizados con células T. Los tumores LnCAP AR.TB subcutáneos se midieron dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio del tumor, expresado en mm^3 ± SEM (*, p<0,0001).

La Figura 41 muestra la eficacia antitumoral de PS3B90 en xenoinjertos de próstata humana de LnCAP AR.TB en ratones NSG humanizados con células T. Los tumores LnCAP AR.TB subcutáneos se midieron dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio del tumor, expresado en mm^3 ± SEM (*, p<0,001).

La Figura 42 muestra el efecto de PS3B72 (PSMA x CD3) en el modelo de tumor de próstata xenoinjerto LuCaP 86.2 derivado del paciente establecido en ratones NSG humanizados con células T. Los tumores LuCaP 86.2 subcutáneos se midieron dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio del tumor, expresado en mm^3 ± SEM (*, p<0,0001).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Todas las publicaciones, que incluyen, pero no se limitan a las patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan en la presente descripción como referencia como si se describieran completamente.

Debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante. A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

Si bien en la práctica y evaluación de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, los materiales y métodos ilustrativos se describen en la presente descripción. En la descripción y reivindicación de la presente invención se usa la siguiente terminología.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto determine claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células y lo similar.

"Unión específica" o "se une específicamente" o "se une" se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno o a un epítopo dentro del antígeno con mayor afinidad que a otros antígenos. Típicamente, el anticuerpo se une al antígeno o al epítopo dentro del antígeno con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de aproximadamente $5x10^{-8}$ M o menor, por ejemplo, aproximadamente $1x10^{-9}$ M o menor, aproximadamente $1x10^{-10}$ M o menor, aproximadamente $1x10^{-11}$ M o menor, o

aproximadamente $1x10^{-12}$ M o menor, típicamente con la K_D que es al menos cien veces menor que su K_D para que se una a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína). La constante de disociación puede medirse mediante el uso de procedimientos estándar. Sin embargo, los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno o al epítopo dentro del antígeno pueden tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes* (chimpancé, chimp). Si bien un anticuerpo monoespecífico se une específicamente a un antígeno o un epítopo, un anticuerpo biespecífico se une específicamente a dos antígenos distintos o dos epítopos distintos.

"Anticuerpos" se entiende en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina que incluyen anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominios y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno de la especificidad requerida. "Las moléculas de anticuerpo de longitud completa" comprenden dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por enlaces disulfuro así como multímeros de estas (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (que comprende los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse

adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro segmentos de FR, dispuestos desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Las "regiones determinantes de complementariedad (CDR)" son los "sitios de unión al antígeno" en un anticuerpo. Las CDR pueden definirse mediante el uso de varios términos: (i) Las regiones determinantes de complementariedad (CDR), tres en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), se basan en la variabilidad de secuencia (Wu y Kabat, (1970) J Exp Med 132:211-50; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed. Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md., 1991). (ii) "Regiones hipervariables", "HVR" o "HV", tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3), se refiere a las regiones de dominios variables de un anticuerpo cuya estructura es hipervariable, tal como se define por Chothia y Lesk (Chothia y Lesk, (1987) Mol Biol 196:901-17). La base de datos International ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_imgt_org) presenta una numeración estandarizada y definición de sitios de unión a antígenos. La correspondencia entre las delineaciones de CDR, HV e IMGT se describe en Lefranc et al., (2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77. El término "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" y "LCDR3", como se usa en la presente descripción, incluye las CDR definidas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, Kabat, Chothia o IMGT, a menos que se mencione explícitamente en la especificación.

Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. La IgA y la IgG se subclasifican, además, como los isotipos de IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, específicamente kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

“Fragmentos de anticuerpo” o “fragmentos de unión al antígeno” se refiere a una porción de una molécula de inmunoglobulina que retiene el sitio de unión al antígeno de la cadena pesada y/o la cadena ligera, tal como las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1, 2 y 3, las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1, 2 y 3, una región variable de la cadena pesada (VH), o una región variable de la cadena ligera (VL). El anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno incluyen los fragmentos bien conocidos de Fab, F(ab')2, Fd y Fv así como los anticuerpos de dominio (dAb) que consisten en un dominio VH. Los dominios VH y VL pueden unirse entre sí a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos de cadena simple, en donde los dominios VH/VL pueden aparearse intramolecularmente, o intermolecularmente en los casos en que los dominios VH y VL se expresan por constructos de anticuerpos de cadena simple separados, para formar un sitio de unión al antígeno monovalente, tal como un Fv de cadena simple (scFv) o un diacuerpo; descrito, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núms. WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 y WO1992/01047.

“Anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpos con una composición de aminoácidos simple en cada cadena pesada y en cada cadena ligera, excepto por posibles alteraciones muy conocidas, tales como la eliminación de lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se unen, típicamente, a un epítopo antigénico, a excepción de los anticuerpos monoclonales biespecíficos que se unen a dos epítopos antigénicos distintos. Los anticuerpos monoclonales pueden tener glicosilación heterogénea dentro de la población de anticuerpos. El anticuerpo monoclonal puede ser monoespecífico o multiespecífico, o monovalente, bivalente o multivalente. Un anticuerpo biespecífico se incluye en el término anticuerpo monoclonal.

“Anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al PSMA está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del PSMA). En el caso de los anticuerpos biespecíficos contra PSMA x CD3, el anticuerpo biespecífico se une específicamente al PSMA y CD3, y está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del PSMA y CD3. “Anticuerpo aislado” abarca los anticuerpos que se aíslan a una pureza más alta, tales como los anticuerpos que son 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % puros.

“Anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo en que los sitios de unión al antígeno se derivan a partir de especies no humanas y los marcos de la región variable se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas. El

anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones en el marco de manera que el marco no pueda ser una copia exacta de las secuencias génicas de línea germinal de inmunoglobulina humana o inmunoglobulina humana expresada.

‘‘Anticuerpo humano’’ se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera en el cual tanto el marco como el sitio de unión al antígeno se derivan a partir de secuencias de origen humano. Si el anticuerpo contiene una región constante o una porción de la región constante, la región constante también se deriva a partir de secuencias de origen humano.

El anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que se ‘‘derivan a partir de’’ secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulinas reordenados. Tales sistemas ilustrativos son genotecas de genes de inmunoglobulinas humanas presentados en fago, y animales transgénicos no humanos tales como ratones o ratas que portan loci de inmunoglobulinas humanas como se describe en la presente descripción. ‘‘Anticuerpo humano’’ puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulinas reordenados debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o a la introducción intencional de sustituciones en el armazón o en el sitio de unión al antígeno, o ambas. Típicamente, el ‘‘anticuerpo humano’’ es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico en la secuencia de aminoácido a una secuencia de aminoácido codificada por inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de

inmunoglobulinas reordenados. En algunos casos, el ‘‘anticuerpo humano’’ puede contener secuencias de marco de consenso derivadas del análisis de secuencias de marco humano, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, o la HCDR3 sintética incorporada en bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana presentadas en fagos, por ejemplo, como se describe en Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96, y en la publicación de la patente internacional núm. WO2009/085462.

Los anticuerpos humanos derivados a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas pueden generarse mediante el uso de sistemas, tales como la presentación en fago que incorpora CDR sintéticas y/o marcos sintéticos, o pueden someterse a mutagénesis in vitro para mejorar las propiedades del anticuerpo, lo que da como resultado anticuerpos que no se expresan por el repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

Los anticuerpos en que los sitios de unión del antígeno se derivan a partir de una especie no humana no se incluyen en la definición de ‘‘anticuerpo humano’’.

‘‘Recombinante’’ se refiere a ADN, anticuerpos y otras proteínas que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes cuando segmentos de diferentes fuentes se unen para producir ADN, anticuerpos o proteínas recombinantes.

‘‘Epítopo’’ se refiere a una porción de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo. Típicamente, los epítopos consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas (tales como polares, no polares o hidrófobas) de entidades tales como aminoácidos o cadenas laterales de polisacáridos, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede componerse de aminoácidos contiguos y/o

discontiguos que forman una unidad espacial conformacional. En un epítopo discontiguo, los aminoácidos de porciones diferentes de la secuencia lineal del antígeno están muy próximos en el espacio tridimensional mediante el plegado de la molécula de proteína. El ‘‘epítopo’’ de anticuerpo depende de la metodología usada para identificar el epítopo.

‘‘Parátopo’’ se refiere a una porción de un anticuerpo a que se une específicamente a un antígeno. Un parátopo puede ser de naturaleza lineal o puede ser discontinuo, formado mediante una relación espacial entre aminoácidos no contiguos de un antígeno en lugar de una serie lineal de aminoácidos. Un ‘‘parátopo de cadena ligera’’ y un ‘‘parátopo de cadena pesada’’ o ‘‘residuos de aminoácidos de parátopo de cadena ligera’’ y ‘‘residuos de aminoácidos de parátopo de cadena pesada’’ se refieren a residuos de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos en contacto con antígeno respectivamente, o en general, ‘‘residuos de parátopos de anticuerpos’’ se refieren a los aminoácidos de anticuerpos que están en contacto con el antígeno.

‘‘Biespecífico’’ se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a dos antígenos distintos o a dos epítopos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo biespecífico puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como de ser humano o de mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítopo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

‘‘Multiespecífico’’ se refiere a un anticuerpo, que se une específicamente a dos o más antígenos distintos o a dos o más epítopos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo biespecífico puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies

(homólogos), tales como de ser humano o de mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítopo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

"Variante" se refiere a un polipéptido o un polinucleótido que difiere de un polipéptido de referencia o un polinucleótido de referencia en una o más modificaciones, por ejemplo, una o más sustituciones, inserciones o deleciones.

"Vector" se refiere a un polinucleótido capaz de duplicarse dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre tales sistemas. Los polinucleótidos de vector típicamente contienen elementos, tales como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o mantenimiento de estos polinucleótidos en un sistema biológico, tales como una célula, virus, animal, planta y sistemas biológicos reconstituidos que utilizan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido del vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estos, monocatenario o bicatenario.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que puede usarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido presente en el vector de expresión.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula que comprende una cadena de nucleótidos unida covalentemente por una cadena principal de azúcar y fosfato u otra química covalente equivalente. Los ADN y ARN de cadena doble y simple son ejemplos típicos de polinucleótidos.

"Polipéptido" o "proteína" se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un

polipéptido. Los polipéptidos pequeños de una cantidad menor que 50 aminoácidos podrían denominarse “péptidos”.

“Citometría de flujo” es una tecnología que se usa para analizar las características físicas y químicas de las partículas en un fluido a medida que pasa a través de por lo menos un láser. Los componentes de células son marcados fluorescentemente y luego son excitados por el láser para emitir luz en diferentes longitudes de onda (Adán, et al, Critical Reviews in Biotechnology (2016) 1549-7801).

“Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id)” es un anticuerpo que reconoce los determinantes antigénicos (p. ej., el parátopo o las CDR) del anticuerpo. En la técnica se conoce, generalmente, el proceso para producir o preparar un anticuerpo antiidiotípico. (Lathey, J. et al Immunology 1986 57(1):29-35). El anticuerpo anti-Id puede ser bloqueante o no bloqueante de antígeno. El anticuerpo anti-Id bloqueante de antígeno puede usarse para detectar el anticuerpo libre en una muestra (p. ej., anticuerpo anti-PSMA, anti-CD3 o anticuerpo biespecífico contra PSMA X CD3 de la invención descritos en la presente descripción). El anti-Id no bloqueante puede usarse para detectar el anticuerpo total (libre, parcialmente unido al antígeno, o totalmente unido al antígeno) en una muestra. Un anticuerpo anti-Id puede prepararse mediante la inmunización de un animal con el anticuerpo el cual se prepara el anticuerpo anti-Id. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo antiidiotípico se usa para detectar el nivel de los anticuerpos terapéuticos (p. ej., anti-PSMA, anti-CD3 o el anticuerpo biespecífico contra PSMA X CD3 de la invención descritos en la presente descripción) en una muestra.

Un anticuerpo anti-Id puede usarse, además, como un inmunógeno para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, lo que produce un denominado anticuerpo

anti-anti-Id. Un anticuerpo anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, que indujo el anticuerpo anti-Id. Así, al usar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los anticuerpos anti-Id pueden variarse (lo que produce, de esta manera, variantes de anticuerpos anti-Id) y/o derivatizarse mediante cualquier técnica adecuada, tales como las descritas en otra parte de la presente descripción con respecto a los anticuerpos que se unen específicamente al PSMA o CD3, o los anticuerpos biespecíficos contra PSMA x CD3.

PSMA se refiere al antígeno de membrana específico de la próstata. La secuencia de aminoácidos del PSMA de *Pan troglodytes* (también denominado chimpancé o chimp) se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1. El dominio extracelular abarca los residuos 44 - 750, el dominio transmembrana abarca los residuos 20 - 43 y el dominio citoplásmico abarca los residuos 1 - 19 de la sec. con núm. de ident.: 1. La secuencia de aminoácidos del PSMA de *Macaca fascicularis* (también denominado mono cynomolgus, macaco o cyno) se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2. El dominio extracelular abarca los residuos 44 - 750, el dominio transmembrana abarca los residuos 20 - 43 y el dominio citoplásmico abarca los residuos 1 - 19 de la sec. con núm. de ident.: 2. La secuencia de aminoácido del PSMA humano se muestra en la sec. con núm. de ident.: 3. El dominio extracelular abarca los residuos 44 - 750, el dominio transmembrana abarca los residuos 20 - 43 y el dominio citoplásmico abarca los residuos 1 - 19 de la sec. con núm. de ident.: 3.

CD3 se refiere al receptor de antígeno de células T. En toda la especificación, ‘‘específico contra el CD3’’ se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al

complejo receptor de células T. Más específicamente, los anticuerpos se unen al polipéptido de CD3-épsilon, que junto con CD3-gamma, -delta y -zeta, y los heterodímeros alfa/beta y gamma/delta del receptor de células T forman el complejo receptor de CD3 de células T. Este complejo desempeña un papel importante en el acoplamiento del reconocimiento de antígenos a varias vías de transducción de señales intracelulares. El complejo CD3 media la transducción de señales, lo que resulta en la activación y proliferación de las células T. El CD3 es requerido para la respuesta inmune.

"En conjunto con" significa que dos o más agentes terapéuticos se administran a un sujeto juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes únicos o secuencialmente como agentes únicos en cualquier orden.

"Sobreexpresar", "sobreexpresado" y "que sobreexpresa" se refieren indistintamente a una muestra, tal como una célula cancerosa, célula maligna o tejido canceroso que tiene niveles mediblemente más altos del PSMA cuando se compara con una muestra de referencia. La sobreexpresión puede ser causada por la amplificación génica o por la transcripción o traducción incrementada. La expresión y sobreexpresión de proteína en la muestra pueden medirse mediante el uso de ensayos conocidos, por ejemplo, ELISA, inmunofluorescencia, citometría de flujo o radioinmunoensayo en células vivas o lisadas. La expresión y la sobreexpresión de un polinucleótido en la muestra pueden medirse, por ejemplo, usando técnicas de hibridación *in situ* fluorescente, transferencia de Southern o PCR. Una proteína o un polinucleótido se sobreexpresa cuando el nivel de la proteína o el polinucleótido en la muestra es al menos 1,5 veces más alto en comparación con la muestra de referencia. La selección de la muestra de referencia es muy conocida.

‘‘Muestra’’ se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Las muestras ilustrativas son de fluidos biológicos, tales como sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, saliva, fluido quístico, lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosas de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, fluidos ascíticos, tales como los asociados con tumores no sólidos, fluidos de las cavidades pleurales, pericardiales, peritoneales, abdominales y otras cavidades corporales, fluidos recolectados por lavado bronquial, soluciones líquidas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo de células y órganos que incluyen medio acondicionado de células u órganos, fluidos de lavado y lo similar, biopsias de tejido, aspiraciones con aguja fina o tejido tumoral recortado quirúrgicamente.

Una ‘‘célula cancerosa’’ o una ‘‘célula tumoral’’, como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula cancerosa, precancerosa o transformada, ya sea in vivo, ex vivo o en cultivo de tejido, que tiene cambios fenotípicos espontáneos o inducidos. Estos cambios no implican necesariamente la captación de nuevo material genético. Si bien la transformación puede surgir de la infección con un virus transformante y la incorporación de un ácido nucleico genómico nuevo o la captación de ácido nucleico exógeno, esta puede surgir, además, espontáneamente o después de la exposición a un carcinógeno y, de esta manera, muta a un gen endógeno. La transformación/cáncer se ejemplifica mediante cambios morfológicos, inmortalización de células, control de crecimiento aberrante, formación de focos, proliferación, enfermedad maligna, modulación de niveles de marcadores tumorales específicos, invasividad, crecimiento tumoral en huéspedes animales adecuados, tales como ratones desnudos, y

lo similar, in vitro, in vivo y ex vivo (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3.ª ed. 1994)). A menos que se indique lo contrario, cualquier valor numérico, como en una concentración o intervalo de concentraciones descrito en la presente descripción, se debe entender como que está modificado en todos los casos por el término ‘‘aproximadamente’’. Por lo tanto, un valor numérico incluye, típicamente, ± 10 % del valor mencionado. Por ejemplo, una concentración de 1 mg/ml incluye 0,9 mg/ml a 1,1 mg/ml. De la misma manera, un rango de concentración de 1 % a 10 % (p/v) incluye 0,9 % (p/v) a 11 % (p/v). Como se usa en la presente descripción, el uso de un rango numérico incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango, incluidos enteros dentro de dichos rangos y fracciones de los valores a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los ‘‘antígenos efectores’’ son antígenos de las células del sistema inmunitario que pueden estimular o desencadenar citotoxicidad, fagocitosis, presentación de antígenos, liberación de citocinas. Tales antígenos efectores, proceden de, por ejemplo pero sin limitarse a, células T y células destructoras naturales (NK). Los ejemplos de características específicas para antígenos efectores incluyen pero no se limitan a subunidades CD3 o CD3 tales como CD3ε para células T y CD16 para células NK. Tales moléculas de la superficie celular de células efectoras son adecuadas para mediar la muerte celular. Las células efectoras son células del sistema inmunitario que pueden estimular o desencadenar citotoxicidad, fagocitosis, presentación de antígenos, liberación de citocinas. Tales células efectoras son, por ejemplo, pero no se limitan a, células T, células destructoras naturales (NK), granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células presentadoras de antígeno. Los ejemplos de características específicas para

células efectoras incluyen pero no se limitan a subunidades CD2, CD3 y CD3 tales como CD3e, CD5, CD28 y otros componentes del receptor de células T(TCR) para células T; CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C y NKG2D, DNAM, NCR para células NK; CD18, CD64 y CD89 para granulocitos; CD18, CD32, CD64, CD89 y receptor de manosa para monocitos y macrófagos; CD64 y receptor de manosa para células dendríticas; así como CD35. En ciertas modalidades de las invenciones, esas especificidades, es decir moléculas de la superficie celular, de células efectoras son adecuadas para mediar la muerte celular después de la unión de moléculas biespecíficas o multiespecíficas a tal molécula de superficie celular y, de esta manera, inducir la citólisis o apoptosis.

"Anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3", "anticuerpo PSMA/CD3", "anticuerpo biespecífico anti-PSMA×CD3" o "anticuerpo anti-PSMA×CD3" se refiere a una molécula que comprende al menos un dominio de unión que se une específicamente al PSMA y al menos un dominio de unión que se une específicamente al CD3. Los dominios que se unen específicamente al PSMA y CD3 son, típicamente, pares VH/VL. El anticuerpo biespecífico anti-PSMA×CD3 puede ser monovalente en términos de su unión al PSMA o CD3.

"Valente" se refiere a la presencia de una cantidad especificada de sitios de unión específicos para un antígeno en una molécula. Como tales, los términos "monovalente", "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" se refieren a la presencia de uno, dos, cuatro y seis sitios de unión, respectivamente, específicos para un antígeno en una molécula. "Multivalente" se refiere a la presencia de dos o más sitios de unión específicos para un antígeno en una molécula.

“Una célula T de CD4+ o CD8+ específica de antígeno” se refiere a una célula T de CD4+ o CD8+ activada por un antígeno específico, o un epítopo inmunoestimulante de este.

“Sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. “Animal no humano” incluye todos los vertebrados no humanos, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Excepto cuando se indique, los términos “paciente” o “sujeto” se usan indistintamente.

La numeración de los residuos de aminoácidos en la región constante del anticuerpo en toda la especificación está de acuerdo con el índice de la UE según se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), a menos que se indique explícitamente lo contrario.

En la presente descripción se usan códigos para aminoácidos de una y tres letras convencionales como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamato	Gln	E
Glutamina	Glu	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K

Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Composiciones de materia

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de estos que se unen específicamente al PSMA y anticuerpos multiespecíficos que se unen específicamente al PSMA y CD3 y fragmentos de estos. La presente invención proporciona polipéptidos y polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención o ácidos nucleicos complementarios de estos, vectores, células huésped, y los métodos para prepararlos y usarlos.

Los anticuerpos y fragmentos de estos que se unen a los PSMA se unen al antígeno objetivo del chimpancé. En una modalidad, los anticuerpos y fragmentos de estos se unen a los antígenos objetivo del PSMA humano y macaco con afinidades dentro de 5 veces entre sí. En otras palabras, la diferencia en la unión del anticuerpo es menor que un múltiplo de 5. En este caso, la molécula de anticuerpo idéntica puede usarse tanto para la evaluación preclínica de seguridad, actividad y/o perfil farmacocinético del PSMA en primates y como un fármaco en seres humanos. Dicho en otras palabras, la misma molécula específica del PSMA puede usarse en estudios preclínicos con animales, así como en estudios clínicos en seres humanos. Esto lleva a resultados altamente comparables y una potencia predictiva mucho mayor de los estudios en animales en comparación con las moléculas sustitutas específicas de especies. Dado que el dominio

PSMA es específico de especies cruzadas, es decir, reactivo con los antígenos humanos y macacos, el anticuerpo o fragmentos de estos de la invención pueden usarse tanto para la evaluación preclínica de seguridad, actividad y/o perfil farmacocinético de estos dominios de unión en primates y de manera idéntica como fármacos en seres humanos.

La presente invención también proporciona anticuerpos multiespecíficos que se unen específicamente al PSMA. De acuerdo con la invención, un anticuerpo biespecífico, es decir, bifuncional, puede usarse para acoplar dos objetivos terapéuticos diferentes o realizar dos funciones distintas. Tales anticuerpos pueden usarse por ejemplo para reclutar una célula efectora inmunitaria, p. ej., célula T o NK, hacia una célula objetivo en particular. Se conocen y se investigan varias moléculas en base a fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, para la terapia del cáncer. Un anticuerpo multiespecífico de la invención puede ser un anticuerpo triespecífico para enfoque doble en las células tumorales; estas son estructuras trifuncionales que pueden diseñarse para enfocar dos objetivos/epítopos diferentes en la célula tumoral y con la tercera funcionalidad unirse con alta afinidad con células T o células NK. Los anticuerpos triespecíficos que se enfocan en dos epítopos tumorales distintos y que se acoplan a las células T o NK lisan las células tumorales que expresan ambos objetivos. Tales moléculas pueden generarse por formatos de anticuerpos conocidos en la técnica y se describen completamente. (WO20151842071, WO2015158636, WO2010136172, WO2013174873). En una modalidad de anticuerpo triespecífico de la invención, el anticuerpo multiespecífico puede ser específico para PSMA y un segundo antígeno distinto en la misma u otra célula tumoral y además específico para un célula efectora, en particular una célula T o una célula NK.

La presente invención también proporciona un anticuerpo biespecífico contra PSMA × “antígeno efector”. En una modalidad, el antígeno efector del anticuerpo biespecífico contra PSMA × “antígeno efector” es CD3. Se ha descubierto en la presente invención que es posible generar un anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3 en donde la molécula idéntica puede usarse en pruebas preclínicas en animales, así como los estudios clínicos e incluso en terapia en humanos. Esto es debido a la identificación del anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3, que, además de unirse al PSMA humano y CD3 humano, respectivamente, también se une a los homólogos de antígenos de chimpancé y macacos. El anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3 de la invención puede usarse como un agente terapéutico contra diversas enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, el cáncer. En vista de lo anterior, desaparece la necesidad de construir un anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3 de objetivo sustituto para la prueba en una especie filogenéticamente distante (de humanos). Como resultado, la molécula idéntica puede usarse en pruebas preclínicas en animales como se pretende administrar a humanos en pruebas clínicas así como después de la aprobación del mercado y la administración de fármacos terapéuticos. La capacidad de usar la misma molécula para ensayos preclínicos con animales como en la administración posterior a los seres humanos elimina virtualmente, o al menos reduce en gran medida, el peligro de que los datos obtenidos en los ensayos preclínicos con animales han limitado la aplicabilidad al caso humano. En resumen, la obtención de datos preclínicos de seguridad en animales usando la misma molécula como se administrará realmente a los humanos hace mucho para garantizar la aplicabilidad de los datos en un escenario relevante para humanos. En contraste, en

los enfoques convencionales usando moléculas sustitutas, dichas moléculas sustitutas tienen que adaptarse molecularmente al sistema de prueba en animales usado para la evaluación preclínica de seguridad. Por lo tanto, la molécula para usarse en terapia de hecho difiere en secuencia y probablemente también en la estructura de la molécula sustituta usada en ensayos preclínicos en los parámetros farmacocinéticos y/o actividad biológica, con la consecuencia de que los datos obtenidos en los ensayos preclínicos con animales han limitado la aplicabilidad/transferibilidad al caso humano. El uso de moléculas sustitutas requiere la construcción, producción, purificación y caracterización de un constructo completamente nuevo. Esto conduce a costos adicionales de desarrollo y tiempo necesario para obtener esa molécula. En resumen, los sustitutos tienen que desarrollarse por separado además del fármaco real que se usará en la terapia humana, de manera que deben llevarse a cabo dos líneas de desarrollo para dos moléculas. Por lo tanto, una ventaja importante del anticuerpo biespecífico contra PSMAxCD3 de la invención que exhibe especificidad de especie cruzada descrita en la presente descripción es que la molécula idéntica puede usarse para agentes terapéuticos en humanos y en ensayos preclínicos con animales.

Otra ventaja importante del anticuerpo y el anticuerpo multiespecífico de la invención es su aplicabilidad para ensayos preclínicos en varios primates. El comportamiento de un candidato a un fármaco en animales debería ser idealmente indicativo del comportamiento esperado del candidato a un fármaco tras la administración a seres humanos. Como resultado, los datos obtenidos de tales ensayos preclínicos deberían, por lo tanto, tener generalmente un alto poder predictivo para el caso humano Sin embargo, como se ha aprendido del trágico resultado de la reciente prueba clínica de

fase I en TGN1412 I (un anticuerpo monoclonal CD28), un candidato a un fármaco puede actuar de manera diferente en una especie de primates que en humanos: Mientras que en ensayos preclínicos de dicho anticuerpo, no se han observado efectos adversos o solo se han observado efectos adversos limitados en estudios en animales realizados con monos cynomolgus, seis pacientes humanos desarrollaron insuficiencia orgánica múltiple tras la administración de dicho anticuerpo (Lancet 368 (2006), 2206-7). Los resultados de estos eventos negativos dramáticos y no deseados sugieren que puede no ser suficiente limitar los ensayos preclínicos solamente a una especie (primates no chimpancé). El hecho de que el anticuerpo y el anticuerpo multiespecífico descritos se unen específicamente al PSMA de chimpancé y de monos cynomolgus puede ayudar a superar los problemas planteados en el caso mencionado anteriormente. En consecuencia, la presente invención proporciona medios y métodos para minimizar las diferencias de especies en los efectos cuando se están desarrollado y probando fármacos para terapia humana.

Además, con el anticuerpo y el anticuerpo multiespecífico de la invención ya no es necesario adaptar el animal de prueba al fármaco candidato destinado para la administración a humanos, tales como por ejemplo la creación de animales transgénicos. La especificidad de especie cruzada del anticuerpo PSMA o anticuerpo multiespecífico de la invención permite que el anticuerpo se use directamente para el ensayo preclínico en primates no chimpancés sin ninguna manipulación genética de los animales. Como es bien conocido por los expertos en la técnica, los métodos en los cuales el animal de prueba se adapta al fármaco candidato siempre tiene el riesgo de que los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos de seguridad sean menos representativos y predictivos para los seres humanos debido a la modificación del animal. Por ejemplo, en animales transgénicos, las

proteínas codificadas por los transgenes son frecuentemente altamente sobreexpresados. Por lo tanto, los datos obtenidos para la actividad biológica de un anticuerpo contra este antígeno de proteína pueden estar limitados en su valor predictivo para los seres humanos en el que la proteína se expresa en niveles mucho menores y más fisiológicos.

Una ventaja adicional de los usos del anticuerpo de la invención que exhiben especificidad de especies cruzadas es el hecho de que el uso de chimpancés, una especie en peligro, puede evitarse para la prueba con animales. Los chimpancés son los parientes más cercanos a los seres humanos y se agruparon recientemente en la familia de homínidos basados en los datos de secuenciación del genoma (Wildman et al., PNAS 100 (2003), 7181). Por lo tanto, los datos obtenidos con chimpancés se consideran generalmente como altamente predictivos para los seres humanos. Sin embargo, debido a su condición de especie en peligro, el número de chimpancés, que puede usarse para experimentos médicos, está muy restringido. Como se indicó anteriormente, el mantenimiento de los chimpancés para las pruebas en animales es, por lo tanto, costoso y éticamente problemático. Los usos del anticuerpo de la invención evitan las objeciones éticas y la carga financiera durante los ensayos preclínicos sin detrimento de la calidad, es decir aplicabilidad, de los datos obtenidos de prueba en animales. En vista de esto, los usos del anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al PSMA de la invención proporcionan una alternativa razonable para los estudios en chimpancés.

Aún otra ventaja del anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al PSMA de la invención es la capacidad de extraer múltiples muestras de sangre cuando se usa como parte de ensayos preclínicos en animales, por ejemplo en el curso de estudios farmacocinéticos en animales. Las extracciones de

sangre múltiples pueden obtenerse mucho más fácilmente con un primate no chimpancé que con animales inferiores, por ejemplo, un ratón. La extracción de múltiples muestras de sangre permite la prueba continua de los parámetros sanguíneos para determinar los efectos biológicos inducidos por el anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al PSMA de la invención. Además, la extracción de múltiples muestras de sangre permite al investigador evaluar el perfil farmacocinético del anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al PSMA de la invención como se define en la presente descripción. Además, los efectos secundarios potenciales, que pueden ser inducidos por el anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al PSMA de la invención reflejados en los parámetros de sangre pueden medirse en diferentes muestras de sangre extraídas durante el curso de la administración del anticuerpo.

Esto permite determinar el perfil de toxicidad potencial del anticuerpo o anticuerpo multiespecífico que se une a PSMA de la invención como se define en la presente descripción.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA, tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes propiedades:

a) se une al dominio extracelular (ECD) del PSMA de *Pan troglodytes* con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 25 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C,

b) se une a las células LNCaP con una EC_{50} calculada de 20 nM o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* con una EC_{50} calculada de 40 nM o menor, en donde la diferencia en la EC_{50} calculada entre las células LNCaP que se unen y las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* que se unen es menor que 5 veces, y en donde la EC_{50} calculada se mide en un ensayo de unión de células completas a 0 °C usando citometría de flujo,

c) se une al ECD del PSMA recombinante de humanos (sec. con núm. de ident.: 7), *Pan troglodytes* (sec. con núm. de ident.: 4) y *Macaca fascicularis* (sec. con núm. de ident.: 5) con un equilibrio constante de disociación (K_D) de 12 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 de ensayo de resonancia de plasmón de superficie de Proteon a +25 °C;

d) muestra la muerte mediada por células T de células LNCaP, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con CD3B219 de anticuerpo anti-CD3, en donde la muerte mediada por células T se mide por cromo-51 o por ensayo de activación de caspasa 3/7, o

e) reconoce un epítopo conformacional en donde el epítopo comprende los residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 del PSMA humano (sec. con núm. de ident.: 3)

Tales anticuerpos o fragmentos de estos ilustrativos son anticuerpos de PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126,

PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, y PSMB365, descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo del PSMA aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA une el ECD del PSMA de chimpancé con una constante de disociación equilibrio (K_D) de aproximadamente 30 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema de ProteOn XPR36 a +25 °C como se describe en el Ejemplo 8. Los ensayos para medir la afinidad mediante SPR usando Proteon incluyen ensayos donde el ensayo se realiza a temperatura ambiente (*p. ej.,* en o cerca de 25 °C), en donde el anticuerpo capaz de unirse al ECD del PSMA de chimpancé es capturado en el chip de sensor de Proteon por un anticuerpo anti-Fc (*p. ej.* (Jackson ImmunoResearch laboratories, núm. cat. 109-005-098) a un nivel aproximadamente 100RU, seguido por inyección de ECD del PSMA recombinante, y la recolección de datos de asociación y disociación a una velocidad de flujo de 50 µl/min.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo PSMA aislado o fragmento de unión de este que se une específicamente al PSMA se une a las células LNCaP con un EC_{50} de 20 nM o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA cyno con un EC_{50} de 40 nM o menor, en donde la diferencia en EC_{50} calculado entre la unión de células LNCaP y la

unión de células HEK que expresan PSMA de cyno es menor que 5 veces, en donde la célula de unión se mide usando FACS como se describe en el Ejemplo 7. Los ensayos para medir la unión por células enteras por FACS se realizan a una densidad de 200.000 células por pocillo durante 1 hora en hielo. La cantidad de anticuerpo unido a células enteras se detecta con un anticuerpo secundario etiquetado, por ejemplo, con un anticuerpo de RPE de kappa antihumano de ratón (Life Technologies, núm. cat. MH10514) por un citómetro de flujo de matriz de FACS.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas que se enumeran más abajo, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA se une al ECD del PSMA humano, de chimpancé y de cyno con una constante disociación de equilibrio (K_D) de 12 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C como se describe en el Ejemplo 8 Los ensayos para medir la afinidad mediante SPR usando Proteon incluyen ensayos donde el ensayo se realiza a temperatura ambiente (*p. ej.,* en o cerca de 25 °C), en donde el anticuerpo capaz de unirse al ECD del PSMA de chimpancé es capturado en el chip de sensor de Proteon por un anticuerpo anti-Fc (*p. ej.* (Jackson ImmunoResearch laboratories, núm. cat. 109-005-098) a un nivel aproximadamente 100RU, seguido por inyección de ECD del PSMA recombinante, y la recolección de datos de asociación y disociación a una velocidad de flujo de 50 µl/min.

La afinidad medida de una interacción anticuerpo/PSMA particular puede variar si se mide en condiciones diferentes (p. ej., osmolaridad, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (p. ej., K_D, K_{on}, K_{off}) se realizan, típicamente, en

condiciones estandarizadas y con un regulador estandarizado, tal como el regulador descrito en la presente descripción. El experto en la técnica podrá apreciar que el error interno de las mediciones de afinidad, por ejemplo, cuando se usa Biacore 3000 o ProteOn (medido como desviación estándar, SD), puede estar, típicamente, entre 5-33 % para las mediciones dentro de los límites típicos de detección. Por lo tanto, el término ‘‘aproximadamente’’ en el contexto de K_D refleja la desviación estándar típica en el ensayo. Por ejemplo, la SD típica para una K_D de $1x10^{-9}$ M es hasta $+0,33x10^{-9}$ M.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas indicadas más adelante, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA muestra la muerte mediada por células T de células LNCaP que expresan PSMA humano, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de cyno cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con un CD3B219 de anticuerpo anti-CD3, en donde la muerte mediada por células T se mide por liberación de cromo 51 y las células objetivo se cultivan con células T preactivadas en una relación de 5:1 durante 18-24 horas o mediante el ensayo de activación de caspasa 3/7 como en el Ejemplo 6. En algunas modalidades, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA muestra la muerte mediada por células T de células C42 y LNCaP que expresan PSMA humano con una EC_{50} de aproximadamente 0,3–0,5 nM o menor y 0,12–0,03 nM o menor, respectivamente, cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con CD3B219 de anticuerpo anti-CD3, en donde la muerte mediada de células T se mide por el ensayo de activación de caspasa 3/7 como en el Ejemplo 9. Las células que

expresan PSMA objetivo se cultivan con células T preactivadas en una relación de 1:3 durante 18-24 horas y el clivaje del sustrato de Caspasa 3/7 agregado resulta en un colorante de ADN fluorescente, con fluorescencia restringida al núcleo celular.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más adelante, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente al PSMA reconoce un epítopo conformacional, en donde el epítopo comprende los residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 según lo determinado por cristalografía de rayos X como se describe en el Ejemplo 13.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 contenido dentro de una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, 160, 138, 139 o 140, en donde la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 se definen por Chothia, Kabat o IMGT.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo o fragmentos de este que se unen específicamente al PSMA de la invención comprende la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 61,

63, 65, 67, 69, 71, 73, 76, 78, 142, 143, o 144, en donde la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR se definen por Chothia, Kabat o IMGT.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumerada incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende

la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 8, 14, 20, 25, 31, 36, 46, 53 o 122;

la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 9, 15, 21, 26, 32, 37, 42, 44, 54, 123, 130, 134, 135, o 137; y

la HCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 10, 16, 22, 27, 33, 38, 43, 45, 48, 52, 55, 124.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumerada incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende

la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 11, 17, 23, 28, 34, 39, 46, 49, o 131;

la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 12, 18, 29, 40, 50, o 133; y

la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 13, 19, 24, 30, 35, 41, 47, 51, 132, o 136.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumerada incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende

la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 8, 14, 20, 25, 31, 36, 53, o 122;

la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 9, 15, 21, 26, 32, 37, 42, 44, 54, 123, 130, 134, 135, o 137;

la HCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 10, 16, 22, 27, 33, 38, 43, 45, 48 51, 52, 55, o 124;

la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 11, 17, 23, 28, 34, 39, 46, 49, o 131;

la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 12, 18, 29, 40, 50, o 133; y

la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 13, 19, 24, 30, 35, 41, 47, 51, 132, o 136.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de

sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 22, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 25, 26 y 27, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 25, 130 y 27, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 25, 134 y 27, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 25, 135 y 27, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 25, 137 y 27, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 31, 32 y 33, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 38, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 31, 42 y 43, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 31, 44 y 45, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 48, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 36, 37 y 52, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 53, 54 y 55, respectivamente; o

sec. con núms. de ident.: 122, 123, y 124, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de

sec. con núms. de ident.: 11, 12 y 13, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 17, 18 y 19, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 28, 29 y 30, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 28, 29 y 136, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 28, 133 y 132, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 34, 12 y 35, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 39, 40 y 41, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 46, 29 y 47, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 49, 50 y 51, respectivamente;

sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 35, respectivamente; o

sec. con núms. de ident.: 131, 29 y 132, respectivamente;

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12 y 24, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12, y 24, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12 y 35, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 49, 50 y 51, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29 y 47, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50 y 51, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12 y 35, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133 y 132, respectivamente. En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núms. de ident.: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, 160, 138, 139, o 140.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) o la sec. con núms. de ident.: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 76, 78, 142, 143, o 144.

Las secuencias de VH, VL, HCDR y LCDR de anticuerpos ilustrativos que se unen específicamente al PSMA de la invención se muestran en la Tabla 2.

La Tabla 2 proporciona un resumen de los ejemplos de algunos anticuerpos específicos para PSMA descritos en la presente descripción:

Tabla 2. Secuencias CDR (como se definen por Kabat) de mAbs generados a partir de la selección de fagos contra el PSMA humano

(Sec. con núm. de ident.:)

Ident. de FAB		**CDR (sec. con núm. de ident.:)**		
		CDR1	**CDR2**	**CDR3**
PSMB129	HC	NAWIS (8)	WINPESGRANYAQKFQG (9)	ELYYLVYSTYYYAFDY (10)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB130	HC	SYDIS	GIIPIEGTANYAQKFQG	DYPAGYGFDY

		(14)	(15)	(16)
	LC	RASQSVSSSYLA (17)	GASSRAT (18)	QQYGSSPLT (19)
PSMB128	HC	SDWMS (20)	AISGNGGSTEYADSVKG (21)	DPYYYYDGDSYYGMDV (22)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB127	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSVKG (26)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB124	HC	SYAIS (31)	WISPYNGNANYAQKFQG (32)	DSDRSYNLDY (33)
	LC	RASQSISGWLN (34)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB123	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	GLPIWYLDY (38)
	LC	RASQSVASDLA (39)	FASNRAT (40)	QQSITWPFT (41)
PSMB122	HC	SYAIS (31)	WIIPYNGNANYAQKFQG (42)	VNSAALVWERLDY (43)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB123	HC	SYAIS (31)	GIIPIFGTANYAQKFQG (44)	ASRVWHASYGYLDY (45)
	LC	RASQSVSKWLA (46)	DASNRAT (29)	QQRFTAPWT (47)
PSMB120	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	GWAYDRGLDY (48)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB119	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	AYHYSKGLDY (52)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB126	HC	DYAIS (53)	RIDPIEGTANYAQKFQG (54)	DRYYYDGVYWYSDYFDY (55)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB87	HC	SYWIS (122)	IIYPGDSYTRYSPSFQG (123)	DYEWELFDSRLDY (124)
	LC	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP

		(23)	(12)	(24)
PSMB344	HC	SDAMH **(25)**	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB345	HC	SDAMH **(25)**	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB346	HC	SDAMH **(25)**	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB347	HC	SDAMH **(25)**	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB349	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	DASNRAT (29)
PSMB358	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB359	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB360	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB361	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRGNWPLT (136)
PSMB362	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB363	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB365	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKS (137)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)

En algunas modalidades se presenta un anticuerpo específico para PSMA, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo específico para PSMA, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de un cualquier anticuerpo descrito en la Tabla 2 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de un cualquier anticuerpo descrito en la Tabla 2. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo específico para PSMA o fragmento de unión al antígeno de este compite por unirse a PSMA con un anticuerpo o antígeno de unión que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de un cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de un cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que tiene la sec. con núm. de ident.: 84 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 85.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12 y 24, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 86 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 87.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 96 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 83.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas

incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 88 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 89.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12, y 24, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 125 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 91.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12, y 13, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 82 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 83.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12, y 35, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 92 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 93.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40, y 41, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 94 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 95.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29, y 47, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 97 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 98.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50, y 51, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 99 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 100.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50, y 51, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 101 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 100.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12, y 35, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 90 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 91.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 145 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 89.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 145 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 148.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 145 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 149.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 146 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 89.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 147 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 150.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 147 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 89.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 147 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 148.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 147 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 149.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 146 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 150.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 139 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 146 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 149.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 141 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 151 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 149.

En algunas modalidades, el anticuerpo se une al ECD del PSMA humano con una constante de disociación de equilibrio (K_D) menor que aproximadamente 100 nM, opcionalmente, menor que aproximadamente 50 nM, por ejemplo, menor que aproximadamente 12 nM, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo se une al ECD del PSMA de cynomolgous con una constante de disociación de equilibrio (K_D) menor que aproximadamente 100 nM, opcionalmente, menor que aproximadamente 50 nM, por ejemplo, menor que aproximadamente 12 nM, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo es de un isotipo IgG4, que comprende, opcionalmente, una sustitución de cadena pesada S228P, F234A, y L235A cuando se compara con el IgG4 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61 y es de un isotipo IgG4, que comprende, opcionalmente, la sustitución de cadena pesada S228P, F234A, y L235A cuando se compara con el IgG4 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un tumor sólido.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de próstata o cáncer de próstata resistente a la castración.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de una neoplasia intraepitelial.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer colorrectal.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un carcinoma de células claras de riñón.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer gástrico.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) (p. ej., un carcinoma de células claras de riñón o un carcinoma de células papilares de riñón), o una lesión metastásica de este.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de vejiga.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de mama.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer renal.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo en el tratamiento de un trastorno neovascular tal como, por ejemplo, un cáncer caracterizado por el crecimiento de un tumor sólido.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo en el tratamiento de un trastorno neovascular tal como, por ejemplo, carcinoma renal de célula clara (cáncer colorrectal CCRCC, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, y cáncer de páncreas y varios otros cánceres diferentes al de próstata, incluyendo pero sin limitarse a renal, urotelial, de pulmón, de colon, de mama, y adenocarcinoma al hígado.

La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc pero muestran grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores Fc (FcgR) en la superficie de las células inmunitarias efectoras, tales como células asesinas y macrófagos, lo que lleva a la fagocitosis o lisis de las células objetivo. En la CDC, los anticuerpos matan las células objetivo al disparar la cascada de complementos en la superficie de la célula. Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen los anticuerpos con las

características descritas de los dominios variables en combinación con cualquiera de los isotipos IgG, que incluyen versiones modificadas en las que la secuencia Fc se ha modificado para lograr las funciones efectoras.

Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones de los efectores mediadas por Fc no son parte del mecanismo de acción. Estas funciones de efectores mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan un riesgo de seguridad al provocar toxicidad con el mecanismo desactivado. Modificar las funciones de los efectores puede lograrse al hacer que las regiones Fc reduzcan su unión a las FcgR o a los factores de complemento. La unión de IgG a los FcgR activadores (FcgRI, FcgRIIa, FcgRIIIa y FcgRIIIb) e inhibidores (FcgRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 e IgG4 para reducir o silenciar las funcionalidades de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida a Fcg RI, Fcg RIIa, Fcg RIIb, Fcg RIIIb y/o Fcg RIIIa, (c) afinidad reducida a FcgRI (d) afinidad reducida a FcgRIIa (e) afinidad reducida a FcgRIIb, (f) afinidad reducida a Fcg RIIIb o (g) afinidad reducida a FcgRIIIa.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo has un isotipo IgG4, el anticuerpo contiene sustituciones de S228P, L234A, y L235A en su región de Fc. En algunas

modalidades en donde el anticuerpo tiene un isotipo IgG1, el anticuerpo contiene sustituciones de S228P, L234A, y L235A en su región de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción puede incluir estas modificaciones. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un isotipo IgG1.

En algunas modalidades, el anticuerpo es de un isotipo IgG4, que comprende opcionalmente una sustitución de cadena pesada S228P cuando se compara con el IgG4 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo es de isotipo IgG1, que comprende, opcionalmente, sustituciones de cadena pesada L234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S y P331S en comparación con el IgG1 silvestre.

Además de los anticuerpos específicos del PSMA y los fragmentos de unión al antígeno descritos, se proporcionan, además, secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno descritos. Además se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así como las células que expresan los anticuerpos específicos del PSMA o los fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente descripción. Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de insecto (tales como células Sf7), células de levadura, células de plantas, o células bacterianas (tal como E. coli). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas.

Anticuerpos homólogos

Las variantes de los anticuerpos que se unen específicamente al PSMA de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas indicadas más adelante, que comprenden VH, VL o VH y las secuencias de aminoácidos VL que se muestran en la Tabla 3 están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, las variantes pueden comprender una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos en la VH y/o en la VL siempre que los anticuerpos homólogos conserven o tengan propiedades funcionales mejoradas cuando se comparan con los anticuerpos parentales. En algunas modalidades, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con respecto a una secuencia de aminoácidos de VH o VL de la invención. Opcionalmente, cualquier variación de la variante en comparación con el anticuerpo parental no está dentro de las CDR de la variante.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, 160, 138, 139, o 140, la VL que tiene, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la VL de la sec. con núms. de ident.: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 76, 78, 142, 143, o 144, la VL que tiene, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco,

seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más

abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67, en donde

la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67, en donde

la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden,

opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 139 y la VL de la sec. con

núm. de ident.: 142, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la VH de la sec. con núms. de ident.: 141 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143, en donde la VH, la VL o ambas la VH y la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos. Opcionalmente, cualquier sustitución no está dentro de las CDR.

Los anticuerpos homólogos que se unen específicamente al PSMA de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y

cada una de las modalidades numeradas indicadas más adelante, tienen una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes propiedades:

a) se une al ECD del PSMA de *Pan troglodytes* con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 25 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C,

b) se une a las células LNCaP con una EC_{50} calculada de 20 nM o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* con una EC_{50} calculada de 40 nM o menor, en donde la diferencia en la EC_{50} calculada entre las células LNCaP que se unen y las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* que se unen es menor que 5 veces, y en donde la EC_{50} calculada se mide en un ensayo de unión de células completas a 0 °C usando citometría de flujo,

c) se une al ECD del PSMA recombinante de humanos (sec. con núm. de ident.: 7), *Pan troglodytes* (sec. con núm. de ident.: 4) y *Macaca fascicularis* (sec. con núm. de ident.: 5) con un equilibrio constante de disociación (K_D) de 12 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 de ensayo de resonancia de plasmón de superficie de Proteon a +25 °C;

d) muestra la muerte mediada por células T de células LNCaP, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con CD3B219 anticuerpo anti-CD3, en donde la muerte mediada por células T se mide por cromo 51 o por ensayo de activación de caspasa 3/7, o

e) reconoce un epítopo conformacional en donde el epítopo comprende los residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 del PSMA humano (sec. con núm. de ident.: 3)

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas indicadas más abajo, el anticuerpo que se unen específicamente al PSMA de la invención comprende la VH que comprende las secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y la VL que comprende las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde una o más de las secuencias de CDR comprenden las secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos que se describen en la presente descripción (p. ej., los anticuerpos mostrados en la Tabla 2, o las modificaciones conservadoras de estos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos antagonistas parentales que se unen específicamente al PSMA de la invención.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la

HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12 y 24, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12 y 35, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29 y 47, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50 y 51, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50 y 51, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la

HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12 y 35, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29 y 30, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la

invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29 y 30, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29 y 136, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29 y 30, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas

incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29 y 136, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133 y 132, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12 y 24, respectivamente, y modificaciones conservadoras de estas.

Los anticuerpos con modificaciones conservadoras de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas indicadas más adelante, tienen una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes propiedades:

a) se une al ECD del PSMA de *Pan troglodytes* con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 25 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 a +25 °C,

b) se une a las células LNCaP con una EC_{50} calculada de 20 nM o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* con una EC_{50} calculada de 40 nM o menor, en donde la diferencia en la EC_{50} calculada entre las células LNCaP que se unen y las células HEK

que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* que se unen es menor que 5 veces, y en donde la EC_{50} calculada se mide en un ensayo de unión de células completas a 0 °C usando citometría de flujo,

c) se une al ECD del PSMA recombinante de humano (sec. con núm. de ident.: 7), *Pan troglodytes* (sec. con núm. de ident.: 4) y *Macaca fascicularis* (sec. con núm. de ident.: 5) con una constante de disociación de equilibrio (KD) de 12 nM o menor, en donde la KD se mide usando el sistema ProteOn XPR36 de ensayo de resonancia de plasmón de superficie de ProteOn a +25 °C;

d) muestra la muerte mediada por células T de células LNCaP, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con CD3B219 de anticuerpo anti-CD3, en donde la muerte mediada por células T se mide por cromo-51 o por ensayo de activación de caspasa 3/7, o

e) reconoce un epítopo conformacional en donde el epítopo comprende los residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 del PSMA humano (sec. con núm. de ident.: 3)

“Modificaciones conservadoras” se refieren a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos. Las modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras son aquellas en las que el aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen

cadenas laterales similares están bien definidas e incluyen aminoácidos con cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina, triptófano), cadenas laterales aromáticas (p. ej., fenilalanina, triptófano, histidina, tirosina), cadenas laterales alifáticas (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), amida (p. ej., asparagina, glutamina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que contienen azufre (cisteína, metionina). Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido puede sustituirse además con alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis por barrido de alanina (MacLennan et al., (1988) Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67; Sasaki et al., (1988) Adv Biophys 35:1-24). Las sustituciones de aminoácidos para los anticuerpos de la invención pueden hacerse por medio de métodos conocidos, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (patente de los EE. UU. núm. 4.683.195). Alternativamente, las genotecas de variantes pueden generarse, por ejemplo, mediante el uso de codones aleatorios (NNK) o no aleatorios, por ejemplo, codones DVK, que codifican 11 aminoácidos (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Las variantes de anticuerpos resultantes pueden probarse para sus características mediante el uso de ensayos los descritos en la presente descripción.

Inmunoconjugados

Un “inmunoconjugado” se refiere al anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas heterólogas.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención descrito en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más adelante, se conjuga con uno o más agentes citotóxicos. Los agentes citotóxicos ilustrativos incluyen los agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de estas), e isotipos radionucleidos.

En algunas modalidades, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y medicamento (ADC) en el cual el anticuerpo de la invención se conjuga con uno o más medicamentos, tal como un maitansinoide (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núm. 5.208.020, 5, 416, 06)); y una auristatina tal como las entidades DE y DF del fármaco monometilauristatina (MMAE y MMAF) (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298), una dolastatina, una calicheamicina o derivado de estos (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.712.374, 5.714.586, 5.739, 116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., (1993) Cancer Res 53:3336-3342; y Lode et al.,(1998) Cancer Res 58:2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorrubicina (ver, p. ej., Kratz et al., (2006) Current Med. Chem 13:477-523; Jeffrey et al., (2006) Bioorganic & Med Chem Letters 16:358-362; Torgov et al., (2005) Bioconj Chem 16:717-721; Nagy et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:829-834; Dubowchik et al, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529;-1532(2002); King et al., (2002) J Med Chem 45:4336-4343; y la patente de los EE. UU. núm. 6.630.579), metotrexato, vindesina, un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel.

En algunas modalidades, el inmunoconjugado comprende el anticuerpo de la invención descrito en la presente descripción conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de esta, tal como la cadena A de difteria, fragmentos activos sin capacidad de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de arbina, cadena A de modeccin, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo está conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At211, 1131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, tc99m o 1123 o un marcador de espín para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (conocida, además, como obtención de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo- 123 nuevamente, yodo- 131, indio-l l, flúor- 19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados del anticuerpo de la invención descritos en la presente descripción y el agente citotóxico pueden prepararse mediante el uso de una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifunci5onales, tales como N-succinimidil-3-

(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HQ), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis de flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al., (1987) Science 238: 1098. El ácido L-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX- DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Ver, p. ej., la patente núm. W094/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., (1992) Cancer Res 52: 127-131; patente de los EE. UU. núm. 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC pueden prepararse con reactivos reticuladores tales como BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo- SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (p. ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

Una modalidad de la invención, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un inmunoconjugado que

comprende el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención enlazado a un agente terapéutico o un agente de imagenología.

Otra modalidad de la invención, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que se une específicamente al CD3 de la invención enlazado a un agente terapéutico o un agente de imagenología.

Otra modalidad de la invención, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 de la invención enlazado a un agente terapéutico o un agente de imagenología.

Generación de anticuerpos monoespecíficos de la invención

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, los anticuerpos antagonistas que se unen específicamente al PSMA de la invención son humanos.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, los anticuerpos antagonistas que se unen específicamente al PSMA de la invención se humanizan.

Los anticuerpos monoespecíficos de la invención descritos en la presente descripción (p. ej., anticuerpos que se unen específicamente al PSMA) pueden generarse mediante el uso de diversas tecnologías. Por ejemplo, puede usarse el

método de hibridoma de Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975 para generar anticuerpos monoclonales. En el método de hibridomas, un ratón u otro animal huésped, tal como un hámster, rata o mono, se inmuniza con PSMA o CD3 humano o de chimpancé o de macaco, o fragmentos del PSMA o CD3, tal como el dominio extracelular del PSMA o CD3, seguido por fusión de células del bazo a partir de animales inmunizados con células de mieloma mediante el uso de métodos estándar para formar células de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Las colonias que surgen a partir de células de hibridoma inmortalizadas sencillas se evalúan en cuanto a la producción de anticuerpos con propiedades deseadas, tales como especificidad de unión, reactividad cruzada o falta de esta, y afinidad para el antígeno.

Diversos animales huésped pueden usarse para producir los anticuerpos PSMA de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo. Por ejemplo, pueden usarse ratones Balb/c para generar anticuerpos PSMA antihumano de ratón. Los anticuerpos fabricados en ratones Balb/c y otros animales no humanos pueden humanizarse mediante el uso de diversas tecnologías para generar secuencias más similares a las humanas.

Se conocen técnicas de humanización ilustrativas que incluyen la selección de armazones de aceptor humano e incluyen injerto de CDR (patente de los EE. UU. núm. 5.225.539), injerto de SDR (patente de los EE. UU. núm. 6.818.749), reconstrucción superficial (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), reconstrucción superficial de residuos determinantes de especificidad (publicación de patente de los

EE. UU. núm. 2010/0261620), adaptación de marcos humanos (patente de los EE. UU. núm. 8.748.356) o superhumanización (patente de los EE. UU. núm. 7.709.226). En estos métodos, las CDR de anticuerpos parentales se transfieren sobre armazones humanos que pueden seleccionarse en base a su homología global con los armazones parentales, en base a la similitud en la longitud de CDR, o identidad de estructura canónica, o una combinación de estos.

Los anticuerpos humanizados pueden optimizarse aún más para mejorar su selectividad o afinidad con un antígeno deseado al incorporar residuos alterados de soporte de marcos para preservar la afinidad de unión (retromutaciones) mediante técnicas tales como las descritas en las publicaciones de patente internacional núms. WO1090/007861 y WO1992/22653, o al introducir variación en cualquiera de las CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo.

Los animales transgénicos, tales como ratones o ratas, que portan loci de inmunoglobulina humana (Ig) en sus genomas pueden usarse para generar anticuerpos humanos contra una proteína objetivo, y se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 6.150.584, la publicación internacional de patente núm. WO99/45962, las publicaciones de las patentes internacionales núms. WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 y WO1990/04036, Lonberg et al (1994) Nature 368:856-9; Green et al (1994) Nature Genet. 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) Exp. Med. 188:483-95; Lonberg y Huszar (1995) Int Rev Immunol 13:65-93; Bruggemann et al., (1991) Eur J Immunol 21:1323- 1326; Fishwild et al., (1996) Nat Biotechnol 14:845-851; Mendez et al., (1997) Nat Genet 15:146-156; Green (1999) J Immunol Methods 231:11-23; Yang et al., (1999) Cancer Res 59:1236-

1243; Brüggemann y Taussig (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458. Los loci endógenos de inmunoglobulina en tales animales pueden desestabilizarse o delecionarse, y al menos un locus completo o parcial de inmunoglobulina humana puede insertarse en el genoma del animal mediante el uso de recombinación homóloga o no homóloga, mediante el uso de transcromosomas, o mediante el uso de minigenes. Empresas tales como Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) y Ablexis (http://_www_ablexis_com) pueden dedicarse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado mediante el uso de tecnologías, como se describió anteriormente.

Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse de una genoteca de presentación en fagos, en donde el fago se diseña para expresar inmunoglobulinas humanas o porciones de estas tales como Fab, anticuerpos de cadena única (scFv), o regiones variables de anticuerpos no apareadas o apareadas (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86; Krebs et al., (2001) J Immunol Meth 254:67-84; Vaughan et al., (1996) Nature Biotechnology 14:309-314; Sheets et al., (1998) PITAS (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter (1991) J Mol Biol 227:381; Marks et al., (1991) J Mol Biol 222:581). Los anticuerpos de la invención pueden aislarse, por ejemplo, a partir de una genoteca de presentación en fagos que expresa las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos como proteínas de fusión con la proteína de cubierta pIX de bacteriófagos, como se describe en Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96, y la publicación de patente internacional núm. WO09/085462). Las genotecas pueden

analizarse con respecto a unión a fagos con PSMA o CD3 humano y/o de macacos, y pueden caracterizarse los clones positivos obtenidos, los Fab se aíslan de los lisados de clones y se expresan como lgG en toda su extensión. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos se describen en por ejemplo: patentes de los EE. UU. núms. 5.223.409, 5.403.484, 5.571.698, 5.427.908, 5, 580.717, 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

La preparación de antígenos inmunogénicos y la producción de anticuerpos monoclonales pueden realizarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, tal como la producción de proteínas recombinantes. Los antígenos inmunogénicos pueden administrarse a un animal en la forma de una proteína purificada, o mezclas de proteínas que incluyen células completas o extractos de células o tejidos, o el antígeno puede formarse de novo en el cuerpo del animal a partir de ácidos nucleicos que codifican dicho antígeno o una porción de este.

Generación de anticuerpos multiespecíficos contra PSMA X CD3 de la invención

Los anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3) pueden generarse al combinar dominios VH/VL de unión a PSMA con dominios VH/VL de unión al CD3 aislados y caracterizados en la presente descripción. Alternativamente, los anticuerpos PSMA X CD3 biespecíficos pueden manipularse mediante el uso de dominios VH/VL de anticuerpos monoespecíficos anti-PSMA y anti-CD3 públicamente disponibles, y/o mediante la mezcla

coincidente de dominios VH/VL de unión a PSMA o CD3 identificados en la presente descripción con dominios VH/VL de unión a PSMA o CD3 públicamente disponibles.

Los anticuerpos anti-PSMA ilustrativos que pueden usarse para manipular moléculas PSMA X CD3 son, por ejemplo, aquellos de la presente descripción y de la Tabla 2. Por ejemplo, los dominios VH/VL de los anticuerpos PSMA de la invención pueden incorporarse en anticuerpos biespecíficos que comprenden dominios VH/VL de unión al CD3 descritos en la presente descripción y en la Tabla 5. Por ejemplo, los dominios VH/VL de los anticuerpos CD3 CD3B217 y CD3B219 descritos en la presente descripción pueden usarse para generar anticuerpos PSMA X CD3 biespecíficos. Además de la descripción y caracterización de anticuerpos CD3B217 y CD3B219 proporcionados en la presente invención, una descripción más detallada de los anticuerpos puede encontrarse en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm. 2016-0068605-A1, que se incorpora como referencia en la presente descripción.

Similarmente, anticuerpos anti-CD3 ilustrativos que pueden usarse para modificar moléculas PSMA X CD3 biespecíficas son, por ejemplo, aquellas descritas en las publicaciones internacionales de patentes núm. WO2005/048935, WO2004/106380 y WO2015095392. Los dominios VH/VL de CD3 pueden incorporarse en anticuerpos biespecíficos que comprenden dominios VH/VL de unión a PSMA descritos en la presente descripción y en la Tabla 2. Por ejemplo, los dominios VH/VL de los anticuerpos PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361,

PSMB362, PSMB363, y PSMB365 descritos en la presente descripción pueden usarse para generar anticuerpos PSMA X CD3 biespecíficos.

Los anticuerpos PSMA x CD3 biespecíficos generados pueden probarse para determinar su unión a PSMA y CD3, y sus características funcionales deseadas, tales como la destrucción mediada por células T de células que expresan PSMA (p. ej., LNCaP).

Los anticuerpos biespecíficos de la invención comprenden anticuerpos que tienen una estructura de anticuerpo en toda su extensión.

Un ‘‘anticuerpo en toda su extensión’’ se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas del anticuerpo en toda su extensión y dos cadenas ligeras del anticuerpo en toda su extensión. Una cadena pesada del anticuerpo en toda su extensión (HC) consiste en dominios variable y constante de la cadena pesada VH, CH1, bisagra, CH2, y CH3 muy conocidos. Una cadena ligera del anticuerpo en toda su extensión (LC) consiste en dominios variable y constante de la cadena ligera VL y CL muy conocidos. El anticuerpo en toda su extensión puede carecer de la lisina (K) del extremo C-terminal lo mismo en una que en ambas cadenas pesadas.

‘‘Brazo Fab’’ o ‘‘media molécula’’ se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera que se une específicamente a un antígeno.

Pueden generarse anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención en la presente descripción y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, por ejemplo, mediante el uso del intercambio de brazo Fab (o intercambio de media molécula) entre dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes al introducir sustituciones en la interfase de CH3 de la cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímeros

de dos medias moléculas de anticuerpo que tienen distinta especificidad, ya sea in vitro en un ambiente libre de células o mediante el uso de coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y la disociación-asociación de dominios CH3. Los enlaces disulfuro de cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden diseñarse para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas, cada una de las cuales se une a un epítopo distinto, es decir, un epítopo en PSMA y un epítopo en CD3.

‘‘Homodimerización’’ se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas. ‘‘Homodímero’’ se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas.

‘‘Heterodimerización’’, como se usa en la presente descripción, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas. ‘‘Heterodímero’’ se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen diseños tales como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), botón en ojal

(Genentech), CrossMAbs (Roche) y el emparejado electrostáticamente (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), el LUZ-Y (Genentech), el cuerpo de dominio diseñado de intercambio de hebras (SEEDbody)(EMD Serono), el Biclonic (Merus) y la tecnología DuoBody (Genmab A/S).

La tecnología de quadroma Triomab puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención. La tecnología Triomab promueve el intercambio de brazo Fab entre dos anticuerpos quiméricos parentales, un mAb parental que tiene IgG2a y el segundo mAb parental que tiene regiones constantes de IgG2b de rata, lo que produce anticuerpos biespecíficos quiméricos.

La estrategia de "botón en ojal" (ver, p. ej., la publicación internacional núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfase de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en las posiciones que afectan las interacciones de los dominios CH3 para promover la formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ojal) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (botón) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como un resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un "ojal" con la cadena pesada con un "botón". Los pares de sustituciones de CH3 ilustrativas que forman un botón son (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada):

T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

La tecnología CrossMAb puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención. CrossMAbs, además del uso de la estrategia “botón en ojal” para el intercambio de brazos del promotor Fab, tiene en uno de los brazos medios los dominios de CH1 y CL intercambiados para asegurar el apareamiento correcto de la cadena ligera del anticuerpo biespecífico resultante (ver, p. ej., la patente de los EE. UU. núm. 8.242.247).

Pueden usarse otras estrategias cruzadas para generar anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención al intercambiar los dominios variables o constantes, o ambos, entre la cadena pesada y la cadena ligera o dentro de la cadena pesada en los anticuerpos biespecíficos, ya sea en uno o en ambos brazos. Estos intercambios incluyen, por ejemplo, VH-CH1 con VL-CL, VH con VL, CH3 con CL y CH3 con CH1 como se describe en las publicaciones de patente internacional núms. WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 y WO2009/080252.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas mediante el uso de interacciones electrostáticas al sustituir residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados negativamente en una segunda superficie de CH3, como se describe en la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2010/0015133; publicación de patente de los EE. UU. núm. US2009/0182127; publicación de patente de los EE. UU. núm. US2010/028637 o publicación de patente de los EE. UU. núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas

como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/ posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F o T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2012/0149876 o publicación de patente de los EE. UU. núm. US2013/0195849.

La tecnología LUZ-Y puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos de la invención. En esta tecnología, se añade una cremallera de leucina en el terminal C de los dominios CH3 para impulsar el ensamblaje de heterodímeros a partir de mAb parentales que se elimina después de la purificación como se describe en Wranik et al., (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9.

La tecnología SEEDbody puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos de la invención. Los SEEDbodies tienen, en sus dominios constantes, residuos IgG seleccionados sustituidos con residuos IgA para promover heterodimerización como se describe en la patente de los EE. UU. núm. US20070287170.

La presente invención también proporciona un anticuerpo multiespecífico y multifuncional que se une específicamente al PSMA.

De acuerdo con la invención, tal anticuerpo multiespecífico y multifuncional que se une específicamente al PSMA puede ser un anticuerpo triespecífico para el enfoque doble en las células tumorales; estas son estructuras trifuncionales que pueden diseñarse para enfocar dos objetivos/epítopos diferentes en la célula tumoral y con la tercera funcionalidad

se une con alta afinidad a células T o células NK. Los anticuerpos triespecíficos que se enfocan en dos epítopos tumorales distintos y que se acoplan a las células T o NK lisan las células tumorales que expresan ambos objetivos. Tales moléculas pueden generarse mediante formatos de anticuerpos conocidos en la técnica y se describen completamente. (WO20151842071, WO2015158636, WO2010136172, WO2013174873). En una modalidad triespecífica de la invención, el polipéptido de unión al antígeno es biespecífico para PSMA y un segundo antígeno distinto en una célula tumoral y adicionalmente específico para una célula efectora, en particular una célula T o una célula NK.

Los anticuerpos biespecíficos de la invención descritos en la presente invención, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, pueden generarse in vitro en un entorno libre de células al introducir mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y la formación del anticuerpo heterodimérico biespecífico a partir de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones reductoras para permitir la isomerización de enlaces disulfuro de acuerdo con los métodos descritos en la publicación internacional de patente núm. WO2011/131746 (tecnología DuoBody). En los métodos, el primer anticuerpo monoespecífico bivalente (p. ej., anticuerpo anti-PSMA) y el segundo anticuerpo monoespecífico bivalente (p. ej., anticuerpo anti-CD3) se modifican para tener ciertas sustituciones en el dominio CH3 que promuevan la estabilidad del heterodímero; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlaces disulfuro; lo que genera así el anticuerpo biespecífico por intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restaurarse

óptimamente a no reductoras. Los agentes reductores ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol. Por ejemplo, puede usarse una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditiotreitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el anticuerpo biespecífico aislado que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 comprenden al menos una sustitución en un dominio constante CH3 del anticuerpo.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, la al menos una sustitución en el dominio constante CH3 del anticuerpo es sustitución 409R, F405L o F405L y R409K, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice de la UE.

Los dominios de anticuerpos y numeración son muy conocidos. ‘‘Asimétrico’’ se refiere a sustituciones no idénticas en los dos dominios CH3 en dos cadenas pesadas separadas en un anticuerpo. Una región CH3 de IgG1 típicamente consiste en residuos 341-446 en IgG1 (la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice de la UE).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA X CD3 comprende una

sustitución F405L en una primera cadena pesada del anticuerpo (HC1) y una sustitución 409R en una segunda cadena pesada del anticuerpo (HC2).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades numeradas incluidas más abajo, el anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA X CD3 comprende una sustitución S228P en la HC1 y S228P, sustituciones F405L y R409K en la HC2, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG4.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, la HC1 contiene el primer dominio que se une específicamente al PSMA y la HC2 contiene el segundo dominio que se une específicamente al CD3.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones asimétricas en la HC1 y la HC2 en las posiciones de residuos 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 o 409, cuando la numeración de los residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende al menos una, dos, tres o cuatro sustituciones asimétricas en la HC1 y la HC2 en las posiciones de residuos 350, 370, 405 o 409, cuando la numeración de los residuos es de acuerdo con el Índice de la UE.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende al menos una sustitución asimétrica en la HC1

y la HC2 en las posiciones de residuos 405 o 409, cuando la numeración de los residuos es de acuerdo con el Índice de la UE.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende una sustitución 490R o F405L en la HC1 o una sustitución F405L en la HC2, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice de la UE.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende la sustitución F405L en la HC1 y la sustitución 409R en la HC2.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende al menos una sustitución asimétrica en la HC1 y la HC2 en las posiciones de residuos 366, 368, 370, 399, 405, 407 o 409, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con el Índice de la UE.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la posición 409 de HC1 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Lys, Leu o Met, y la posición 405 de HC2 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Phe.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la posición 405 de HC1 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Phe, y la posición 409 de HC2 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Lys, Leu o Met.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la posición 409 de HC1 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Lys, Leu o Met, y la posición 405 de HC2 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Phe, Arg o Gly.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la posición 405 de HC1 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Phe, Arg o Gly, y la posición 409 de CH3 de HC2 tiene una sustitución de aminoácido distinta de Lys, Leu o Met.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el CH3 de HC1 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene una sustitución distinta de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene una sustitución distinta de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Leu en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Leu en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene Leu en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Leu en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Phe en la posición 405 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Leu en la posición 405 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Leu en la posición 405 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene Phe en la posición 405 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Arg en la posición 409, y la HC2 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405, y la HC2 tiene Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Lys en la posición 370, Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Lys en la posición 409, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405, y la HC2 tiene Lys en la posición 370, Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 CH3 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 CH3 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409, y la HC2 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 CH3 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409, y la HC2 CH3 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y Lys en la posición 409, y la HC2 tiene Tyr en la posición 407 y Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la HC2 tiene (i) un aminoácido distinto de Phe, Leu y Met en la posición 368, o (ii) un Trp en la posición 370, o (iii) un aminoácido distinto de Asp, Cys, Pro, Glu o Gln en la posición 399.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HCl tiene (i) un aminoácido distinto de Phe, Leu y Met en la posición 368, o (ii) Trp en la posición 370, o (iii) un aminoácido distinto de Asp, Cys, Pro, Glu o Gln en la posición 399, y la HC2 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Arg, Ala, His o Gly en la posición 409, y la HC2 tiene (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o (ii) Trp en la posición 370, o (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o (ii) Trp en la posición 370, o (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399, y la HC2 tiene Arg, Ala, His o Gly en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene Arg en la posición 409, y la HC2 tiene (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o (ii) Trp en la posición 370, o (iii) Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 tiene (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o (ii) Trp en la posición 370, o (iii) Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399, y la HC2 tiene Arg en la posición 409.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 comprende una sustitución 409R o una sustitución F405L y la HC2 comprende una sustitución 409R o una sustitución F405L, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice EU.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HC1 comprende la sustitución F405L y la HC2 comprende la sustitución 409R.

Las sustituciones se hacen, típicamente, a nivel de ADN para una molécula tal como el dominio constante del anticuerpo con el uso de métodos estándares.

Los anticuerpos de la invención pueden diseñarse en diversas formas de anticuerpos conocidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un cuerpo diacuerpo o un cuerpo cruzado.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen moléculas de orientación doble similares a IgG recombinantes, en donde los dos lados de la molécula contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión a IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a un fragmento Fab extra o partes del fragmento Fab;

moléculas de fusión a Fc, en donde las moléculas Fv de cadena sencilla o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión a Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos basados en ScFv y diacuerpos, y de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos), en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula portadora.

En algunas modalidades, las moléculas de direccionamiento doble incluyen direccionamiento doble (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech) y mAb2 (F-Star).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión de IgG incluyen el dominio variable doble (DVD)-Ig (Abbott), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión Fc incluyen a fusiones ScFv/Fc (Institución Académica), SCORPION (emergente BioSolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS) y tecnología de redireccionamiento por afinidad doble (Fc-DART) (MacroGenics).

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de fusión a Fab incluyen F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos de dominio basados en ScFv, diacuerpos incluyen Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet), diacuerpo en tándem (Tandab) (Affimed), tecnología de redireccionamiento por afinidad doble (DART) (MacroGenics), diacuerpo de cadena

simple (Académic), anticuerpos similares a TCR (AIT, ReceptorLogics), fusión ScFv de albumina de suero humano (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de direccionamiento doble (Ablynx), anticuerpos de dominio solo de cadena pesada de direccionamiento doble. Se han publicado diversos formatos de anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276 y en Nunez Prado y al., (2015) Drug Discovery Today 20 (5):588-594.

Polinucleótidos, vectores y células huésped

También se describen polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen de manera inmunoespecífica a PSMA. Los polinucleótidos aislados capaces de codificar los segmentos de dominio variable proporcionados en la presente descripción pueden incluir los mismos, o diferentes, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

Los polinucleótidos que codifican proteínas recombinantes de unión al antígeno están, además, dentro del alcance de la descripción. En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos (y los polipéptidos que ellos codifican) incluyen una secuencia líder. Puede usarse cualquier secuencia líder conocida en la técnica. La secuencia líder puede incluir, pero no se limita a, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para PSMA descritos en la presente descripción incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos únicas o múltiples que retienen las propiedades biológicas (p. ej., afinidad de unión o actividad efectora inmunitaria) de

los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para PSMA. En el contexto de la presente invención, las siguientes notaciones se usan, a menos que se indique de cualquier otra forma, para describir una mutación; i) la sustitución de un aminoácido en una posición dada se escribe como, p. ej., K409R, lo que significa una sustitución de una lisina en la posición 409 con una arginina; y ii) para variantes específicas los códigos específicos de una o tres letras, que incluyen los códigos Xaa y X, se usan para indicar cualquier residuo de aminoácidos. Por lo tanto, la sustitución de lisina por arginina en la posición 409 se designa como: K409R, o la sustitución de cualquier residuo de aminoácido por lisina en la posición 409 se designa como K409X. En el caso de deleción de lisina en la posición 409 esta se indica mediante K409*. Cuando un residuo de aminoácido particular puede variar entre isotipos o variantes de péptidos, y una sustitución afecta a ese residuo en cada isotipo o variante o en cualquiera de los isotipos o variantes, la sustitución se designa como, p, ej., 409R, lo que significa que el aminoácido correspondiente a la posición 409 se sustituye por arginina. La persona con experiencia puede producir variantes que tienen sustituciones, deleciones, o adiciones únicas o múltiples de aminoácidos.

Estas variantes pueden incluir: (a) variantes en las que se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden o se delecionan uno o más aminoácidos del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que se fusiona el polipéptido con otro péptido o polipéptido tales como una pareja de fusión, una etiqueta de proteína u otra porción química, que pueden conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítopo para un anticuerpo, una

secuencia de polihistidina, una porción de biotina y lo similar. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden incluir variantes en las que se sustituyen los residuos de aminoácidos de una especie por el residuo correspondiente en otras especies, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas se sustituyen con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas para obtener estas variantes, que incluyen técnicas genéticas (deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, se conocen bien por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para PSMA descritos en la presente descripción pueden incorporar varios isotipos de anticuerpos, tales como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En algunas modalidades el isotipo de anticuerpos es isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, preferentemente, isotipo IgG1 o IgG4. La especificidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se determina en buena parte por la secuencia de aminoácido, por la disposición, o las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo pueden transferirse a otro isotipo sin alterar la especificidad por el antígeno. Alternativamente, las técnicas se han establecido para producir hibridomas que cambien la producción de un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad por el antígeno. En consecuencia, tales isotipos de anticuerpo están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos.

También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente descripción. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés se consideran dentro del alcance de esta descripción. El

vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero no se limitan a, las secuencias reguladoras (p. ej., promotor, potenciador), un marcador de selección, y una señal de poliadenilación. Los vectores para transformar una amplia variedad de células huésped se conocen bien e incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como además otros vectores bacterianos, de levaduras y virales.

Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos, o derivados de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados. Tales elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos, puede incluir, además, uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado unido al gen a expresar, otras secuencias flanqueantes 5' o 3' sin transcribir, secuencias 5' o 3' sin transcribir (tales como los sitios necesarios de unión a ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios de corte donantes y aceptores, o secuencias de terminación transcripcional. Puede incorporarse, además, un origen de replicación que confiere la capacidad de replicarse en un huésped.

Las secuencias control transcripcionales y traduccionales en los vectores de expresión para usarlas en las células de vertebrados transformantes pueden

proporcionarse por fuentes virales. Los ejemplos ilustrativos pueden construirse como se describe en Okayama y Berg, 3 *Mol. Cell. Biol*. 280 (1983).

En algunas modalidades, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo poderoso, tales como los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina deaminasa, piruvato cinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana, et al. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. Tales promotores virales incluyen sin limitación, citomegalovirus (CMV) promotor temprano inmediato, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Maloney, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), et al. retrovirus, y el promotor cinasa de timidina del virus del herpes simple. En una modalidad, el anticuerpo específico del PSMA o fragmento de unión al antígeno de este que codifica la secuencia se ubica bajo el control de un promotor inducible tal como el promotor de metalotioneina, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por doxiciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) tales como la proteína quinasa R 2',5'-oligoadenilato sintetasas, genes Mx, ADAR1, y lo similar.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden contener uno o más sitios de entrada al ribosoma internos (IRES). La inclusión de una secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para potenciar la expresión de algunas

proteínas. En algunas modalidades, el sistema de vectores incluirá uno o más sitios de poliadenilación (p. ej., SV40), que puede estar corriente arriba o corriente abajo de cualquier secuencia de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente. Los componentes del vector pueden unirse de forma contigua, o disponerse de una forma que proporcione espacio óptimo para la expresión de los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos ‘‘espaciadores’’ entre los ORF), o posicionarse de otra manera. Los elementos regulatorios, tales como los motivos IRES, pueden disponerse, además, para proporcionar espacio óptimo para la expresión.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección, que se conocen bien en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (p. ej., gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a penicilina), genes de glutamato sintasa, derivados HSV-TK, HSV-TK para la selección con ganciclovir, o gen de purina nucleósido fosforilasa bacteriana para la selección con 6-metilpurina (Gadi et al., 7 *Gene Ther*. 1738-1743 (2000)). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden usarse para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, pueden usarse los vectores para generar las células productoras del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para PSMA. Por lo tanto, otro aspecto incluye a las células huésped transformadas

con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al PSMA, tales como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos y ejemplificados en la presente descripción.

Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células y pueden usarse para construir las células recombinantes para propósitos de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las varias modalidades descritas y ejemplificadas en la presente descripción. La técnica usada proporcionaría la transferencia estable de la secuencia de genes heterólogos a la célula huésped, tal que la secuencia de genes heterólogos sea heredable y expresable por la progenie celular, y de manera que no se afecten las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, transferencia de cromosomas (p. ej., fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por micro células), métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, portador de liposomas), transferencia de vectores virales (p. ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y lo similar (descritas en Cline, 29 *Pharmac. Ther*. 69-92 (1985)). La precipitación con fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamíferos pueden usarse para transformar células.

Las células adecuadas para el uso en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para PSMA descritos en la presente descripción son preferentemente células eucarióticas, con mayor preferencia células de

plantas, roedores, o de origen humano, por ejemplo, pero no se limitan a, NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, células HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0 y líneas celulares BHK, entre otras. En adición, la expresión de anticuerpos puede lograrse mediante el uso de células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

Las células transformadas con vectores de expresión descritos en la presente descripción pueden seleccionarse o analizarse para expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción. Las células positivas recombinantes se expanden y se analizan con respecto a subclones que exhiben un fenotipo deseado, tal como nivel de expresión alto, propiedades de crecimiento potenciadas, o la capacidad para rendir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de las proteínas o a las modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a las propiedades inherentes de un subclon dado o la mutación. Las mutaciones pueden efectuarse a través del uso de productos químicos, luz UV de longitud de onda, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación ADN no coincidente, o una combinación de tales métodos.

Composiciones farmacéuticas/administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Para uso terapéutico, los anticuerpos de la invención pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz

del anticuerpo como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. “Portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el anticuerpo de la invención. Los vehículos podrían ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y lo similar. Por ejemplo, puede usarse 0,4 % de solución salina y 0,3 % de glicina. Estas soluciones son estériles y, generalmente, libres de materia particulada. Estas pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y conocidas (p. ej., filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiere para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como ajuste de pH y agentes reguladores, estabilizantes, espesantes, agentes lubricantes y colorantes, etc. La concentración de los anticuerpos de la invención en la formulación farmacéutica puede variar, menor que aproximadamente 0,5 %, usualmente, a al menos aproximadamente 1 % a tanto como 15 o 20 % en peso y puede seleccionarse principalmente sobre la base de la dosis requerida, volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Las formulaciones y vehículos adecuados, que incluyen otras proteínas humanas, p. ej., la albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.° edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams y Wilkins, Filadelfia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing págs. 691-1092, ver, especialmente, las págs. 958-989.

El modo de administración para uso terapéutico de los anticuerpos de la invención puede ser cualquier ruta adecuada que suministre el anticuerpo al huésped, tal como administración parenteral, p. ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o

subcutánea, pulmonar, transmucosa (oral, intranasal, intravaginal, rectal), mediante el uso de una formulación en una tableta, cápsula, solución, polvo, gel, partícula; y contenida en una jeringa, un dispositivo implantado, bomba osmótica, cartucho, microbomba; u otros medios apreciados por la persona con experiencia y conocidos en la materia. La administración específica de sitio puede lograrse, por ejemplo, por la administración intratumoral, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavidad, intraceliaca, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intracardiaca, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía adecuada, por ejemplo, parenteralmente por infusión intravenosa (IV., por sus siglas en inglés) o inyección de bolo, intramuscular o subcutáneamente o intraperitonealmente. La infusión IV. puede administrarse, por ejemplo, durante 15, 30, 60, 90, 120, 180 o 240 minutos, o de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas.

La dosis administrada a un sujeto es suficiente para aliviar o al menos detener parcialmente la enfermedad que se trata (“cantidad terapéuticamente eficaz”) y puede ser algunas veces de 0,005 mg a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg/kg, o aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente

8 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg o aproximadamente 24 mg/kg, o, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg, pero puede ser incluso mayor, por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg.

También puede administrarse una dosis unitaria fija, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1000 mg o la dosis puede basarse en el área de superficie del paciente, p. ej., 500, 400, 300, 250, 200 o 100 mg/m2. Usualmente entre 1 y 8 dosis, (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) pueden administrarse para tratar al paciente, pero pueden proporcionarse 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más dosis.

La administración de los anticuerpos de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, podría repetirse después de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más. Los cursos de tratamiento repetidos son, además, posibles, como lo es la administración crónica. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden administrarse a 8 mg/kg o a 16 mg/kg en un intervalo semanal durante 8 semanas, seguido de la administración a 8 mg/kg o a 16 mg/kg cada dos semanas durante 16 semanas adicionales, seguidas de la administración a 8 mg/kg o a 16 mg/kg cada cuatro semanas por infusión intravenosa.

Por ejemplo, los anticuerpos en los métodos de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades

enumeradas incluidas más abajo, pueden proporcionarse como una dosis diaria en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o alternativamente, al menos una de las semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de estos, mediante el uso de una dosis única o en dosis divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4, o 2 horas, o cualquier combinación de estos.

Los anticuerpos en los métodos de la invención descritos en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, también pueden administrarse profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, demorar la aparición de la ocurrencia de un evento en la progresión del cáncer, y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión.

Los anticuerpos de la invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y se reconstituyen en un portador adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado ser eficaz con preparaciones de proteínas convencionales y pueden usarse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas.

Métodos para usar anticuerpos específicos PSMA

PSMA es un antígeno de la membrana celular relacionado con el cáncer de próstata que frecuentemente se sobreexpresa en neoplasia intraepitelial prostática

(PIN, por sus siglas en inglés), una condición en la que algunas células de la próstata han comenzado a verse y comportarse de manera anormal; cánceres de próstata primarios y metastásicos; y la neovascularización de otros tumores sólidos (p. ej., mama, pulmón, vejiga, riñón). La expresión del PSMA se correlaciona con la progresión de la enfermedad y la escala de Gleason. La expresión del PSMA aumenta en enfermedades metastásicas, casos refractarios a hormonas y lesiones de grado superior, y se regula en tumores insensibles a andrógenos.

El bloqueo del PSMA puede inhibir o disminuir el crecimiento de células cancerosas y tumores que expresan PSMA en un sujeto. También puede tener actividad antiangiogénica debido a la expresión del PSMA en la neovasculatura tumoral (Milowsky, y al. 2007). PSMA se expresa altamente en la neoplasia intraepitelial prostática, el precursor más establecido de carcinoma de próstata y, por lo tanto, el bloqueo del PSMA puede modular la progresión del PIN al cáncer de próstata.

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir la formación o crecimiento de neovasculatura de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir la progresión de un estado precanceroso en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención.

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para tratar un cáncer mediante la administración al sujeto que lo necesita del anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención descrito en la presente descripción.

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico que se une específicamente al PSMA X CD3 de la invención.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir la formación o crecimiento de neovasculatura de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico que se une específicamente al PSMA X CD3 de la invención.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para inhibir la progresión de un estado precanceroso en un sujeto,

que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico que se une específicamente al PSMA X CD3 de la invención.

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, es un método para tratar un cáncer mediante la administración al sujeto que lo necesita del anticuerpo biespecífico que se une específicamente al PSMA X CD3 de la invención.

Los anticuerpos ilustrativos que pueden usarse en los métodos de la invención son anticuerpos que se unen específicamente al PSMA y anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3, como se describe en la presente descripción.

Los anticuerpos para PSMA ilustrativos que pueden ser monoespecíficos o pueden ser parte de un CD3 biespecífico son anticuerpos PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, y PSMB365, que tienen características y secuencia de aminoácidos de VL y VH, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción es PPSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, y PSMB365. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL de estos anticuerpos se muestran en la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une específicamente al PSMA usado en los métodos de la invención descrito en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 141 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64

y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 usado en los métodos de la invención

descritos en la presente descripción comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65 en el primer dominio, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 en el segundo dominio.

El cáncer puede ser una condición o desorden hiperproliferativo, un tumor sólido, una neovasculatura, un tumor de tejidos blandos, o una lesión metastásica.

‘‘Cáncer’’ pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo de histopatología o etapa de invasividad. Los ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, neoplasias hematológicas, tumores de tejido blando y lesiones metastásicas. Los tumores sólidos ilustrativos incluyen neoplasias, p. ej., sarcomas y carcinomas (que incluyen adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas) de los diversos sistemas de órganos, tales como aquellos que afectan a la próstata, hígado, pulmón, mama, linfoide, tracto gastrointestinal (p. ej., colon), tracto genitourinario (p. ej., células renales, uroteliales), próstata y faringe. Los adenocarcinomas incluyen neoplasias, tales como la mayoría de los cánceres de colon, un cáncer rectal, un carcinoma de células renales, un cáncer de hígado, un carcinoma de pulmón de células no pequeñas, un cáncer del intestino delgado y un cáncer del esófago. Los carcinomas de células escamosas incluyen neoplasias, p. ej., en el pulmón, el esófago, la piel, la región de la cabeza y el cuello, la cavidad oral, el ano y el cuello del útero.

En una modalidad, el cáncer es un cáncer de próstata.

Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados anteriormente pueden tratarse o prevenirse, además, mediante el uso de los métodos y anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción.

Los cánceres ilustrativos cuyo crecimiento puede inhibirse o reducirse mediante el uso de los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción incluyen cánceres que pueden sobreexpresar PSMA. Tales cánceres ilustrativos incluyen un cáncer de próstata o una neoplasia intraepitelial prostática, un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico, un carcinoma renal de células claras, un cáncer de vejiga, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células escamosas, un glioma, un cáncer de mama, un cáncer de riñón, un desorden neovascular, un carcinoma renal de células claras (CCRCC), un cáncer pancreático y diversos cánceres no prostáticos, que incluye, pero no se limita a, un cáncer renal, un cáncer urotelial o un adenocarcinoma del hígado. Las neoplasias resistentes o recurrentes pueden tratarse mediante el uso de los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción.

Otros cánceres ilustrativos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención descritos en la presente invención son un cáncer anal, un carcinoma de células basales, un cáncer de tracto biliar, un cáncer de vejiga, un cáncer óseo, cáncer cerebral y del SNC, un carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de la vagina, un carcinoma de la vulva, un melanoma maligno cutáneo o intraocular, un cáncer gastroesofágico, un cáncer testicular, un cáncer ovárico, un cáncer pancreático, un cáncer rectal, un cáncer uterino, un linfoma primario del SNC; un neoplasma del sistema nervioso central (SNC), un cáncer de cuello uterino, un coriocarcinoma, un cáncer de recto, un cáncer de tejido conjuntivo, un cáncer del sistema digestivo, un

cáncer endometrial, un cáncer de ojo; un neoplasma intraepitelial, un cáncer de riñón, un cáncer de laringe, un cáncer de hígado; un cáncer de pulmón de células pequeñas, un neuroblastoma, un cáncer de la cavidad bucal (p. ej., labio, lengua, boca y faringe), un cáncer nasofaríngeo, un retinoblastoma, un rabdomiosarcoma, un cáncer del sistema respiratorio, un sarcoma, un cáncer de tiroides, un cáncer del sistema urinario, un hepatocarcinoma, un cáncer de la región anal, un carcinoma de las trompas de Falopio, un carcinoma de la vagina, un carcinoma de la vulva, un cáncer del intestino delgado, un cáncer del sistema endocrino, un cáncer de la glándula paratiroidea, un cáncer de la glándula adrenal, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de la uretra, un cáncer del pene, tumores sólidos en la niñez, una angiogénesis tumoral, un tumor del eje espinal, un glioma del tallo cerebral, un adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer de células de Merkel, un cáncer epidermoide, un cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente que incluyen aquellos inducidos por amianto, así como otros carcinomas y sarcomas, y combinaciones de dichos cánceres.

Los pacientes que tienen cáncer que incluye cáncer metastásico que expresa PSMA pueden tratarse con los anticuerpos de la invención descrita en la presente descripción. El cáncer puede ser un cáncer de próstata o una neoplasia intraepitelial prostática, un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico, un carcinoma renal de células claras, un cáncer de vejiga, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células escamosas, un glioma, un cáncer de mama, un cáncer de riñón, un desorden neovascular, un carcinoma renal de células claras (CCRCC), y un cáncer pancreático y diversos otros cánceres no prostáticos, que incluye, pero no se limita a, un cáncer renal, un cáncer urotelial o un adenocarcinoma del hígado.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el sujeto tiene un tumor sólido.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el sujeto tiene un tumor de próstata.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer colorrectal.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer gástrico.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de pulmón.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de vejiga.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el cáncer es el carcinoma renal de células claras (CCRCC).

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de mama.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es glioma.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de próstata o cáncer de próstata resistente a la castración.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de riñón.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer pancreático.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un adenocarcinoma de hígado.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el cáncer es un neovascular.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el cáncer es cáncer renal.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer urotelial.

En algunas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, y en algunas modalidades de todas y cada una de las modalidades enumeradas incluidas más abajo, el tumor sólido es un cáncer de cerebro.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el sujeto tiene un tumor que expresa PSMA.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el sujeto tiene linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL) en el tejido tumoral.

‘‘Número aumentado’’ se refiere al aumento estadísticamente significativo en un sujeto cuando se compara con un control. ‘‘Número aumentado’’, por ejemplo, se refiere al aumento estadísticamente significativo en el número de TIL en un sujeto (p. ej., paciente) antes y después del tratamiento con un anticuerpo para PSMA u otro agente terapéutico.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el sujeto tiene expresión o actividad aumentada de interferón-gamma (IFN-γ).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el sujeto se ha tratado con un anticuerpo anti-PSMA.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el sujeto es resistente al tratamiento con el anticuerpo anti-PSMA.

Cualquiera de los anticuerpos para PSMA o PSMA X CD3 biespecíficos de la invención descritos en la presente descripción pueden usarse en los métodos de la invención.

Los anticuerpos o fragmentos multiespecíficos de estos como se describen en la presente descripción pueden administrase en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o condición a tratar. En consecuencia, en una modalidad, el medicamento que contiene el anticuerpo es para la combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el otro agente terapéutico es un radiofármaco (tal como el cloruro de radio-223), terapias hormonales secundarias (tal como abiraterona o enzalutamida) y/o quimioterapias (docetaxel y cabazitaxel). Tal administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial, en cualquier orden. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado, un agente quimioterapéutico (p. ej., docetaxel, carboplatino, fludarabina), abiraterona, terapia hormonal (p. ej., flutamida, bicalutamida, nilutamida, acetato de ciproterona, cetoconazol, aminoglutetimida, abarelix, degarelix, leuprolide, triptorelina, buserelina, ARN-509), inhibidor de serina o tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de quinasa PI3 SF1126) (p. ej., lapatanib), inhibidor de multiquinasa (p. ej., sorafenib, sunitinib), inhibidor de VEGF (p. ej., bevacizumab), TAK-

700, vacuna contra el cáncer (p. ej., BPX-101, PEP223), vacuna a base de Listeria, lenalidomida, TOK-001, inhibidor de receptor de IGF-1 (p. ej., cixutumumab), TRC105, inhibidor de Aurora A quinasa (p. ej., MLN8237), inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib), OGX-011, radioinmunoterapia (p. ej., HuJ591-GS), inhibidor de HDAC (p. ej., ácido valproico, SB939, LBH589), hidroxicloroquina, inhibidor de mTOR (p. ej., everolimus), lactato de dovitinib, diindolilmetano, efavirenz, OGX-427, genisteína, IMC-3G3, bafetinib, CP-675,206, terapia de radiación, cirugía o una combinación de estos.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar un desorden que implica células que expresan PSMA en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico de PSMA x CD3 descrito en la presente descripción, y radioterapia a un sujeto que la necesita. En una modalidad se proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo para PSMA x CD3 descrito en la presente descripción, y radioterapia a un sujeto que la necesita. Se proporciona la radioterapia, que puede comprender radiación o administración asociada de productos radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se trata (el tratamiento con radiación puede, por ejemplo, estar en forma de terapia de radiación de haz externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radioactivos que pueden usarse para poner en práctica tales métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131, e indio-111.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con una vacuna.

Las vacunas ilustrativas son agentes inmunogénicos, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (que incluyen proteínas recombinantes, epítopos de antígeno, péptidos y moléculas de carbohidratos), antígenos tumorales administrados a un paciente a través de terapia génica, células y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes. Las vacunas ilustrativas que pueden usarse incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF, vacunas a base de ADN, vacunas a base de ARN, vacunas a base de listeria y vacunas a base de transducción viral, péptidos o antígenos de la próstata (p. ej., PSMA, STEAP1, PSCA), la vacuna contra el cáncer sipuleucel-T o péptidos de antígenos de cáncer de pulmón. La vacuna contra el cáncer puede ser profiláctica o terapéutica.

Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (ver Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; ver, además, Restifo, N. y Sznol, M., Cancer Vaccines, capítulo 61, págs. 3023-3043 en DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Quinta edición). En una de estas estrategias, una vacuna se prepara mediante el uso de células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares han demostrado ser más eficaces cuando las

células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un activador potente de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff et al., (1993) Proc Natl Acad Sci EE. UU. 90: 3539-43).

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con una o una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en o sobre un tumor para generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas se observan, normalmente, por el sistema inmunitario como autoantígenos y son, por lo tanto, tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más de 85 % de los cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al., (1994) Science 266: 2011-2013). Los antígenos tumorales pueden ser, además, “neoantígenos” expresados en o sobre células cancerosas como resultado de mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (p. ej., bcr-abl en el cromosoma Filadelfia) o idiotipo de tumores de células B. Los antígenos tumorales pueden ser epítopos de antígeno de antígeno prostático específico (PSA), mesotelina, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), sarcoma sinovial X2 (SSX2), NKX3.1, fosfatasa ácida prostática (PAP) o receptores de factor de crecimiento epidérmico, o péptidos específicos para variantes de EGFR, tales como el bien conocido EGFRvIII sobreexpresado sobre células tumorales.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos, tales como virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (KHSV) y virus Epstein-Barr

(EBV). Otra forma de antígenos específicos tumorales que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas a partir del propio tejido tumoral. Las HSP contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y son altamente eficientes en el suministro a las células presentadoras de antígeno para provocar inmunidad tumoral (Suot and Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al., (1997) Science 278:117-120).

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno potentes que pueden usarse para cebar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse ex vivo y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como también extractos de células tumorales (Nestle et al., (1998) Nature Medicine 4: 328-332). Las DC pueden transducirse, además, por medios genéticos para expresar estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente a las células tumorales con fines de inmunización (Kugler et al., (2000) Nature Medicine 6:332-336). Como un método de vacunación, la inmunización por DC puede combinarse eficazmente con los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción para activar respuestas antitumorales más potentes.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos que se unen específicamente al PSMA de la invención o los anticuerpos para PSMA X CD3 biespecíficos de la invención se administran en combinación con una vacuna contra el tumor que comprende un fragmento peptídico de un antígeno prostático específico, o un vector que codifica el fragmento peptídico de un antígeno prostático específico.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con un tratamiento estándar para el cáncer.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con regímenes quimioterapéuticos para el cuidado del cáncer estándares. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr et al., (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con una o más de otras moléculas del anticuerpo, quimioterapia, otras terapias contra el cáncer (p. ej., terapias anticancerosas o fármacos oncolíticos), agentes citotóxicos, citoquinas, procedimientos quirúrgicos y/o de radiación.

Los agentes citotóxicos ilustrativos que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción incluyen inhibidores hormonales, agentes antimicrotubulares, inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antraciclinas, alcaloides vinca, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con un trayecto de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis, inhibidores de proteasoma, y radiación (p. ej., irradiación de cuerpo entero o local).

Los agentes terapéuticos para el cuidado estándares incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®), inyección de busulfán (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida

(Cytoxan® o Neosar®), citarabina, citosina arabinósido (Cytosar-U®), inyección de liposoma de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), hidrocloruro de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección de liposoma de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidrocloruro de doxorrubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), paclitaxel (Taxol®), fénix (Yttrium90/MX- DTPA), pentostatina, polifeprosano 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidrocloruro de topotecán para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), vinorelbina (Navelbine®), Ibrutinib, idelalisib y brentuximab vedotina.

Los agentes alquilantes ilustrativos incluyen, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos: mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil Nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clormetina (Mustargen®), ciclofosfamida, (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalán (Alkeran®), clorambucil (Leukeran®), pipobromano (Amedel®, Vercyte®), trietilenomelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), trietilenotiofosforamina,

temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfán (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y dacarbazina (DTIC-Dome®). Los agentes alquilantes ilustrativos adicionales incluyen, oxaliplatino (Eloxatin®); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomycin (también conocido como actinomicina-D, Cosmegen®); Melfalán (también conocida como L-PAM, L-sarcolisina y mostaza de fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfán (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU®); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); Clorambucil (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytoxan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednumustina; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocida como mostaza de nitrógeno, mostina y clorhidrato de mecloroetamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocida como tiofosfoamida, TESPA y TSPA, Thioplex®); Ciclofosfamida (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y Bendamustina HCl (Treanda®).

Las antraciclinas ilustrativas incluyen, por ejemplo, doxorrubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (Lenoxane®); daunorrubicina (hidrocloruro de dauorubicina, daunomicina e hidrocloruro de rubidomicina, Cerubidine®); daunorrubicina liposomal (liposoma de citrato de daunorrubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirrubicina (Ellence ™); idarrubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®);

mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina.

Los alcaloides de la vinca ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen tartrato de vinorelbina (Navelbine®), vincristina (Oncovin®) y vindesina (Eldisine®); vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincaleukoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y vinorelbina (Navelbine®).

Los inhibidores de proteasoma ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención, solo o en combinación con otro inmunomodulador, son bortezomib (Velcade®); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-Metil-N—((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R) -2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il) amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)-pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y O-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil) carbonil]-L-seril-O-metil-N-[(1S) -2-[(2R)-2-metil-2-oxiranilo]-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-L-serinamida (ONX-0912).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa o serina (p. ej., un inhibidor del receptor de tirosina quinasa (RTK)). Un inhibidor de la tirosina quinasa ilustrativo incluye un inhibidor de la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (p. ej., un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)), un inhibidor de la vía del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (p. ej., un inhibidor del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (p. ej., un inhibidor de VEGFR-1, un inhibidor de VEGFR-2, un inhibidor de VEGFR-3), un inhibidor de la vía del factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (p. ej., un inhibidor del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (p. ej., un inhibidor de PDGFR-β), un inhibidor de RAF-1, un inhibidor de KIT y un inhibidor de RET. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTIN™, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA®), imatinib (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB®, TYVERB®), lestaurtinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA®), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT®, SU11248), toceranib (PALLADIA®), vandetanib (ZACTIMA®, ZD6474), vatalanib (PTK787,PTK/ZK), trastuzumab (HERCEPTIN®), bevacizumab (AVASTIN®), rituximab (RITUXAN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), ranibizumab (Lucentis®), nilotinib (TASIGNA®), sorafenib (NEXAVAR®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, lactato de dovitinib (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, XL228, AEE788, AG-490, AST-6, BMS-599626, CUDC-101, PD153035, pelitinib (EKB-569), vandetanib (zactima), WZ3146, WZ4002, WZ8040, ABT-869 (linifanib), AEE788, AP24534 (ponatinib), AV-951 (tivozanib), axitinib, BAY 73-4506 (regorafenib), alaninato de brivanib (BMS-582664), brivanib (BMS-540215), cediranib (AZD2171), CHIR-258 (dovitinib), CP 673451, CYC116, E7080, Ki8751, masitinib (AB1010), MGCD-265, difosfato de motesanib (AMG-706), MP-470, OSI-930, hidrocloruro de pazopanib, PD173074, Tosilato de Sorafenib (Bay 43-9006), SU 5402, TSU-68 (SU6668), vatalanib, XL880 (GSK1363089, EXEL-2880). Los

inhibidores de tirosina quinasa seleccionados se seleccionan de sunitinib, erlotinib, gefitinib o sorafenib. En algunas modalidades, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo EGFRc-Met biespecífico (mAb de EM-1) que comprende las cadenas pesadas y ligeras de las sec. con núms. de ident.: 249, 250, 251 y 252 (US2014/0141000).

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), que incluyen bevacizumab (Avastin®), axitinib (Inlyta®); Alaninato de brivanib (BMS-582664, (S)—((R)-1-(4-(4-Fluoro-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-iloxi)propan-2-il)2-aminopropanoato); Sorafenib (Nexavar®); Pazopanib (Votrient®); Malato de sunitinib (Sutent®); Cediranib (AZD2171, CAS 288383-20-1); Vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Foretinib (GSK1363089); Telatinib (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); Apatinib (YN968D1, CAS 811803-05-1); Imatinib (Gleevec®); Ponatinib (AP24534, CAS 943319-70-8); Tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0); Regorafenib (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); diclorhidrato de vatalanib (PTK787, CAS 212141-51-0); Brivanib (BMS-540215, CAS 649735-46-6); Vandetanib (Caprelsa® o AZD6474); difosfato de motesanib (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-piridinilmetil) amino]-3-piridincarboxamida, descrito en la publicación de patente núm. WO 02/066470); ácido dilactico de dovitinib (TKI258, CAS 852433-84-2); Linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Lestaurtinib (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamida (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); N-

(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[(3aα,5β,6aα)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); 4-metil-3-[[1-metil-6-(3-piridinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]amino]-N-[3-(trifluorometil)fenil]-benzamida (BHG712, CAS 940310-85-0); y Aflibercept (Eylea®).

Los inhibidores de VEGF ilustrativos incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo recombinante monoclonal anti-VEGF humanizado generado de acuerdo con Presta et al., (1997) Cancer Res 57: 4593-4599. En una modalidad, el anticuerpo anti-VEGF es Bevacizumab (BV), también conocido como rhuMAb VEGF o AVASTIN®. Comprende regiones marco de IgG1 humana mutada y regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen además en la patente de los EE. UU. núm. 6.884.879. Los anticuerpos anti-VEGF adicionales incluyen los anticuerpos de la serie G6 o B20 (p. ej., G6-31, B20-4.1), como se describe en las publicaciones internacionales de patente núms. WO2005/012359 y WO2005/044853. Para los anticuerpos adicionales, ver las patentes de los EE. UU. núms. 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020, 6.054.297, WO98/45332, WO 96/30046, WO94/10202, EP 0666868B1, la publicación de solicitudes de patente de los EE. UU. núms. US2006009360, US20050186208, US20030206899, US20030190317, US20030203409, y US20050112126; y Popkov et al., (2004) Journal of Immunological Methods 288: 149-164. Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a un epítopo funcional en el VEGF humano que

comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, 191, K101, E103 y C104 o, alternativamente, que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, 183 y Q89.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de PI3K. En una modalidad, el inhibidor de PI3K es un inhibidor de isoformas delta y gamma de PI3K. En una modalidad, el inhibidor de PI3K es un inhibidor de isoformas beta de PI3K. Los inhibidores de PI3K ilustrativos que pueden usarse se describen, por ejemplo, en las patentes núms. WO 2010/036380, WO 2010/006086, WO 09/114870, WO 05/113556, GSK 2126458, GDC-0980, GDC-0941, Sanofi XL147, XL756, XL147, PF-46915032, BKM 120, CAL-101, CAL 263, SF1126, PX-886, y un inhibidor de PI3K doble (p. ej., BEZ235 de Novartis).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de mTOR, p. ej., uno o más inhibidores de mTOR seleccionados de uno o más de rapamicina, temsirolimus (TORISEL®), AZD8055, BEZ235, BGT226, XL765, PF-4691502, GDC0980, SF1126, OSI-027, GSK1059615, KU-0063794, WYE-354, Palomid 529 (P529), PF-04691502 o PKI-587. ridaforolimus (formalmente conocido como, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2 [(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.04,9] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil dimetilfosfinato, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la publicación PCT núm. WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-

8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartilL-serina- (sec. con núm. de ident.: 237), sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) y XL765.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de BRAF, p. ej., GSK2118436, RG7204, PLX4032, GDC-0879, PLX4720 y tosilato de sorafenib (Bay 43-9006).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente inmunomodulatorio. Los puntos de verificación inmunes de orientación tales como la proteína de destrucción celular programada 1 (PD1), el ligando 1 de destrucción celular programada 1 (PDL1) y el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) han logrado un beneficio notable en múltiples cánceres al bloquear señales inmunoinhibidoras y permitir que los pacientes produzcan una respuesta antitumoral. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un anti-PD1 (p. ej., nivolumab), anti-PDL (p. ej., MDX-1105) o anti-CTLA4 (p. ej., ipilimumab). La capacidad de los anticuerpos de CD40 agonistas (denominados αCD40) o del ligando de CD40 para estimular las respuestas inmunitarias y atacar tumores sugiere que tales reactivos son prometedores como inmunoterapéuticos contra el cáncer. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un anticuerpo anti-CD40 (p. ej., SGN-40, CP-870,893) o anti-CD40L (p. ej., BG9588).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de MEK.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención administrados en combinación con el inhibidor de MEK se usan en el tratamiento de un cáncer de próstata, un melanoma, un cáncer colorrectal, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer de ovario, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de páncreas, una neoplasia hematológica o un carcinoma de células renales. En ciertas modalidades, el tejido tumoral o la célula cancerosa tiene una mutación BRAF (p. ej., una mutación BRAF V600E), una BRAF salvaje, una KRAS salvaje o una mutación KRAS activante. El cáncer puede estar en una etapa temprana, intermedia o tardía. Puede usarse cualquier inhibidor de MEK en combinación, que incluye ARRY-142886, G02442104 (también conocido como GSK1120212), RDEA436, RDEA119/BAY 869766, AS703026, G00039805 (también conocido como AZD-6244 o selumetinib), BIX 02188, BIX 02189, CI -1040 (PD-184352), PD0325901, PD98059, U0126, GDC-0973 (metanona, [3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino] fenil][3-hidroxi-3-(25)-2-piperidinil-1-azetidinil]-), G-38963, G02443714 (también conocido como AS703206), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este. Ejemplos adicionales de inhibidores de MEK se describen en los documentos núms. WO 2013/019906, WO 03/077914, WO 2005/121142, WO 2007/04415, WO 2008/024725 y WO 2009/085983.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un inhibidor de JAK2, p. ej., CEP-701, INCB18424, CP-690550 (tasocitinib).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con paclitaxel o un agente de paclitaxel, p. ej.,

TAXOL®, paclitaxel unido a proteínas (p. ej., ABRAXANE®). Los agentes de paclitaxel ilustrativos incluyen paclitaxel unido a albúmina en nanopartículas (ABRAXANE, comercializado por Abraxis Bioscience), paclitaxel unido a ácido docosahexaenoico (DHA-paclitaxel, Taxoprexin, comercializado por Protarga), paclitaxel unido a poliglutamato (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX, comercializado por Cell Therapeutic), el profármaco activado por tumor (TAP), ANG105 (Angiopep-2 unido a tres moléculas de paclitaxel, comercializado por ImmunoGen), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel unido al péptido EC-1 de reconocimiento a erbB2; ver Li et al., Biopolymers (2007) 87:225-230), y paclitaxel conjugado a glucosa (p. ej., 2′-paclitaxel metil 2-glucopiranosil succinato, ver Liu et al., (2007) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17:617-620).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con una inmunoterapia celular (p. ej., Provenge (p. ej., Sipuleucel)), y opcionalmente en combinación con ciclofosfamida.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para tratar un cáncer de próstata incluyen un agente quimioterapéutico (p. ej., carboplatino, fludarabina), abiraterona, terapia hormonal (p. ej., flutamida, bicalutamida, nilutamida, acetato de ciproterona, cetoconazol, aminoglutetimida, abarelix, degarelix, leuprolide, goserelina, triptorelina, buserelina), inhibidor de tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de quinasa doble (p. ej., lapatanib), inhibidor de multiquinasa (p. ej., sorafenib, sunitinib), inhibidor de VEGF (p. ej., bevacizumab), TAK-700, vacuna contra el cáncer (p. ej., BPX-101, PEP223), lenalidomida, TOK-001, inhibidor de receptor de IGF-1 (p. ej., cixutumumab), TRC105, inhibidor de Aurora A quinasa (p. ej., MLN8237), inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib), OGX-011,

radioinmunoterapia (p. ej., HuJ591-GS), inhibidor de HDAC (p. ej., ácido valproico, SB939, LBH589), hidroxicloroquina, inhibidor de mTOR (p. ej., everolimus), lactato de dovitinib, diindolilmetano, efavirenz, OGX-427, genisteína, IMC-3G3, bafetinib, CP-675,206, ARN-509, terapia de radiación, cirugía o una combinación de estos.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer pancreático incluyen un agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel o un agente paclitaxel (p. ej., una formulación de paclitaxel como TAXOL, una formulación de paclitaxel estabilizado con albúmina en nanopartículas (p. ej., ABRAXANE) o una formulación de paclitaxel liposomal); gemcitabina (p. ej., gemcitabina sola o en combinación con AXP107-11); otros agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatino, 5-fluorouracilo, capecitabina, rubitecán, clorhidrato de epirrubicina, NC-6004, cisplatino, docetaxel (p. ej., TAXOTERE), mitomicina C, ifosfamida; interferón; inhibidor de tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de EGFR (p. ej., erlotinib, panitumumab, cetuximab, nimotuzumab); inhibidor de receptor HER2/neu (p. ej., trastuzumab); inhibidor de quinasa doble (p. ej., bosutinib, saracatinib, lapatinib, vandetanib); inhibidor multiquinasa (p. ej., sorafenib, sunitinib, XL184, pazopanib); inhibidor de VEGF (p. ej., bevacizumab, AV-951, brivanib); radioinmunoterapia (p. ej., XR303); vacuna contra el cáncer (p. ej., GVAX, péptido de survivina); inhibidor de COX 2 (p. ej., celecoxib); inhibidor del receptor de IGF 1 (p. ej., AMG 479, MK-0646); inhibidor de mTOR (p. ej., everolimus, temsirolimus); inhibidor de IL-6 (p. ej., CNTO 328); inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (p. ej., P276-00, UCN-01); compuesto dirigido al metabolismo energético alterado (AEMD, por sus siglas en inglés) (p. ej., CPI-613); inhibidor de HDAC (p. ej., vorinostat); agonista de receptor

TRAIL 2 (TR-2) (p. ej., conatumumab); inhibidor de MEK (p. ej., AS703026, selumetinib, GSK1120212); inhibidor de quinasa Raf/MEK doble (p. ej., RO5126766); inhibidor de señalización de muesca (p. ej., MK0752); proteína de fusión anticuerpo-anticuerpo monoclonal (p. ej., L19IL2); curcumina; inhibidor de HSP90 (p. ej., tanespimicina, STA-9090); rIL-2; denileukina diftitox; inhibidor de topoisomerasa 1 (p. ej., irinotecán, pep02); estatina (p. ej., simvastatina); inhibidor de factor VIIa (p. ej., PCI-27483); inhibidor de AKT (p. ej., RX-0201); profármaco activado por hipoxia (p. ej., TH-302); clorhidrato de metformina, inhibidor de gamma-secretasa (p. ej., R04929097); inhibidor de ribonucleótido reductasa (p. ej., 3-AP); inmunotoxina (p. ej., HuC242-DM4); inhibidor de PARP (p. ej., KU-0059436, veliparib); inhibidor de CTLA-4 (p. ej., CP-675,206, ipilimumab); terapia AdV-tk; inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib (Velcade), NPI-0052); tiazolidinediona (p. ej., pioglitazona); NPC-1C; inhibidor de quinasa aurora (p. ej., R763/AS703569), inhibidor de CTGF (p. ej., FG-3019); siG12D LODER; y radioterapia (p. ej., tomoterapia, radiación estereotáctica, terapia protónica), cirugía, y una combinación de estos. En ciertas modalidades, una combinación de paclitaxel o un agente de paclitaxel y gemcitabina puede usarse con los anticuerpos de la invención.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas incluyen un agente quimioterapéutico, p. ej., etopósido, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, gemcitabina, liposomal SN-38, bendamustina, temozolomida, belotecán, NK012, FR901228, flavopiridol); inhibidor de tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de EGFR (p. ej., erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab); inhibidor multiquinasa (p. ej., sorafenib, sunitinib); inhibidor de VEGF (p.

ej., bevacizumab, vandetanib); vacuna contra el cáncer (p. ej., GVAX); Inhibidor de Bcl-2 (p. ej., oblimersen sodio, ABT-263); inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib (Velcade), NPI-0052), paclitaxel o un agente paclitaxel; docetaxel; inhibidor del receptor de IGF-1 (p. ej., AMG 479); inhibidor del receptor de HGF/SF (p. ej., AMG 102, MK-0646); cloroquina; inhibidor de quinasa aurora (p. ej., MLN8237); radioinmunoterapia (p. ej., TF2); inhibidor de HSP90 (p. ej., tanespimicina, STA-9090); inhibidor de mTOR (p. ej., everolimus); anticuerpo biespecífico Ep-CAM/CD3 (p. ej., MT110); inhibidor de CK-2 (p. ej., CX-4945); inhibidor de HDAC (p. ej., belinostat); antagonista de SMO (p. ej., BMS 833923); vacuna de péptidos contra el cáncer y radioterapia (p. ej., radioterapia de intensidad modulada (IMRT, por sus siglas en inglés), radioterapia hipofraccionada, radioterapia guiada por hipoxia), cirugía y combinaciones de estas.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas incluyen un agente quimioterapéutico, p. ej., vinorelbina, cisplatino, docetaxel, pemetrexed disódico, etopósido, gemcitabina, carboplatino, liposomal SN-38, TLK286, temozolomida, topotecán, pemetrexed disódico, azacitidina, irinotecán, tegafurgimeracil-oteracil-potasio, sapacitabina); inhibidor de tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de EGFR (p. ej., erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, necitumumab, PF-00299804, nimotuzumab, RO5083945), inhibidor de MET (p. ej., PF-02341066, ARQ 197), inhibidor de quinasa PI3K (p. ej., XL147, GDC-0941), inhibidor de quinasa Raf/MEK doble (p. ej., RO5126766), inhibidor de quinasa PI3K/mTOR doble (p. ej., XL765), inhibidor de SRC (p. ej., dasatinib), inhibidor doble (p. ej., BIBW 2992, GSK1363089, ZD6474, AZD0530, AG-013736, lapatinib, MEHD7945A, linifanib),

inhibidor de multiquinasa (p. ej., sorafenib, sunitinib, pazopanib, AMG 706, XL184, MGCD265, BMS-690514, R935788), inhibidor de VEGF (por ejemplo endostar, endostatina, bevacizumab, cediranib, BIBF 1120, axitinib, tivozanib, AZD2171), vacuna contra el cáncer (p. ej., vacuna de liposomas BLP25, GVAX, ADN recombinante y adenovirus que expresa proteína L523S), inhibidor de Bcl-2 (p. ej., oblimersen sódico), inhibidor de proteasoma (p. ej., bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, MLN9708), paclitaxel o un agente de paclitaxel, docetaxel, inhibidor del receptor de IGF-1 (p. ej., cixutumumab, MK-0646, OSI 906, CP-751,871, BIIB022), hidroxicloroquina, inhibidor de HSP90 (p. ej., tanespimicina, STA-9090, AUY922, XL888), inhibidor de mTOR (p. ej., everolimus, temsirolimus, ridaforolimus), anticuerpo biespecífico Ep-CAM/CD3 (p. ej., MT110), inhibidor de CK-2 (p. ej., CX-4945), inhibidor de HDAC (p. ej., MS 275, LBH589, vorinostat, ácido valproico, FR901228), inhibidor de DHFR (p. ej., pralatrexato), retinoide (p. ej., bexaroteno, tretinoína), conjugado anticuerpo-fármaco (p. ej., SGN-15), bifosfonato (p. ej., ácido zoledrónico), vacuna contra el cáncer (p. ej., belagenpumatucel-L), heparina de bajo peso molecular (LMWH) (p. ej., tinzaparina, enoxaparina), GSK1572932A, melatonina, talactoferrina, dimesna, inhibidor de topoisomerasa (p. ej., amrubicina, etopósido, karenitecina), nelfinavir, cilengitide, inhibidor de ErbB3 (p. ej., MM-121, U3-1287), inhibidor de survivina (p. ej., YM155, LY2181308), mesilato de eribulina, inhibidor de COX-2 (p. ej., celecoxib), pegfilgrastim, inhibidor de quinasa 1 similar a Polo (p. ej., BI 6727), agonista de receptor TRAIL 2 (TR-2) (p. ej., CS-1008), péptido CNGRC (sec. con núm. de ident.: 225) conjugado de TNF alfa, dicloroacetato (DCA), inhibidor de HGF (p. ej., SCH 900105), SAR240550, agonista de PPAR-gamma (p.

ej., CS-7017), inhibidor de gamma secretasa (p. ej., RO4929097), terapia epigenética (p. ej., 5-azacitidina), nitroglicerina, inhibidor de MEK (p. ej., AZD6244), inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (p. ej., UCN-01), colesterol-Fus1, agente antitubulina (p. ej., E7389), inhibidor de farnesil-OH-transferasa (p. ej., lonafarnib), inmunotoxina (p. ej., BB-10901, SS1 (dsFv) PE38), fondaparinux, agente disruptivo vascular (p. ej., AVE8062), inhibidor de PD-L1 (por ejemplo MDX-1105, MDX-1106), beta-glucano, NGR-hTNF, EMD 521873, inhibidor de MEK (p. ej., GSK1120212), análogo de epotilona (p. ej., ixabepilona), inhibidor de husillo de quinesina (p. ej., 4SC-205), agente de direccionamiento de telómeros (p. ej., KML-001), inhibidor de la vía P70 (p. ej., LY2584702), inhibidor de AKT (p. ej., MK-2206), inhibidor de angiogénesis (p. ej., lenalidomida), inhibidor de la señalización Notch (p. ej., OMP-21M18), anticuerpo biespecífico EGFR/c-Met de EM-1 como se describe en la patente de los EE. UU. núm. US2014/0141000A1, terapia de radiación, cirugía y combinaciones de estos.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cáncer de ovario incluyen un agente quimioterapéutico (p. ej., paclitaxel o un agente de paclitaxel; docetaxel; carboplatino; gemcitabina; doxorrubicina; topotecán; cisplatino; irinotecan, TLK286, ifosfamida, olaparib, oxaliplatino, melfalán, pemetrexed disódico, SJG-136, ciclofosfamida, etopósido, decitabina); antagonista de grelina (p. ej., AEZS-130), inmunoterapia (p. ej., APC8024, oregovomab, OPT-821), inhibidor de tirosina quinasa (p. ej., inhibidor de EGFR (p. ej., erlotinib), inhibidor doble (p. ej., E7080), inhibidor de multiquinasa (p. ej., AZD0530, JI-101, sorafenib, sunitinib, pazopanib), ON 01910.Na), inhibidor de VEGF (p. ej., bevacizumab, BIBF 1120, cediranib, AZD2171), inhibidor de PDGFR (p. ej., IMC-3G3), paclitaxel,

inhibidor de topoisomerasa (p. ej., karenitecina, irinotecán), inhibidor de HDAC (p. ej., valproato, vorinostat), inhibidor del receptor de folato (p. ej., farletuzumab), inhibidor de angiopoyetina (p. ej., AMG 386), análogo de epotilona (p. ej., ixabepilona), inhibidor de proteasoma (p. ej., carfilzomib), inhibidor del receptor de IGF-1 (p. ej., OSI 906, AMG 479), inhibidor de PARP (p. ej., veliparib, AG014699, iniparib, MK-4827), inhibidor de quinasa Aurora (p. ej., MLN8237, ENMD-2076), inhibidor de angiogénesis (p. ej., lenalidomida), inhibidor de DHFR (p. ej., pralatrexato), agente radioinmunoterapéutico (p. ej., Hu3S193), estatina (p. ej., lovastatina), inhibidor de topoisomerasa 1 (p. ej., NKTR-102), vacuna contra el cáncer (p. ej., vacuna de péptidos largos sintéticos p53, vacuna OC-DC autóloga), inhibidor de mTOR (p. ej., temsirolimus, everolimus), inhibidor de BCR/ABL (p. ej., imatinib), antagonista del receptor de ET-A (p. ej., ZD4054), agonista del receptor TRAIL 2 (TR-2) (p. ej., CS-1008), inhibidor de HGF/SF (p. ej., AMG 102), EGEN-001, inhibidor de quinasa 1 similar a Polo (p. ej., BI 6727), inhibidor de gamma secretasa (p. ej., RO4929097), inhibidor de Wee-1 (p. ej., MK-1775), agente antitubulina (p. ej., vinorelbina, E7389), inmunotoxina (p. ej., denileucina diftitox), SB-485232, agente de disrupción vascular (p. ej., AVE8062), inhibidor de integrina (p. ej., EMD 525797), inhibidor de husillo de quinesina (p. ej., 4SC-205), revlimid, inhibidor de HER2 (p. ej., MGAH22), inhibidor de ErrB3 (p. ej., MM-121), terapia de radiación, y combinaciones de estos.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de un cáncer renal, p. ej., un carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) o RCC metastásico incluye una estrategia inmunitaria (p. ej., interleucina-2 o interferón-α), un agente dirigido (p. ej., un inhibidor de VEGF tal como un anticuerpo monoclonal a VEGF, p. ej., bevacizumab (Rini

et al., (2010) J Clin Oncol 28(13):2137-2143)); un inhibidor de tirosina quinasa de VEGF tal como sunitinib, sorafenib, axitinib y pazopanib (revisado en Pal et al., (2014) Clin Advances in Hematology & Oncology 12 (2): 90-99); un inhibidor de ARNi, o un inhibidor de un mediador corriente abajo de señalización de VEGF, p. ej., un inhibidor del mamífero objetivo de rapamicina (mTOR), p. ej., everolimus y temsirolimus (Hudes et al., (2007) N Engl J Med 356 (22): 2271-2281, Motzer et al., (2008) Lancet 372: 449-456).

Kits con anticuerpos específicos para PSMA

En la presente descripción se describen kits que incluyen los anticuerpos específicos para PSMA o fragmentos de unión al antígeno de estos. Los kits descritos pueden usarse para llevar a cabo los métodos de uso de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para PSMA proporcionados en la presente descripción u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, los kits descritos pueden incluir los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción y los reactivos para el uso en la detección de la presencia del PSMA en una muestra biológica. En consecuencia, los kits descritos pueden incluir uno o más de los anticuerpos, o un(os) fragmento(s) de unión al antígeno de estos, descritos en la presente descripción y un recipiente para conservar el anticuerpo o fragmento mientras no se use, las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento fijado a un soporte sólido, y/o las formas marcadas detectables del anticuerpo o fragmento, como se describe en la presente descripción.

Una modalidad de la invención es un kit que comprende el anticuerpo que se une específicamente al PSMA de la invención.

Otra modalidad de la invención es un kit que comprende un anticuerpo biespecífico contra PSMA X CD3 que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 de la invención.

El kit puede usarse para usos terapéuticos y como kits de diagnóstico.

El kit puede usarse para detectar la presencia del PSMA, CD3 o PSMA y CD3 en una muestra biológica.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo de la invención descrito en la presente descripción y reactivos para detectar el anticuerpo. El kit puede incluir otro u otros elementos que incluyen: instrucciones de uso; otros reactivos, por ejemplo, una etiqueta, un agente terapéutico o un agente útil para quelar, o de cualquier otra manera acoplar, un anticuerpo a una etiqueta o agente terapéutico, o una composición radioprotectora; dispositivos u otros materiales para preparar el anticuerpo para la administración; portadores farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para su administración a un sujeto.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo de la invención en un recipiente e instrucciones para usar el kit.

En algunas modalidades, el anticuerpo en el kit está etiquetado.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo anti-PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, y PSMB365.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico, PS3B22, PS3B23, PS3B25, PS3B27, PS3B28 o PS3B30.

Métodos para detectar PSMA o PSMA y CD3

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un método para detectar PSMA en una muestra, que comprende obtener la muestra, poner en contacto la muestra con el anticuerpo antagonista que se une específicamente al PSMA de la invención y detectar el anticuerpo unido a PSMA en la muestra.

Una modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un método para detectar PSMA y CD3 en una muestra, que comprende obtener la muestra, poner en contacto la muestra con el anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3 de la invención, y detectar el anticuerpo unido al PSMA y al CD3 en la muestra.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la muestra puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células circulantes tumorales, células que no se asocian a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral recortado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción unidos a PSMA o PSMA y CD3 pueden detectarse mediante el uso de métodos conocidos. Los métodos ilustrativos incluyen el marcado directo de los anticuerpos con etiquetas fluorescentes o quimiluminiscentes, o radioetiquetas, o la unión a los anticuerpos de la invención de una entidad fácilmente detectable, tal como biotina, enzimas o

etiquetas de epítopo. Las Etiquetas y entidades ilustrativas son rutenio, 111In-DOTA, 111In-ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, poli-histidina (etiqueta HIS), tintes de acridina, tintes de cianina, tintes de fluorona, tintes de oxazina, tintes de fenantridina, tintes de rodamina y tintes Alexafluor®.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en una variedad de ensayos para detectar PSMA o PSMA y CD3 en la muestra. Los ensayos ilustrativos son análisis de transferencia western, radioinmunoensayo, resonancia de plasmón de superficie, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

MODALIDADES

1) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (i) se une a células que expresan PSMA de *Pan troglodytes* recombinante, en donde la unión a las células se mide por citometría de flujo y (ii) se une al dominio extracelular del PSMA de *Pan troglodytes* recombinante (sec. con. núm. de ident.: 4) con una afinidad de aproximadamente 30 nm o menor, en donde la afinidad se mide mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie Proteon XPR36.
2) El anticuerpo de la modalidad 1, en donde el anticuerpo tiene una, dos, tres o cuatro de las siguientes propiedades:

a) se une a las células LNCaP con una EC_{50} calculada de 20 nm o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* con una EC_{50} calculada de 40 nm o menor, en donde la diferencia en EC_{50} calculada entre las células LNCaP que se unen y las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* es menor que 5 veces, y en donde la EC_{50} calculada se mide en un ensayo de unión de células completas a 0 °C mediante el uso de citometría de flujo,

b) se une al ECD del PSMA recombinante de humano (sec. con núm. de ident.: 7), *Pan troglodytes* (sec. con núm. de ident.: 4)y *Macaca fascicularis* (sec. con núm. de ident.: 5) con un equilibrio constante de disociación (K_D) de 12 nM o menor, en donde la K_D se mide usando el sistema ProteOn XPR36 de ensayo de resonancia de plasmón de superficie de Proteon a +25 °C;

c) muestra la destrucción mediada por células T de células LNCaP, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* cuando se emparejan en un anticuerpo biespecífico con anticuerpo anti-CD3, en donde la destrucción mediada por células T se mide por cromo-51 o por ensayo de activación de caspasa 3/7, o

d) reconoce un epítopo conformacional en donde el epítopo se comprende de residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 del PSMA humano (sec. con núm. de ident.: 3)

3) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente.

4) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12 y 24, respectivamente.

5) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente.

6) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente.

7) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente.

8) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29 y 47, respectivamente.

9) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50 y 51, respectivamente.

10) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50 y 51, respectivamente.

11) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente.

12) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12 y 35, respectivamente.

13) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12 y 35, respectivamente.

14) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12 y 24, respectivamente.

15) El anticuerpo de la modalidad 2, que comprende la región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, o 160.

16) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende una región variable de cadena ligera (VL) de las sec. con núms. de ident.: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 61, 76 o 78.

17) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

18) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

19) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

20) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73.

21) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

22) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76.

23) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

24) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

25) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

26) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

27) El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

El anticuerpo de la modalidad 15, que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71.

28) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente.

29) El anticuerpo de la modalidad 28, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

30) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente.

31) El anticuerpo de la modalidad 30, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

32) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente.

33) El anticuerpo de la modalidad 32, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

34) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente.

35) El anticuerpo de la modalidad 34, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73.

36) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12, y 24, respectivamente.

37) El anticuerpo de la modalidad 36, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

38) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12, y 13, respectivamente.

39) El anticuerpo de la modalidad 38, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61.

40) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12, y 24, respectivamente.

41) El anticuerpo de la modalidad 40, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

42) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12, y 35, respectivamente.

43) El anticuerpo de la modalidad 42, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71.

44) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29, y 47, respectivamente.

45) El anticuerpo de la modalidad 44, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76.

46) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50, y 51, respectivamente.

47) El anticuerpo de la modalidad 46, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

48) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 52, 49, 50, y 51, respectivamente.

49) El anticuerpo de la modalidad 48, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78.

50) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12, y 35, respectivamente.

51) El anticuerpo de la modalidad 50, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

52) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

53) El anticuerpo de la modalidad 52, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

54) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante o aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

55) El anticuerpo de la modalidad 54, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

56) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

57) El anticuerpo de la modalidad 56, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

58) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

59) El anticuerpo de la modalidad 58, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 167.

60) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

61) El anticuerpo de la modalidad 60, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

62) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente.

63) El anticuerpo de la modalidad 62, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 167.

64) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

65) El anticuerpo de la modalidad 64, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

66) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

67) El anticuerpo de la modalidad 66, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

68) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente.

69) El anticuerpo de la modalidad 68, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144.

70) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente.

71) El anticuerpo de la modalidad 70, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142.

72) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

73) El anticuerpo de la modalidad 72, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

74) Un anticuerpo anti-PSMA recombinante aislado o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2, y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133, y 132, respectivamente.

75) El anticuerpo de la modalidad 74, en donde el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 141 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

76) El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el anticuerpo es humano o se humaniza.

77) El anticuerpo de la modalidad 76, en donde el anticuerpo es un isotipo IgG4 o IgG1.

78) El anticuerpo de la modalidad 77, que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones en el Fc del anticuerpo.

79) El anticuerpo de la modalidad 77, que comprende:

a) sustituciones L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S y P331S;

b) sustituciones V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S y P331S;

c) sustituciones F234A, L235A, G237A, P238S y Q268A;

d) sustituciones L234A, L235A o L234A y L235A;

e) sustituciones F234A, L235A o F234A y L235A; o

f) una sustitución V234A, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice de la UE.

80) El anticuerpo de la modalidad 79, que comprende sustituciones S228P, F234A y L235A, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice EU.

81) El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1-80, en donde el anticuerpo es biespecífico.

82) El anticuerpo de la modalidad 76, en donde el anticuerpo se une específicamente al PSMA y se une específicamente al CD3, CD5, CD28, CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C y NKG2D, DNAM, NCR, CD18, CD89, CD18, CD32, CD64, CD64 y CD35.

83) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1-82 y un portador farmacéuticamente aceptable.

84) Un polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo de la modalidad 15, la VL del anticuerpo de la modalidad 16, o la VH del anticuerpo y la VL del anticuerpo de la modalidad 15 y 16.

85) Un polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo, la VL del anticuerpo, o la VH del anticuerpo y la VL del anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 28-75.

86) Un vector que comprende el polinucleótido de la modalidad 84.

87) Un vector que comprende el polinucleótido de la modalidad 85.

88) Una célula huésped que comprende el vector de la modalidad 86.

89) Una célula huésped que comprende el vector de la modalidad 87.

90) Un método para producir el anticuerpo de la modalidad 1, que comprende cultivar la célula huésped de la modalidad 89 en condiciones en las que el anticuerpo se expresa, y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.

91) Un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de una cualquiera de las modalidades 1-82 al sujeto que lo necesita durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

92) El método de la modalidad 91, en donde el cáncer es un tumor sólido, neoplasia o una neovasculatura tumoral.

93) El método de la modalidad 92, en donde el tumor sólido es un cáncer de próstata o un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico, un carcinoma renal de células claras, un cáncer de vejiga, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células escamosas, un glioma, un cáncer de mama, un cáncer de riñón, un desorden neovascular, un carcinoma renal de células claras (CCRCC), un cáncer pancreático, un cáncer renal, un cáncer urotelial o un adenocarcinoma del hígado.

94) El método de la modalidad 93, en donde el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente, una neoplasia intraepitelial prostática, un cáncer de próstata independiente de andrógeno, o un cáncer de próstata neoplásico.

95) El método de una cualquiera de las modalidades 90-94, en donde el anticuerpo se administra en combinación con un segundo agente terapéutico.

96) El método de la modalidad 95, en donde el segundo agente terapéutico es un fármaco estándar para el tratamiento del tumor sólido o neoplasia o una neovasculatura tumoral.

97) El método de la modalidad 96, en donde el segundo agente terapéutico es un inhibidor hormonal, un agente antimicrotúbulo, un inhibidor de quinasa, un agente inmunomodulador, un inhibidor de topoisomerasa, una antimetabolito, un inhibidor mitótico, un agente alquilante, una antraciclina, un alcaloide de vinca, un agente intercalante, un agente capaz de interferir con un trayecto de transducción de señales, un agente que promueve la apoptosis, un inhibidor de proteosoma o radiación.

98) El método de la modalidad 96, en donde el segundo agente terapéutico es una vacuna.

99) El método de la modalidad 98, en donde la vacuna es un polipéptido o un fragmento de este, o un ADN o un ARN que codifica el polipéptido o fragmento de este expresado en células tumorales.

100) El método de la modalidad 99, en donde el polipéptido es PSMA, mesotelina, EGFR o EGFRvIII.

101) El método de la modalidad 95, en donde el segundo agente terapéutico se administra simultánea, secuencial o separadamente.

102) El método de una cualquiera de las modalidades 91-101, en donde el sujeto se trata o se está tratando con terapia de radiación.

103) El método de una cualquiera de las modalidades 91-101, en donde el sujeto ha tenido o tendrá una cirugía.

104) El método de una cualquiera de las modalidades 46-58, en donde el anticuerpo aislado comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

105) El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1-82 para usar en terapia.

106) Un anticuerpo antiidiotípico que se une al anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1-82.

107) Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio que se une específicamente al PSMA y un segundo dominio que se une específicamente al CD3, en donde el primer dominio comprende:

a) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núm. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente;

b) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente;

c) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente;

d) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente;

e) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12, y 24, respectivamente.

f) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12, y 13, respectivamente;

g) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18, y 19, respectivamente;

h) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12, y 24, respectivamente;

i) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12, y 35, respectivamente;

j) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29, y 47, respectivamente;

k) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50, y 51 respectivamente;

l) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12, y 35, respectivamente;

m) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente;

n) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29, y 132, respectivamente;

o) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente;

p) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29 y 30, respectivamente;

q) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente;

r) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente;

s) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente;

t) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 133, y 132, respectivamente;

u) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente;

v) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente;

w) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente; o

x) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133 y 132, respectivamente.

108) El anticuerpo biespecífico de la modalidad 107, en donde el primer dominio comprende:

a) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núm. de ident.: 31, 42, 43, 11, 12 y 13, respectivamente, y la VH de SEQ ID NO: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61;

b) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente, y la VH de SEQ ID NO: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63;

c) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente, y la VH de SEQ ID NO: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67;

d) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente, y la VH de SEQ ID NO: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73;

e) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123, 124, 23, 12 y 24, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65;

f) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61;

g) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63;

h) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 23, 12, y 24, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65;

i) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 32, 33, 34, 12, y 35, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71;

j) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44, 45, 46, 29, y 47, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76;

k) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 36, 37, 48, 49, 50, y 51, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78;

l) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, 55, 23, 12, y 35, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69;

m) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 29, y 30, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67;

n) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 131, 29 y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142;

o) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 130, 27, 28, 133, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 138 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143;

p) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 30, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 167;

q) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 136, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144;

r) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 29, y 30, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 167;

s) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 131, 29, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142;

t) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 135, 27, 28, 133, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 140 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143;

u) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 29, y 136, respectivamente; y la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 144;

v) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 131, 29, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 142;

w) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 134, 27, 28, 133, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 139 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143; o

x) la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 137, 27, 28, 133, y 132, respectivamente, y la VH de la sec. con núm. de ident.: 141 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 143.

109) Un anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA/CD3 que comprende un primer dominio que (i) se une a células que expresan PSMA de *Pan troglodytes* recombinante, en donde la unión a las células se mide mediante citometría de flujo y (ii) se une al dominio extracelular del PSMA de *Pan troglodytes* recombinante (sec. con núm. de ident.: 4) con una afinidad de aproximadamente 30 nm o menor, en donde la afinidad se mide mediante un ensayo de resonancia

de plasmón de superficie de Proteon que se une específicamente al PSMA, y un segundo dominio que se une específicamente al CD3.

110) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde el anticuerpo

a) se une a las células LNCaP con una EC_{50} calculada de 20 nm o menor y se une a las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* con una EC_{50} calculada de 40 nm o menor, en donde la diferencia en EC_{50} calculada entre las células LNCaP que se unen y las células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis* es menor que 5 veces, y en donde la EC_{50} calculada se mide en un ensayo de unión de células completas a 0 °C mediante el uso de citometría de flujo,

b) se une al ECD del PSMA recombinante humano (sec. con núm. de ident.: 7), *Pan troglodytes* (sec. con núm. de ident.: 4) y *Macaca fascicularis*(sec. con núm. de ident.: 5) con una constante de disociación de equilibrio (KD) de 12 nm o menor, en donde la KD se mide mediante el uso del sistema ProteOn XPR36 de ensayo de resonancia de plasmón de superficie de ProteOn a +25 °C;

c) muestra la destrucción mediada por células T de células LNCaP, células C42, células HEK que expresan PSMA humano o células HEK que expresan PSMA de *Macaca fascicularis*, en donde la destrucción mediada por células T se mide mediante el ensayo de activación de cromo-51 o caspasa 3/7 o

d) reconoce un epítopo conformacional en donde el epítopo se comprende de residuos I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307, y K324-P326 del PSMA humano (sec. con núm. de ident.: 3).

111) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde el anticuerpo se une a células T.

112) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde el primer dominio comprende

a) la región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2 y una HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16, respectivamente; y la región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 17, 18 y 19, respectivamente;

b) la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 22, respectivamente, y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24, respectivamente;

c) la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, 26 y 27, respectivamente, y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 28, 29 y 30, respectivamente;

d) la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 44 y 45, respectivamente, y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 46, 29 y 47, respectivamente;

e) la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 31, 42 y 43, respectivamente, y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 11, 12 y 13, respectivamente; o

f) la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 122, 123 y 124, respectivamente, y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24, respectivamente.

113) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde el primer dominio comprende la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 de las

a) sec. con núms. de ident.: 14, 15 y 16, respectivamente;

b) sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 22, respectivamente;

c) sec. con núms. de ident.: 25, 26 y 27, respectivamente;

d) sec. con núms. de ident.: 31, 44 y 45, respectivamente;

e) sec. con núms. de ident.: 31, 42 y 43, respectivamente; o

f) sec. con núms. de ident.: 122, 123 y 124, respectivamente.

114) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde el primer dominio comprende la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las

a) sec. con núms. de ident.: 17, 18 y 19, respectivamente;

b) sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24, respectivamente;

c) sec. con núms. de ident.: 28, 29 y 30, respectivamente;

d) sec. con núms. de ident.: 46, 29 y 47, respectivamente;

e) sec. con núms. de ident.: 11, 12 y 13, respectivamente; o

f) sec. con núms. de ident.: 23, 12 y 24, respectivamente.

115) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, en donde

a) el primer dominio comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la sec. con núm. de ident.: 62 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 63 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105

b) el primer dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105;

c) el primer dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105;

d) el primer dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105;

e) el primer dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105;

f) el primer dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 160 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65 y el segundo dominio comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

116) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, que comprende una primera cadena pesada (HC1), una primera cadena ligera (LC1), una segunda cadena pesada (HC2) y una segunda cadena ligera (LC2), en donde la HC1 y la LC1 comprenden las secuencias de aminoácidos de las

a) sec. con núms. de ident.: 84 y 85, respectivamente;

b) sec. con núms. de ident.: 86 y 87, respectivamente;

c) sec. con núms. de ident.: 88 y 89, respectivamente;

d) sec. con núms. de ident.: 125 y 91, respectivamente;

e) sec. con núms. de ident.: 94 y 95, respectivamente; o

f) sec. con núms. de ident.: 96 y 83, respectivamente.

117) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 116, en donde la HC2 y la LC2 comprenden las sec. con núms. de ident.: 110 y 111, respectivamente.

118) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 109, que comprende la HC1, la LC1, la HC2 y la LC2 de las

a) sec. con núms. de ident.: 84, 85, 110 y 111, respectivamente;

b) sec. con núms. de ident.: 86, 87, 110 y 111, respectivamente;

c) sec. con núms. de ident.: 88, 89, 110, 111, respectivamente;

d) sec. con núms. de ident.: 125, 91, 110 y 111, respectivamente;

e) sec. con núms. de ident.: 94, 95, 110 y 111, respectivamente;

f) sec. con núms. de ident.: 96, 83, 110 y 111, respectivamente.

119) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de una cualquiera de las modalidades 109-118, en donde el anticuerpo es humano o humanizado.

120) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 119, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

121) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 120, en donde el anticuerpo es un isotipo IgG1 o IgG4.

122) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 120 o 121, que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones en un Fc del anticuerpo.

123) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 121, que comprende:

a) sustituciones L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S y P331S;

b) sustituciones V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S y P331S;

c) sustituciones F234A, L235A, G237A, P238S y Q268A;

d) sustituciones L234A, L235A o L234A y L235A;

e) sustituciones F234A, L235A o F234A y L235A;

f) sustitución V234A; o

g) sustituciones S228P, F234A y L235A, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con el índice de la UE.

124) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de una cualquiera de las modalidades 109-123, que comprende al menos una sustitución en un dominio constante CH3 del anticuerpo.

125) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 124, en donde la sustitución en el dominio constante CH3 del anticuerpo es sustitución 409R, F405L o F405L/R409K, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice EU.

126) El anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 124, en donde el anticuerpo comprende

a) una sustitución F405L en la HC1 y una sustitución 409R en la HC2, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG1;b) sustituciones V234A, G237A, P238S, H268A, V309L,

A330S, P331S y F405L en la HC1 y sustituciones V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S y 409R en la HC2, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG1; o

b) sustitución S228P en la HC1 y una sustitución S228P, F405L y R409K en la HC2, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG4.

127) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico contra PSMA X CD3 de una cualquiera de las modalidades 109-126 y un portador farmacéuticamente aceptable.

128) Un polinucleótido que codifica la HC1, LC1, HC2 o LC2 del anticuerpo biespecífico contra PSMA X CD3 de la modalidad 118.

129) Un vector que comprende el polinucleótido que codifica la HC1, la LC1, la HC2, la LC2, la HC1 y la LC1 o la HC2 y la LC2 de la modalidad 128.

130) Una célula huésped aislada que comprende el vector de la modalidad 129.

131) Un método para producir el anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 118, que comprende cultivar la célula huésped de la modalidad 130 en condiciones en las que el anticuerpo se expresa, y recuperar y purificar el anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico producido por la célula huésped.

132) Un método para producir el anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico de la modalidad 118, que comprende:

a) combinar un anticuerpo monoespecífico bivalente contra PSMA que tiene dos HC1 idénticas y dos LC1 idénticas y un anticuerpo monoespecífico bivalente contra CD3 que tiene dos HC2 idénticas y dos LC2 idénticas en una mezcla con una relación molar de aproximadamente 1:1;

b) introducir un agente reductor en la mezcla;

c) incubar la mezcla de aproximadamente noventa minutos a aproximadamente seis horas;

d) eliminar el agente reductor; y

e) y purificar el anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico que comprende la HC1, la LC1, la HC2 y la LC2.

133) El método de la reivindicación 132, en donde el agente reductor es 2-mercaptoetanolamina (2-MEA).

134) El método de la modalidad 133, en donde

h) la 2-MEA está presente en una concentración de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 75 mm; y

i) la etapa de incubación se realiza a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C.

135) Un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico aislado contra PSMA X CD3 de una cualquiera de las modalidades 109-126 al sujeto que lo necesita durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

136) El método de la modalidad 135, en donde el cáncer es un tumor sólido, neoplasia o una neovasculatura tumoral.

137) El método de la modalidad 136, en donde el tumor sólido es un cáncer de próstata o un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico, un carcinoma renal de células claras, un cáncer de vejiga, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células escamosas, un glioma, un cáncer de mama, un cáncer de riñón, un trastorno

neovascular, un carcinoma renal de células claras (CCRCC), un cáncer pancreático, un cáncer renal, un cáncer urotelial o un adenocarcinoma del hígado.

138) El método de la modalidad 137, en donde el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente, una neoplasia intraepitelial prostática, un cáncer de próstata independiente de andrógeno, o un cáncer de próstata neoplásico.

139) El método de una cualquiera de las modalidades 135-138, en donde el anticuerpo se administra en combinación con un segundo agente terapéutico.

140) El método de la modalidad 139, en donde el segundo agente terapéutico es un fármaco estándar para el tratamiento del tumor sólido o neoplasia o una neovasculatura tumoral.

141) El método de la modalidad 139, en donde el segundo agente terapéutico es un inhibidor hormonal, un agente antimicrotúbulo, un inhibidor de topoisomerasa, una antimetabolito, un inhibidor mitótico, un agente alquilante, una antraciclina, un alcaloide vinca, un agente intercalante, un agente capaz de interferir con un trayecto de transducción de señales, un agente que promueve la apoptosis, un inhibidor del proteosoma o radiación.

142) El método de la modalidad 139, en donde el segundo agente terapéutico es una vacuna.

143) El método de la modalidad 142, en donde la vacuna es un polipéptido o un fragmento de este, o un ADN o un ARN que codifica el polipéptido o fragmento de este expresado en células tumorales.

144) El método de la modalidad 143, en donde el polipéptido es PSMA, mesotelina, EGFR o EGFRvIII.

145) El método de la modalidad 139, en donde el segundo agente terapéutico se administra simultánea, secuencial o separadamente.

146) El método de una cualquiera de las modalidades 135-145, en donde el sujeto se trata o está siendo tratado con terapia de radiación.

147) El método de una cualquiera de las reivindicaciones 135-145, en donde el sujeto ha tenido o tendrá una cirugía.

148) El método de una cualquiera de las modalidades 135-145, en donde el primer dominio del anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL o sec. con núm. de ident.: 67, y el segundo dominio del anticuerpo para PSMA X CD3 biespecífico comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105.

149) El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 109-126 para usar en terapia.

150) Un anticuerpo antiidiotípico que se une al anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 109-126.

Ejemplo 1: Materiales

Generación de líneas celulares PSMA

Los vectores de expresión que presentan PSMA de longitud completa de chimpancé (H2Q3K5_PANTR, sec. con núm. de ident.: 1) o PSMA de mono cynomolgus de longitud completa (EHH56646.1, sec. con núm. de ident.: 2) se generaron para usar como herramientas de detección para evaluar los prospectos anti-PSMA mediante el uso en un vector de expresión interno con el promotor CMV

mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular. Los vectores se transfectaron transitoriamente en células HEK293F en suspensión usando métodos estándar. Se sembraron células 293F transfectadas en suspensión en el medio de crecimiento más suero para convertirse en el adherente y se seleccionaron para la integración de plásmido estable. Las poblaciones celulares simples se seleccionaron por dilución en serie y la expresión del receptor de superficie de PSMA se cuantificó usando las FACS usando el (anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad del anticuerpo PSMAL (centro) (catálogo núm. OAAB02483, Aviva Systems Biology) como el anticuerpo primario con un anticuerpo secundario anticonejo R-PE (catálogo núm. 111-116-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) y una IgG policlonal de conejo (núm. catálogo SC-532, Santa Cruz Biotechnology) como el control de isotipo).

Las líneas celulares que expresan PSMA humano se generaron mediante el uso de lentivirus (Genecopoeia, cat. núm. EX-G0050-Lv105-10) que contiene PSMA humano de longitud completa (FOLH1_HUMAN, sec. con núm. de ident.: 3) y puromicina para la selección de células positivas del PSMA. Las células HEK293F (ATCC), negativas para PSMA, se transdujeron con partículas lentivirales para sobreexpresar PSMA humano. Después de la transducción, las células que expresan positivamente PSMA y el marcador de resistencia se seleccionaron mediante el tratamiento de células agrupadas, cultivadas en DMEM + FBS HI al 10 % (Life Technologies) y se complementaron con concentraciones variables de Puromicina (Life Technologies).

Además de las líneas celulares HEK generadas, varias líneas celulares comerciales se usaron para ensayos de inmunoadsorción y unión de fagos y de toxicidad celular. Las células FGC de clon LNCaP (ATCC con cat. núm. CRL-1740) son una línea

celular de cáncer de próstata humana disponible comercialmente. Las células C4-2B se desarrollaron originalmente en MD Anderson y se derivaron de LNCaP FGC cultivadas in *vivo* y metástasis a médula ósea (Thalmann, et al 1994, Cancer Research 54, 2577-81).

Generación de proteínas PSMA ECD solubles

La proteína recombinante de dominio extracelular (ECD) del PSMA de chimpancé (Chimp PSMA ECD, sec. con núm. de ident.: 4) se generó para la inmunoadsorción y para evaluar los prospectos de anti-PSMA mediante el uso de un vector de expresión interno con el promotor CMV mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular. El fragmento de gen de ECD del PSMA de chimpancé (aminoácido 44-750 de la sec. con núm. de ident.: 1) con secuencia señal N-terminal (sec. con núm. de ident.: 56), Avitag N-terminal (sec. con núm. de ident.: 57) y marcador 6-His (sec. con núm. de ident.: 58) se clonó mediante el uso de un vector de expresión interno con el promotor CMV mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular y se expresaron transitoriamente en células 293Expi (Invitrogen). ADNc se preparó mediante el uso de técnicas de síntesis génica (patente de los EE. UU. núm. 6.670.127; patente de los EE. UU. núm. 6.521.427). Los sobrenadantes se cosecharon y se aclararon por centrifugación. Las proteínas se purificaron usando un proceso de purificación de dos etapas: 1) Purificación de IMAC con una columna HisTrap HP (Ge Healthcare) y 2) purificación por exclusión de tamaño (Superdex 200, Ge Healthcare) donde el regulador de elución es solución salina regulada con fosfato de Dulbecco, calcio, magnesio (Thermofisher, núm. 14040) que contiene 0,5 mM de $ZnCl_2$ para estabilizar la dimerización del PSMA. Las fracciones que contienen la proteína de interés se combinaron y la concentración de proteína se

determinó por A280. Este material se usó para las mediciones de unión y afinidad y se denomina como PSMG8.

ECD del PSMA de chimpancé también se biotiniló para la inmunoadsorción. El plásmido BirA que se cotransfectó en células de mamíferos a proteínas de biotinilato que contienen la etiqueta Avi se creó internamente. La región codificante BirA (sec. con núm. de ident.: 59) se fusionó con el péptido señal de la cadena pesada de IgG de ratón (sec. con núm. de ident.: 80), y una señal de retención del ER (KDEL ("KDEL" como se describe en la sec. con núm. de ident.: 156) se añadió al terminal C para generar BirA (sec. con núm. de ident.: 112). El gen construido se clonó en un vector de expresión bajo el control del promotor CMV. Para producir el antígeno PSMA biotinilado, el ADN plasmídico del PSMA se añadió en un exceso de cuatro veces (p/p) al plásmido BirA en la mezcla de transfección.

La biotinilación de la proteína de ECD del PSMA de chimpancé se realizó mediante la etiqueta Avi por cotransfección de un constructo de expresión de BirA y la proteína secretada resultante se purificó usando un proceso de purificación de dos etapas: 1) Purificación IMAC con una columna HisTrap HP (Ge Healthcare) y 2) purificación por exclusión de tamaño (Superdex 200, Ge Healthcare), donde el regulador de elución es solución salina regulada de Dulbecco, calcio, magnesio (Thermofisher, núm. 14040) que contiene 0,5 mM de ZnCl2 para estabilizar la dimerización del PSMA. La proteína se probó para endotoxina antes de usar en los estudios de inmunoadsorción de fagos.

La proteína recombinante de dominio extracelular (ECD) de PSMA de mono cynomolgus (ECD del PSMA de cyno, sec. con núm. de ident.: 5), que corresponde a los aminoácidos 44-750 de la sec. con núm. de ident.: 2 con señal N-terminal (sec. con núm.

de ident.: 56), Avi N-terminal (sec. con núm. de ident.: 57) y etiquetas 6His (sec. con núm. de ident.: 58) se clonó y se expresó como se describió anteriormente para la ECD del PSMA de chimpancé. La biotinilación de la proteína ECD del PSMA de cyno se realizó por medio de la etiqueta Avi por cotransfección de un constructo de expresión BirA y la proteína secretada resultante se purificó por una purificación de dos etapas con la columna HisTrap HP de IMAC (GE Healthcare) y columnas MonoAvidin. La proteína se probó para endotoxina antes de usar en los estudios de inmunoadsorción de fagos. Este material se usó, además, para las mediciones de unión y de afinidad y se refiere como PSMG1.

Una segunda proteína ECD recombinante del PSMA de cyno (PSMA Fc de cyno, sec. con núm. de ident.: 6) con una Fc de IgG1 (sec. con núm. de ident.: 81) se clonó y expresó mediante el uso de un vector de expresión interno con el promotor CMV usando técnicas estándar de biología molecular. La proteína Fc de CynoPSMA se expresó transitoriamente en células 293HEK-expi. La transfección transitoria de PSMG3 en células HEK293 Expi se cosecharon 5 días después de la transfección, aclararon por centrifugación (30 min, 6000 rpm) y filtraron (0,2 µ de membrana de PES, Corning). La cantidad relativa de IgG se determinó con el instrumento Octet (ForteBio) usando una IgG conocida purificada (mismo isotipo) añadida en medio gastado para generar la curva estándar.

El sobrenadante de Fc del PSMA clarificado de macaco se cargó en una columna de proteína A segura de MabSelect HiTrap (dPBS, pH 7,2) equilibrada (GE Healthcare) a una concentración relativa de ~30 mg de proteína por ml de resina. Después de cargar, la columna se lavó con dPBS, pH 7,2 y la proteína se eluyó con 10 volúmenes de columna de 0,1 M de Na-acetato, pH de 3,5. Las fracciones pico se agruparon, se neutralizan con

2M de Tris, pH de 7 y se filtraron (0,2 µ). La muestra de proteína neutralizada se dializó contra 3 cambios de dPBS que contenían Ca2+, Mg2+ y 0,5 mM de ZnCl2, pH de 7,2 durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró la muestra de diálisis, se filtró (0,2 µ) y la concentración de proteínas se determinó mediante absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro BioTek SynergyHTTM. La calidad de las proteínas purificadas se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño HPLC analítica (sistema Dionex HPLC). Los niveles de endotoxina se midieron usando un ensayo LAL (Pyrotell-T, Associates of Cape Cod). Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C.

La proteína recombinante de dominio extracelular (ECD) del PSMA humano (ECD del PSMA humano, sec. con núm. de ident.: 7), que corresponde a los aminoácidos 44-750 de la sec. con núm. de ident.: 3 con Avi N-terminal y etiquetas 6His (sec. con núm. de ident.: 58) se clonaron, expresaron y purificaron como se describió anteriormente para las proteínas de ECD del PSMA de cyno y chimpancé.

Ejemplo 2: Identificación de Fab del PSMA antichimpancé y antihumano

Inmunoadsorción con proteínas recombinantes. Una inmunoadsorción de primera solución de las genotecas fab humanas-pIX de novo [Shi, L., et al J Mol Biol, 2010. 397(2): p. 385-396. patente núm. WO 2009/085462], que consiste en VH1-69, genotecas de cadena pesada 3-23 y 5-51 emparejadas con cuatro genotecas de genes de la línea germinal de VL humanos (A27, B3, L6, O12), se realizó usando un enfoque de inmunoadsorción alterna con una ronda de captura en fago en glóbulos de estrepavidina (Invitrogen cat. núm. 112.05D, lote núm. 62992920) recubiertos con ECD del PSMA de chimpancé biotinilado de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido por la captura

en fago en glóbulos ProtG (Invitrogen, cat. núm. 10003D) recubiertos con cyno-PSMA-Fc de acuerdo con el protocolo del fabricante seguido por la captura en fagos en glóbulos magnéticos de neutravidina de doble velocidad Sera-mag (Thermo, cat. núm. 7815-2104-011150) recubiertos con ECD del PSMA de chimpancé biotinilado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta inmunoadsorción produjo dos aciertos: PSMB18 y PSMB25.

Inmunoadsorción de células completas para Fab anti-PSMA. Se realizaron experimentos de inmunoadsorción adicionales sobre células enteras usando la ronda núm. 1 de salida de los experimentos de inmunoadsorción de ECD de chimpancé descritos anteriormente o genotecas de fagos *de novo* frescos, como entrada. Brevemente, el fago se produjo por infección por fagos auxiliares y se concentró mediante precipitación con PEG/NaCl de acuerdo con los protocolos estándar conocidos en la técnica. Las genotecas de fagos se limpiaron previamente con células HEK293F parentales no transfectadas durante la noche a 4 °C con balanceo suave. Después de la precipitación con PEG/NaCl, las genotecas aclaradas previamente se incubaron con células HEK293 que expresan PSMA de chimpancé o células LNCAP con balanceo suave durante 2 h a 4 °C. La eliminación de fagos no unidos y la recuperación de las células de unión a fagos se realizó por gradiente de Ficoll, y después de varias etapas de lavado con, las células que portan los fagos unidos se incubaron con 1 ml de cultivo de TG-1 *E. coli* a 37 °C por 30 minutos sin agitación. La mezcla resultante se colocó en placas de glucosa de Lb-carbenicilina-1 % placas y se cultivó durante la noche a 37 °C. Después, el proceso se repitió para rondas de inmunoadsorción subsiguientes.

Conversión de fago Fab-Pix a Fab-his para generar sobrenadantes de E. coli. Los aciertos Fab-Pix de fago resultantes se convirtieron a Fab-His usando un procedimiento estándar. El ADN plasmídico se aisló de E. coli por inmunoadsorción con fago (kit Plasmid Plus Maxi Kit, cat. núm. 12963 de Qiagen) y se sometió a digestión de restricción NheI/SpeI. Los fragmentos 5400 y 100 bp resultantes se separaron en un gel de agarosa al 0,8 % y el fragmento 5400 bp se purificó en gel (kit de purificación con PCR MinElute, cat. núm. 28006 de Qiagen). La banda 5400 bp purificada se autoligó usando ligasa T4 y el producto resultante (que codifica la fusión Fab-his) se transformó nuevamente en la cepa TG-1 E. coli y se aisló por clonación. Los sobrenadantes Fab-His se generaron a partir de clones por inducción durante la noche de cultivos con 1 mM de IPTG. Después de la centrifugación de cultivo durante la noche, aclaró los sobrenadantes aclarados estuvieron listos para usar en ensayos corriente abajo. Para determinar los niveles de expresión relativos de los diferentes sobrenadantes Fab-His, se realizó un análisis de ELISA anti-kappa (cat. núm. 2061-05 de Southern Biotech) en sobrenadantes diluidos en serie. Todos los clones probados exhibieron una expresión Fab-His similar (datos no mostrados).

Unión celular de fusiones Fab-His de E. coli. Un ensayo de unión basado en células se diseñó para evaluar las capacidades de unión de fusiones Fab-His individuales de sobrenadantes de E. coli a células que expresan PSMA. Los clones de Fab individuales se aislaron de la ronda 3 de salida de todos los experimentos de inmunoadsorción siguiendo la escisión pIX. Los clones de Fab se probaron para unirse a las células HEK que expresan PSMA de chimpancé y cynomolgus, así como al PSMA humano en las células LNCaP. Brevemente, las células que expresan PSMA se

dividieron en alícuotas en una placa con fondo en V (CoStar 3357) a una densidad de 200.000 por pocillo y se incubaron con (100 µl) sobrenadantes que expresan fragmentos Fab por 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 2 % y se tiñeron con un anticuerpo kappa-RpE antihumano de ratón (Life Technologies cat. núm. MH10514) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS a 2 % y se resuspendieron en 100 µl del mismo regulador de lavado. Las placas se identificaron en un citómetro de flujo de matriz de BD FACS. Los datos de FACS se analizaron en el software FlowJo mediante la activación en vivo de la población sana de células usando dispersión directa y dispersión lateral, y después analizar las células dentro de esta puerta para la tinción de PE. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y exportó a Microsoft Excel. Los clones Fab que exhibieron un fondo de unión ≥ de 3 veces para todas las tres especies del PSMA (cyno, chimpancé y humano), y no exhibieron unión a la línea celular HEK293, se etiquetaron como ‘‘positivos preliminares’’. Los Fab se secuenciaron y avanzaron para clonación en el vector de expresión de mamíferos para redetección. Los verdaderos positivos se seleccionaron a partir de la unión de los sobrenadantes Fab expresados en células de mamíferos a líneas celulares que expresan PSMA.

Preparación de Fab de mamíferos. Para la conversión de Fab de E. coli a Fab expresado en mamíferos, se usó clonación In-fusion HD (ClonTech, cat. núm. 638918) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las secuencias de nucleótidos de clones que han pasado la detección primaria y van a moverse en formato Fab de mamífero, se cargan en el programa ‘‘InFu Primer Finder v1.2.3’’ (software desarrollado internamente), que genera una lista de iniciadores de PCR

específicos de isotipos usados para generar fragmentos de PCR para la clonación In-Fusion en los vectores de expresión huKappa_muIgGSP y Fab de huG1. Estos vectores son vectores internos con promotores CMV basados en pcDNA3.1. Después del proceso In-Fusion, se aislaron los clones de E. coli, se verificó la secuencia y se transfectaron en células HEK293 usando protocolos estándar Se prepararon Fabs del PSMA de mamífero para confirmar la unión a líneas celulares que expresan PSMA al recolectar 20 ml de sobrenadantes de la transfección después de 5 días.

Redetección de aciertos de inmunoadsorción de células enteras en formato sub de mamíferos. La confirmación de los sobrenadantes Fab expresados en mamíferos se realizó usando el ensayo de unión de célula entera descrito anteriormente. Se probó la unión de Fab al PSMA humano (células LNCaP), chimpancé y células de mono cynomolgus, así como la detección selectiva de la ausencia de unión a la línea celular HEK parental. La Tabla 3 muestra el perfil de acierto de la unión del sobrenadante de Fab de mamífero a las células que expresan PSMA. Muchos de los aciertos de los sobrenadantes de E. coli no confirmaron con proteínas expresadas de mamíferos. PSMB47 mostró una alta unión a células que expresan PSMA de cyno y alguna unión a células que expresan PSMA de chimpancé, pero sin unión a las células LNCaP que expresan PSMA humano. PSMB55 mostró un perfil similar, pero con algunas uniones a células LNCaP. PSMB68–PSMB79 se unió a células LNCaP, pero no a células que expresan PSMA de chimpancé o cynomolgus. Los sups de Fab de mamíferos PSMB51, PSMB55 y PSMB56 se unieron a todas las tres líneas celulares. PSMB49, PSMB50, y PSMB53 muestran más unión a chimpancé o cynomolgus. M58 mostró una ligera unión a chimpancé y cynomolgus.

Tabla 3. Perfil de impacto de la unión de la proteína Fab de mamífero a las células que expresan PSMA medidas por Geo-MFI (intensidad fluorescente media)

Ident. de proteína Fab (Ident. de ADN de Fab)	cyno	chimpancé	LNCaP	HEK parental
PSMB10 (PSMM10)	244	81,6	-	248
PSMB11 (PSMM11)	19	6,6	-	8,14
PSMB12 (PSMM12)	31,6	8,05	-	12,6
PSMB13 (PSMM13)	57,8	18,2	-	50,5
PSMB14 (PSMM14)	32,6	13,1	-	22,2
PSMB15 (PSMM15)	40,4	18,5	-	38
PSMB16 (PSMM16)	175	220	-	6,39
PSMB17 (PSMM17)	34,9	22,4	-	40,1
PSMB18 (PSMM18)	696	439	-	8,71
PSMB19 (PSMM19)	53,7	-	5,15	4,47
PSMB20 (PSMM20)	5,75	-	5,85	41,3
PSMB21 (PSMM21)	94,4	-	20,7	372
PSMB22 (PSMM22)	9,07	-	7,92	54,9
PSMB23 (PSMM23)	16,4	-	6,66	164
PSMB24 (PSMM24)	14,6	9,6	4,09	3,96
PSMB25 (PSMM25)	15,2	11,3	16,9	4,09
PSMB26 (PSMM26)	9,48	-	7,26	114
PSMB27 (PSMM27)	20	-	7,56	136
PSMB28 (PSMM28)	29,7	-	8,88	302
PSMB29 (PSMM29)	6,87	-	5,7	72,8
PSMB30 (PSMM30)	5,16	-	4,58	45
PSMB31 (PSMM31)	5,99	-	-	25,5
PSMB32 (PSMM32)	4,81	-	-	27,1
PSMB33 (PSMM33)	5,14	-	-	40,1
PSMB34 (PSMM34)	17,9	-	-	107
PSMB35 (PSMM35)	58,5	-	-	231
PSMB36 (PSMM36)	5,05	-	-	6,96
PSMB37 (PSMM37)	23,4	-	-	178
PSMB38 (PSMM38)	4,05	-	-	7,7
PSMB39 (PSMM39)	10,2	-	-	166
PSMB40 (PSMM40)	66,9	-	-	348
PSMB41 (PSMM41)	5,39	-	-	12

PSMB42 (PSMM42)	7,35	-	-	25,8
PSMB43 (PSMM43)	8,73	-	-	7,18
PSMB44 (PSMM44)	12,6	-	-	48,9
PSMB45 (PSMM45)	22,4	-	-	43,1
PSMB46 (PSMM46)	3,88	-	-	5,29
PSMB47 (PSMM48)	101	25,5	3,46	2,85
PSMB48 (PSMM49)	2,72	3,18	2,68	2,72
PSMB49 (PSMM50)	51,6	22	3,22	3,48
PSMB51 (PSMM52)	285	231	41,5	2,68
PSMB52 (PSMM53)	39,2	6,89	2,67	2,56
PSMB53 (PSMM54)	27,6	17,8	4	2,6
PSMB54 (PSMM55)	2,7	2,75	2,65	2,79
PSMB55 (PSMM56)	226	180	17,2	2,58
PSMB56 (PSMM57)	95,6	34,7	24,5	2,52
PSMB57 (PSMM58)	19,8	11	3,26	2,68
PSMB58 (PSMM59)	121	192	25,3	2,67
PSMB59 (PSMM60)	4,96	9,69	6,04	3
PSMB60 (PSMM61)	2,28	3,07	87,3	4,64
PSMB61 (PSMM62)	2,1	3,16	135	2,98
PSMB62 (PSMM63)	7,17	4,43	54,9	9,09
PSMB63 (PSMM64)	2,07	2,95	27	2,82
PSMB64 (PSMM65)	2,39	3,26	70,5	3,05
PSMB65 (PSMM66)	2,3	3,13	32,4	4,25
PSMB66 (PSMM67)	2,14	3	24,6	2,83
PSMB67 (PSMM68)	2,23	2,95	21	2,95
PSMB68 (PSMM69)	5,44	-	134	35,3
PSMB69 (PSMM70)	2,29	3,38	25,5	3,35
PSMB70 (PSMM71)	2,22	3,49	15,5	3,26
PSMB71 (PSMM72)	2,54	4,4	18,5	3,07
PSMB72 (PSMM73)	2,13	3,53	227	3,02
PSMB73 (PSMM74)	2,97	4,13	125	11,1
PSMB74 (PSMM75)	120	-	178	132
PSMB75 (PSMM76)	2,99	3,04	173	7,89
PSMB76 (PSMM77)	3,75	3,99	138	3,95
PSMB77 (PSMM78)	4,68	3,96	144	4,71
PSMB78 (PSMM79)	25,2	-	378	24,4
PSMB79 (PSMM80)	38,4	-	512	157

PSMB80 (PSMM81)	19,6	18,6	20,9	6,61
PSMB81 (PSMM82)	2,63	2,06	4,07	2,69
PSMB82 (PSMM83)	2,79	2,23	4,11	2,76
PSMB83 (PSMM84)	2,59	2,28	4,09	2,74
PSMB84 (PSMM85)	750	729	192	3,15
PSMB85 (PSMM86)	2,84	2,59	2,33	3,24
PSMB86 (PSMM87)	224	176	31,7	2,82
PSMB87 (PSMM88)	2,63	2,27	4,23	2,91
PSMB88 (PSMM89)	37,7	29,7	30,3	7,6
PSMB89 (PSMM90)	27,1	27,3	53,2	39,5
PSMB90 (PSMM91)	26,7	24,7	47,1	36,4
PSMB91 (PSMM92)	8,97	6,16	13	6,63
PSMB92 (PSMM93)	20	16,5	57,1	50
PSMB93 (PSMM94)	5,13	9,62	2,5	3,66
PSMB94 (PSMM95)	5,12	2,67	2,22	3,57
PSMB95 (PSMM96)	8,9	8,82	13,4	11,4
PSMB96 (PSMM97)	2,4	3,25	2,53	4,03
PSMB97 (PSMM98)	2,57	4,73	2,52	3,7
PSMB99 (PSMM100)	9,95	2,4	2,39	4,03
PSMB100 (PSMM101)	4,03	2,52	2,33	3,37
PSMB100 (PSMM101)	3,5	2,86	2,48	4,57
PSMB101 (PSMM102)	5,49	3,18	2,23	3,33
PSMB102 (PSMM103)	2,4	2,42	2,16	3,2
PSMB103 (PSMM104)	3,52	3,26	2,58	4,44
PSMB104 (PSMM105)	2,15	2,5	2,34	3,95
PSMB105 (PSMM106)	2,03	2,39	2,18	3,39
PSMB106 (PSMM107)	2	2,4	2,27	3,59
PSMB107 (PSMM108)	2	2,47	2,33	3,49
PSMB108 (PSMM109)	2	2,58	2,28	3,46
PSMB109 (PSMM110)	321	326	34,9	6,11
PSMB110 (PSMM111)	2,3	2,31	2,31	3,4
PSMB111 (PSMM112)	2,32	2,31	-	3,21
PSMB112 (PSMM113)	6,28	5,7	2,71	3,28
PSMB113 (PSMM114)	2,82	2,95	2,32	3,29
PSMB114 (PSMM115)	2,78	2,47	4,3	3,14
PSMB115 (PSMM116)	2,66	2,59	2,2	3,14
PSMB46 (PSMM117)	4,54	3,18	2,21	4,79

PSMB67 (PSMM118)	3,95	4,3	3	6,13
PSMB74 (PSMM119)	7,94	13	3,16	12,5
PSMB78 (PSMM120)	5,08	4,79	22,3	6,82
PSMB81 (PSMM121)	3,66	3,83	3,05	5,11
PSMB82 (PSMM122)	15,1	28,4	10,8	24,3
PSMB83 (PSMM123)	37,5	42,1	3,04	4,88
PSMB85 (PSMM124)	34,6	52,9	20,7	46,8
PSMB87 (PSMM125)	4,23	3,74	2,26	4,73
PSMB89 (PSMM126)	51,8	53,1	11,7	6,27
PSMB90 (PSMM127)	42,8	30,2	7,74	5,99
PSMB91 (PSMM128)	3,9	27,6	2,37	4,32
PSMB92 (PSMM129)	45,7	37,3	12,1	7,4
PSMB93 (PSMM130)	5,13	7,85	4,11	7,82
PSMB94 (PSMM131)	3,67	3,23	2,32	4,72
PSMB95 (PSMM132)	4,05	3,64	2,56	5,57
PSMB96 (PSMM133)	3,91	4,54	2,37	4,65
PSMB97 (PSMM134)	3,22	3,16	4,08	4,22
PSMB98 (PSMM135)	15,6	12,7	2,22	4,21
PSMB99 (PSMM136)	4,08	3,26	2,22	5,04
PSMB100 (PSMM137)	5,24	3,82	2,16	4,83
PSMB101 (PSMM138)	3,84	3,14	2,23	4,52
PSMB102 (PSMM139)	4,51	3,82	2,23	4,59
PSMB103 (PSMM140)	6,81	4,27	2,21	5,41
PSMB104 (PSMM141)	7,52	4,35	2,26	4,39
PSMB105 (PSMM142)	5,03	11,2	4,87	7,28
PSMB106 (PSMM143)	3,87	3,8	2,73	4,9
PSMB107 (PSMM144)	3,3	3,35	2,3	4,64
PSMB108 (PSMM145)	6,78	3,83	2,33	4,98
PSMB110 (PSMM146)	4,03	3,23	2,28	5,3
PSMB111 (PSMM147)	3,71	3,26	2,36	5,11
PSMB112 (PSMM148)	4,54	3,26	2,26	4,86
PSMB113 (PSMM149)	84,3	104	51,7	94,2
PSMB114 (PSMM150)	3,31	3,26	2,21	5,14
PSMB115 (PSMM151)	3,55	3,43	2,3	4,21

Curvas de respuesta a la dosis de Fab expresados en mamíferos. Una vez que se confirmaron los clones Fab expresados en mamíferos para la unión positiva como sobrenadantes Fab puros a las líneas celulares que expresan PSMA, los sobrenadantes se normalizaron para la concentración proteica por octeto o gel de proteína, y las curvas de respuesta a la dosis se completaron para confirmar la unión del PSMA usando el protocolo descrito anteriormente. Las Figuras 1 - 3 muestran curvas de titulación para aciertos que demostraron unión a las tres células que expresan PSMA. La Figura 1 muestra las curvas de titulación para los aciertos de inmunoadsorción anti-PSMA frente a células LNCaP La Figura 2 muestra las curvas de titulación para los aciertos de inmunoadsorción anti-PSMA frente a células HEK del PSMA de chimpancé. La Figura 3 muestra las curvas de titulación para los aciertos de inmunoadsorción anti-PSMA frente a células HEK del PSMA de cynomolgus. PSMG5 (PSMA de cynomolgus, GenBank: EHH56646.1) o PSMG9 (PSMA de chimpancé, secuencia de referencia del NCBI: XP_016777253.1) se clonaron en un vector de expresión de mamífero entre los sitios HindII y EcoRI bajo el control del promotor de CMV para la generación de líneas celulares. El ADN diseñado se transfectó en las células 293F usando el reactivo Lipofectamine LTX seguido del antibiótico de selección Geneticin para seleccionar células positivas para PSMA (PSMG5 o PSMG9). Después de la selección, las células se analizaron y se clasificaron mediante el anticuerpo anti-PSMA (Aviva Cat. núm. OAAB02483-PSMG9) o Fab anti-PSMA (PSMB18-Janssen Internal) usando FACS. Los clones de PSMG5 11, 23, 25 y 32 y los clones de PSMG9 2, 10, 11, 12, 20 y 24 clasificados con FACS se seleccionaron y se entregaron para la detección. Las secuencias de PSMG5

y PSMG9 se proporcionan más abajo. Se compararon los perfiles de unión entre los aciertos de líneas celulares que expresan diferentes especies del PSMA. El sobrenadante de PSMB51 se usó como un control positivo a lo largo de los experimentos. Se despriorizó varios aciertos debido a los sitios de glicosilación ligados a N en las CDR, la unión a la línea celular HEK parental negativa del PSMA o la falta de unión a las líneas celulares positivas del PSMA. Quedaron once aciertos de Fab y se clonaron 10 aciertos en constructos de cadena pesada de IgG4-PAA humana, y se usaron para generar anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3. Estos aciertos mostraron unión de especies cruzadas dentro de 3 veces entre sí y se movieron a un formato de anticuerpo biespecífico para ser probado para la eliminación por redireccionamiento de células T de objetivos positivos del PSMA. Los antígenos de inmunoadsorción para cada acierto se muestran en la Tabla 4.

PSMG5 (sec. con núm. de ident.:126)

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSS
SEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLHNFTQIPHLAGTEQNFQLAK
QIQSQWKEFGLDSVELTHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSL
FEPPPAGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLER
DMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGATGVILYSDPDDYFAP
GVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRG
MAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSASPDSSWRGSLKVPYN
VGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTSEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGG
HRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGMLKKEGWRPRRTILFASWD
AEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPL

MYSLVYNLTKELESPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLG
SGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSSYPLYHSVYETYELVE
KFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSVVLPFDCRDYAVVLRKYAD
KIYNISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLRDFDKSN
PILLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESF
PGIYDALFDIESKVDPSQAWGEVKRQISIATFTVQAAAETLSEVA

PSMG9 (sec. con núm. de ident.:127)

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSS
NEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAK
QIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSL
FEPPPPGYENVLDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLER
DMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAP
GVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRHGI
AEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNV
GPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGH
RDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDA
EEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLM
YSLVYNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGS
GNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEK
FYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKI
YNISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFTERLQDFDKSNPI

LLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFP

GIYDALFDIESKVDPSKAWGDVKRQISVAAFTVQAAAETLSEVA

Tabla 4. Antígeno para cada uno de los aciertos de inmunoadsorción

Antígeno de la Ronda 1	Antígeno de las Rondas 2-3	Aciertos	Identificación de aciertos
ECD de PSMA de chimp.	ECD de PSMA de cyno	2	PSMB18, PSMB25
ECD de PSMA de chimp.	HEK de PSMA de chimp.	9	PSMB49, PSMB51, PSMB56, PSMB58, PSMB109, PSMB55, PSMB84, PSMB83
LNCaP	HEK de PSMA de chimp.	2	PSMB86, PSMB80

Preparación de mAb anti-PSMA Un total de 12 clones que demostraron unión a las células que expresan PSMA se convirtieron, finalmente, en mAb IgG4 que tiene isotipos S228P, F234A y L235A (PAA) de sustituciones Fc por clonación de restricción. Brevemente, los constructos correspondiente a clones Fab que han pasado detecciones iniciales se digirieron con HindIII y Hapaii. Los fragmentos purificados en gel se ligaron en un vector de expresión interno con el promotor de CMV para la generación de la expresión de IgG4-PAA humana. Esto permitió la rápida generación de anticuerpos biespecíficos. El vector de expresión interno descrito anteriormente se usó para expresar las cadenas pesada y ligera para cada mAb PSMA, donde ambos vectores se cotransfectaron transitoriamente en líneas celulares 293Expi o CHO para la expresión del mAb. Las secuencias de CDR de Fab de PSMA positivas para especies cruzadas generadas a partir de la inmunoadsorción de fagos se muestran más adelante en la Tabla 5. Las secuencias de VH y VL de los Fab seleccionados se muestran más adelante en la Tabla 6. Las secuencias de cadena pesada y ligera de mAb generadas a partir de los Fab se muestran en la Tabla 7.

Tabla 5. Secuencias de CDR (definidas de acuerdo con Kabat) de FAb a partir de la inmunoadsorción de fagos (las correspondientes secs. con núms. de ident. se enumeran entre paréntesis)

Ident. de FAB		CDR (sec. con núm. de ident.:)		
		CDR1	**CDR2**	**CDR3**
PSMB58	HC	SYWIS (122)	IIYPGDSYTRYSPSFQG (123)	DYEWELFDSRLDY (124)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB109	HC	NAWIS (8)	WINPESGRANYAQKFQG (9)	ELYYLVYSTYYYAFDY (10)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB86	HC	SYDIS (14)	GIIPIEGTANYAQKFQG (15)	DYPAGYGFDY (16)
	LC	RASQSVSSSYLA (17)	GASSRAT (18)	QQYGSSPLT (19)
PSMB84	HC	SDWMS (20)	AISGNGGSTEYADSVKG (21)	DPYYYYDGDSYYGMDV (22)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB83	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSVKG (26)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB56	HC	SYAIS (31)	WISPYNGNANYAQKFQG (32)	DSDRSYNLDY (33)
	LC	RASQSISGWLN (34)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB55	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	GLPIWYLDY (38)
	LC	RASQSVASDLA (39)	FASNRAT (40)	QQSITWPFT (41)
PSMB51	HC	SYAIS (31)	WIIPYNGNANYAQKFQG (42)	VNSAALVWERLDY (43)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)

PSMB49	HC	SYAIS (31)	GIIPIFGTANYAQKFQG (44)	ASRVWHASYGYLDY (45)
	LC	RASQSVSKWLA (46)	DASNRAT (29)	QQRFTAPWT (47)
PSMB25	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	GWAYDRGLDY (48)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB18	HC	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (37)	AYHYSKGLDY (52)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB80	HC	DYAIS (53)	RIDPIEGTANYAQKFQG (54)	DRYYYDGVYWYSDYFDY (55)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)

Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB119 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 79 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB120 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 77 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 78 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB121 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 75 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 76 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB122 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 74 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB123 que comprende las regiones VH y VL que tienen

la VH de la sec. con núm. de ident.: 72 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 73 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB124 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 70 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB126 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 68 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB127 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 66 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB128 Ident. de Fab alt.: PSMB84) que comprenden las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 64 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB129 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 60 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 61 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-PSMA PSMB130 que comprende las regiones VH y VL que tienen la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A y L235A.

Tabla 6. Secuencias VH y VL de Fab de PSMA

Ident. de FAB	Secuencia de aminoácidos VH	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos VL	Sec. con núm. de ident.
PSMB109	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG WISPYNGNANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVNS AALVWERLDYWGQGTLVTVSS	60	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSIDRWLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSPRYPLT FGQGTKVEIK	61
PSMB86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFKSYDISWVRQAPGQGLEWMG GIIPIEGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYPA GYGFDYWGQGTLVTVSS	62	EIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGQGTKVEIK	63
PSMB84	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFDSDWMSWVRQAPGKGLEWVS AISGNGGSTEYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP YYYYDGDSYYGMDVWGQGTLVTVS S	64	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIK	65
PSMB83	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	66	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQRSNWPLTF GQGTKVEIK	67
PSMB80	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFDDYAISWVRQAPGQGLEWMG RIDPIEGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRYY YDGVYWYSDYFDYWGQGTLVTVSS	68	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIK	69
PSMB58	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYEW ELFDSRLDYWGQGTLVTVSS	160	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIK	65
PSMB56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG WISPYNGNANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDSD RSYNLDYWGQGTLVTVSS	70	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISGWLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPLT FGQGTKVEIK	71
PSMB55	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARGLPI WYLDYWGQGTLVTVSS	72	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVASDLAWYQQ KPGQAPRLLIYFASNRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQSITWPF TFGQGTKVEIK	73
PSMB51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG	74	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSIDRWLNWYQQ	61

	WIIPYNGNANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVNS AALVWERLDYWGQGTLVTVSS		KPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSPRYPLT FGQGTKVEIK	
PSMB49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARASRV WHASYGYLDYWGQGTLVTVSS	75	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSKWLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQRFTAPWT FGQGTKVEIK	76
PSMB25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARGWAY DRGLDYWGQGTLVTVSS	77	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYY STPLTFGQGTKVEIK	78
PSMB18	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARAYHY SKGLDYWGQGTLVTVSS	79	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYY STPLTFGQGTKVEIK	78

Tabla 7 Secuencias de cadena pesada y ligera de mAb con las correspondientes sec. con núms. de ident.

Ident. de mAb	**Secuencia de aminoácidos de cadena pesada**	**Sec. con núm. de ident.**	**Secuencia de aminoácidos de cadena ligera**	**Sec. con núm. de ident.**
PSMB129 (FAB PSMB109)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG WISPYNGNANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVNS AALVWERLDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	82	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSIDRWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSPRYPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	83
PSMB130 (FAB PSMB86)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFKSYDISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIEGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDY PAGYGFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA	84	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN	85

	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK		ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
PSMB128 (FAB PSMB84)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDSDWMSWVRQAPGKGLEW VSAISGNGGSTEYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPYYYYDGDSYYGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	87
PSMB127 (FAB PSMB83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	88	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	89
ADN de PSMB127	atggcttgggtgtggaccttgctattcctgatggcag ctgcccaaagtatacaggccgaggttcagctgct ggaatctggcggaggattggttcagcctggcggct ctctgagactgtcttgtgccgcttctggcttcaccttc aagtccgacgctatgcactgggtccgacaggccc ctggaaaaggactggaatgggtgtccgagatctc tggctctggcggctacaccaactacgccgactcc atgaagtcccggttcaccatctctcgggacaactc caagaacaccctgtacctgcagatgaactccctg agagccgaggacaccgccgtgtactactgcgcc agagactcctacgactccagcctgtacgtgggcg	161	atggcctgggtgtggaccctgctgttcctgat ggccgccgcccagagcatccaggccgag atcgtgctgacccagagccccgccaccctg agcctgagccccggcgagcgggccaccct gagctgccgggccagccagagcgtgagc agctacctggcctggtaccagcagaagcc cggccaggcccccggctgctgatctacga cgccagcaaccgggccaccggcatcccc gcccggttcagcggcagcggcagcggca ccgacttcaccctgaccatcagcagcctgg agcccgaggacttcgccgtgtactactgcc	162

	actacttcgattattggggccagggcaccctggtc accgtttcttctgcttccaccaagggcccatccgtct tccccctggcgccctgctccaggagcacctccga gagcacagccgccctgggctgcctggtcaagga ctacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaact caggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcc cggctgtcctacagtcctcaggactctactccctca gcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaa gcccagcaacaccaaggtggacaagagagttg agtccaaatatggtccccatgcccaccatgccc agcacctgaggccgccgggggaccatcagtcttc ctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgat ctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtg gacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttc aactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatg ccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaac agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct gcaccaggactggctgaacggcaaggagtaca agtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctc catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggc agccccgagagccacaggtgtacaccctgcccc catcccaggaggagatgaccaagaaccaggtc agcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccag cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt gctggactccgacggctccttcttcctctacagcag gctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagg ggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct gcacaaccactacacacagaagagcctctccct gtctctgggtaaa		agcagcggagcaactggcccctgaccttc ggccagggcaccaaggtggagatcaagc gtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcc cgccatctgatgagcagttgaaatctggaa ctgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttcta tcccagagaggccaaagtacagtggaag gtggataacgccctccaatcgggtaactcc caggagagtgtcacagagcaggacagca aggacagcacctacagcctcagcagcac cctgacgctgagcaaagcagactacgaga aacacaaagtctacgcctgcgaagtcacc catcagggcctgagctcgcccgtcacaaa gagcttcaacaggggagagtgt	
PSMB126 (FAB PSMB80)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFDDYAISWVRQAPGQGLEWMG RIDPIEGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRY YYDGVYWYSDYFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	91
PSMB124 (FAB PSMB56)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG WISPYNGNANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDSD RSYNLDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV	92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISGWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	93

	LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK			
PSMB123 (FAB PSMB55)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARGLPI WYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	94	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVASDLAWYQQKPGQAP RLLIYFASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QSITWPFTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	95
PSMB122 (FAB PSMB51)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GWIIPYNGNANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARV NSAALVWERLDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSIDRWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSPRYPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	83
PSMB121 (FAB PSMB49)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARA SRVWHASYGYLDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS	97	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSKWLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRFTAPWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	98

	RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK			
PSMB120 (FAB PSMB25)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG WAYDRGLDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	99	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	100
PSMB119 (FAB PSMB18)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARA YHYSKGLDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	101	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	100
PSMB87 (FAB PSMB58)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARDYEW ELFDSRLDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	91

Las interacciones de mAb PSMA parentales PSMB123 (Fab PSMB55), PSMB127 (Fab PSMB83) y PSMB130 (Fab PSMB86) con ECD del PSMA humano, de chimpancé y de cynomolgus se midieron mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) usando un sistema ProteOn XPR36 (BioRad) como se describió anteriormente para el ECD del PSMA de chimpancé recombinante. El resumen de las afinidades de unión para cada uno de estos mAb a ECD del PSMA humano, de chimpancé y de cynomolgus se muestra en la Tabla 18. Estos mAb se unen a objetivos con afinidades similares a las de los anticuerpos biespecíficos.

Tabla 18. Unión de anticuerpos monoclonales a ECD del PSMA humano, de chimpancé y de cynomolgus recombinante, mediante Proteon

	Humano KD (nM)	Chimpancé KD (nM)	Cyno KD (nM)
PSMB123 (FAB PSMB55)	9,03 ± 1,20	14,3 ± 3,33	66,7 ± 8,60
PSMB127 (FAB PSMB83)	12,0 ± 2,05	12,8 ± 1,83	6,68 ± 0,45
PSMB130 (FAB PSMB86)	29,6 ± 2,43	31,7 ± 7,48	>300

Ejemplo 3: Adaptación de armazón humano del anticuerpo anti-CD3 SP34

El anticuerpo murino anti-CD3 SP34 se humanizó mediante el método de adaptación de armazón humano (Fransson, et al, JMB, 2010 398(2):214-31). Las secuencias de VH y VL de SP34 se muestran más adelante y en la Figura 4, con los residuos 1 - 215 de la cadena ligera y los residuos 1-230 de la cadena pesada derivados directamente del mapa de densidad electrónica, y con los residuos 231 - 455 derivados de IGHG3 RATÓN (IgG3 de ratón, isoforma 2).

VH de SP34 (sec. con núm. de ident.:128)

EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW
VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMY
YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSA

VL de SP34 (sec. con núm. de ident.:129):

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTG
LIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLW
VFGGGTKLTVL

Se combinaron cuatro cadenas pesadas diferentes con tres cadenas ligeras diferentes para producir 12 variantes humanizadas.

Humanización de SP34 y maduración en afinidad

Selección de líneas germinales humanas

Se seleccionó para la prueba, una matriz de las secuencias de cuatro regiones variables de cadena pesada humanas y tres regiones variables de cadena ligera. La selección de líneas germinales humanas se basó únicamente en la similitud de secuencia general con SP34 en la región armazón (FR, por sus siglas en inglés). En esta selección no se consideraron ni las secuencias de CDR, ni su longitud o estructuras canónicas.

Las emparejamientos más cercanos para la cadena pesada son con las LG humanas IGHV3-72 y IGHV3-73. Otra LG, IGHV3-23, se seleccionó debido a su alta frecuencia de ocurrencia en el repertorio de células B humanas.

Los emparejamientos más cercanos para la cadena ligera son con las LG lambda humanas IGLV7-43 (también conocida como 7a), IGLV7-46 (también conocida como 7b) y IGLV1-51 (también conocida como 1b). IGLV7-46 es prácticamente idéntica a IGLV7-43, pero tiene la ventaja de Ala en la posición 2, es decir, como en SP34.

Las J-regiones seleccionadas son las siguientes: IGHJ1 para la cadena pesada; IGLJ3 para la cadena ligera lambda

Retromutaciones

Para conservar la conformación de CDR-H3, deben retenerse los residuos en varias posiciones de armazón en VL, más notablemente en las posiciones Val38, Gly48 y Gly51. Estas 'retromutaciones' se añadieron al plan de humanización.

La Asn en la posición 57 de la cadena pesada quedó truncada para Gly en el plan de maduración para permitir la flexibilidad necesaria y mejorar potencialmente la estabilidad (al reducir la tensión estructural local no relacionada con glicina) sin afectar la unión.

Hubo otras varias contemplaciones hechas en el diseño de humanización. En primer lugar, las LG humanas IGLV7-46 y IGLV7-43 introducen un Trp en la posición 59 con un potencial de oxidación no deseado. Otras LG tienen Gly en esta posición, que corresponde a la secuencia de ratón. Por lo tanto, Gly59 se conservó tanto en la variante IGLV7-46 como en la IGLV7-43. Finalmente, Ala en la posición 49 de VH

puede ser esencial. Además, el residuo en la posición 99 (Val en SP34) puede afectar la unión al antígeno. Para probar estas posiciones, se introdujeron retromutaciones en algunas variantes (Figura 5)

Matriz de HFA

La matriz de HFA (Tabla 8) está compuesta de cuatro variantes de VH y tres variantes de VL (Figura 5). Para el propósito de HFA, se usa la definición de CDR de mAb (K.R. Abhinandan y A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839).

Las variantes para VH:

CD3H141 (sec. con núm. de ident.:104): IGHV3-72*01 con CDR de ratón + Gly49Ala

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSW FAYWGQGTLVTVSS

CD3H142 (sec. con núm. de ident.:102): IGHV3-23*01 con CDR de ratón + Ser49Ala

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS

CD3H143 (sec. con núm. de ident.:115): IGHV3 23*01 con CDR de ratón + Ser49Ala, Ala99Val

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS

CD3H144 (sec. con núm. de ident.:116): IGHV3-73*01 con CDR de ratón + Asn57Gly

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKY NGYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSW FAYWGQGTLVTVSS

Las variantes para VL:

CD3L63 (sec. con núm. de ident.:103): IGLV7-46*01 con CDR de ratón + F38V,A48G,Y51G,W59G

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L64 (sec. con núm. de ident.:117): IGLV1-51*01 con CDR de ratón + Y38V, L48G, Y51G

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCRSSTGAVTTSNYANWVQQLPGTAPKGLIGGTNKRA PGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L66 (sec. con núm. de ident.:105): IGLV7-43*01 con CDR de ratón + F38V,A48G,Y51G,W59G

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Tabla 8. Matriz de cadenas pesada y ligera de CD3

(Todas se prepararon con Fc de IgG1-AA que contenía L234A, L235A y F405L)

	CD3L63 (LV7-46/W59G) Sec. con núm. de ident.:103	CD3L64 (LV1-51) Sec. con núm. de ident.:117	CD3L66 (LV7-43/W59G) Sec. con núm. de ident.: 105
CD3H141 (HV3-72 + G49A)	CD3B143	CD3B144	CD3B146

Sec. con núm. de ident.: 104			
CD3H142 (HV3-23 + S49A) Sec. con núm. de ident.:102	CD3B147	CD3B148	CD3B150
CD3H143 (HV3-23 + S49A,A99V) Sec. con núm. de ident.: 115	CD3B151	CD3B152	CD3B154
CD3H144 (VH3-73 con G49) Sec. con núm. de ident.:116	CD3B155	CD3B156	CD3B158

Las secuencias de aminoácidos se tradujeron nuevamente al ADN, y el ADNc se preparó mediante técnicas de síntesis de genes (patente de los EE. UU. núm. 6.670.127; patente de los EE. UU. núm. 6.521.427). Se subclonaron regiones variables de cadena pesada (HC) en Fc de IgG1-AA humana que contenía las mutaciones L234A, L235A y F405L mediante un vector de expresión interno con el promotor de CMV mediante técnicas estándar de biología molecular. Se subclonaron regiones variables de cadena ligera (LC) en regiones constantes Lambda (λ) humanas mediante un vector de expresión interno con el promotor de CMV mediante técnicas estándar de biología molecular. Los plásmidos resultantes se transfectaron en células Expi293F (Invitrogen) y se expresaron mAb. La purificación se realizó mediante métodos estándar usando una columna de proteína A (columna hiTrap MAbSelect SuRe). Después de la elución, las reservas se dializaron en D-PBS, pH 7,2 Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos anti-CD3

mAb	HC	Secuencia de aminoácidos de VH	Sec. con núm. de ident.:	LC	Secuencia de aminoácidos de VL	Sec. con núm. de ident.:

CD3B143	CD3H141	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYC ARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	104	CD3L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	103
CD3B144	CD3H141	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYC ARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	104	CD3L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGAV TTSNYANWVQQLPG TAPKGLIGGTNKRAP GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEADY YCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	117
CD3B146	CD3H141	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYC ARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	104	CD3L66	QTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVT TSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAE YYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	105
CD3B147	CD3H142	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC AKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	102	CD3L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	103
CD3B148	CD3H142	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC AKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	102	CD3L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGAV TTSNYANWVQQLPG TAPKGLIGGTNKRAP GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEADY YCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	117
CD3B150	CD3H142	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC AKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	102	CD3L66	QTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVT TSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAE YYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	105
CD3B151	CD3H143	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	115	CD3L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	103

CD3B152	CD3H143	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	115	CD3L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGAV TTSNYANWVQQLPG TAPKGLIGGTNKRAP GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEADY YCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	117
CD3B154	CD3H143	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	115	CD3L66	QTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVT TSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAE YYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	105
CD3B155	CD3H144	EVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNGYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCT RHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	116	CD3L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	103
CD3B156	CD3H144	EVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNGYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCT RHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	116	CD3L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGAV TTSNYANWVQQLPG TAPKGLIGGTNKRAP GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEADY YCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	117
CD3B158	CD3H144	EVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNGYATYYAAS VKGRFTISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDTAVYYCT RHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS	116	CD3L66	QTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVT TSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAE YYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	105

Ejemplo 4: Unión de células endógenas de los aciertos anti-CD3 humanizados a células T primarias

El panel resultante de los anticuerpos anti-CD3 se probó para determinar la unión contra la superficie celular CD3ε en células T humanas primarias. Para ello, se visualizó la unión de los anticuerpos a partir de los sobrenadantes de expresión usando un anticuerpo secundario antihumano policlonal y se analizó por citometría de

flujo. Brevemente, la unión de anticuerpos anti-CD3 a la superficie celular CD3ε se evaluó por citometría de flujo usando linfocitos T humanos primarios purificados mediante selección negativa (Biological Specialty, Colmar, EE. UU.). Los sobrenadantes de expresión o los anticuerpos purificados se normalizaron a 10 µg/ml en el medio o regulador de FACS (BD Biosciences), respectivamente. $2x10^5$ células se dividieron en alícuotas en pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos (CoStar) para la marcación. Los anticuerpos en el sobrenadante de expresión se añadieron a las células y se incubaron durante 45 min a 4 °C. Después de la centrifugación a 1300 rpm durante 3 min y de la eliminación de sobrenadante, se incubó 50 µl de anticuerpo secundario anti-IgG humana (H+L) de Alexa Fluor (Life technologies Inc.) con las células a una concentración final de 10 µg/ml durante 30 min a 4 °C fuera de la luz directa. Después del lavado y la resuspensión en 30 µl de regulador de FACS (BD Biosciences). La recolección de la muestra se realizó en un sistema de HTFC Intellicyt usando el software ForeCyt. Las células únicas viables se seleccionaron antes del análisis de unión usando los tintes verde o rojo fijable live/dead (Life Technologies Inc.) y los parámetros de área de dispersión directa/lateral y de altura, respectivamente. Los gráficos se generaron en el software GraphPad Prism versión 5 mediante valores de intensidad de fluorescencia media.

Aunque se realizó unas serie de titulación, se presenta una concentración intermedia en la Figura 6, para claridad. Como controles se usaron dos anticuerpos derivados de fagos internos con la misma región Fc que los anticuerpos terapéuticos: G11 (HC de la sec. con núm. de ident.:118, LC de la sec. con núm. de ident:119), un anticuerpo agonista sin reacción cruzada de cynomolgus, se usó como un control

positivo y CD3B94 (HC de sec. con núm. de ident.:120, LC de sec. con núm. de ident.:121), un anticuerpo no aglutinante/no agonista, se usó para evaluar la unión no específica. El anticuerpo SP34 comercial no se usó como un comparador en este ensayo ya que es un anticuerpo de ratón y el uso de un reactivo de detección secundario diferente podría haber impedido la comparación directa con las variantes probadas.

Los datos demuestran una serie de potencial de unión dentro del panel de aciertos anti-CD3 humanizados, con dos anticuerpos (CD3B144, CD3B152) que muestran una pérdida completa de unión a las células T humanas. Los anticuerpos restantes mostraron un rango de potencial de unión que podría dividirse ampliamente en aglutinantes fuertes y débiles mediante la unión de G11 como un umbral arbitrario. Mediante estos parámetros, se identificaron siete aglutinantes fuertes y siete aglutinantes débiles del panel de variantes (Figura 6).

Después, se probó el análisis de unión de los aciertos anti-CD3 a células T $CD4^+$ de cynomolgus primarias para evaluar la retención de reactividad cruzada. Células T $CD4^+$ purificadas a partir de la sangre periférica de monos cynomolgus (Zen Bio, Triangle Research Park, EE. UU). Los protocolos de ensayo fueron similares a los descritos anteriormente. Dado que G11 no tiene reacción cruzada con CD3ε de cynomolgus, CD3B124, se usó un anticuerpo quimérico interno derivado de SP34 que tiene la VH y VL de SP34 con armazón murino y un Fc de IgG1 humana como un control positivo en este ensayo **(**Figura 7). Curiosamente, varias variantes mostraron un potencial de unión disminuido en comparación con el observado con las células humanas. Esto incluyó los aglutinantes fuertes CD3B150, CD3B151 y CD3B154, en los que se redujo la unión, y varios aglutinantes débiles donde la unión ya no pudo

detectarse en comparación con los antecedentes. Esta pérdida de unión no se relacionó con una cadena específica de inmunoglobulina, lo que sugiere que la combinación de cadenas pesada y ligera jugó un papel en la pérdida de reactividad cruzada. Juntos, estos ensayos permitieron la identificación de variantes que conservaron la reactividad cruzada de especies entre CD3ε humana y de cynomolgus.

Ejemplo 5: Análisis funcional de los aciertos anti-CD3 humanizados en células T primarias

El análisis de unión demostró que el panel de aciertos anti-CD3 humanizados mostró un rango de potencial de unión a células T humanas y de cynomolgus. Para investigar la capacidad de cada variante para inducir la activación por medio de la reticulación de CD3ε, se cultivaron células T primarias durante la noche en presencia de anticuerpo conjugado con microesfera. Al día siguiente, las células se cosecharon y se marcaron con un anticuerpo anti-CD69 para medir la activación (Figura 8). Los anticuerpos anti-CD3 humanizados se unieron a las microesferas magnéticas revestidas con proteína A (SpheroTech, Lake forest, EE. UU.) mediante la incubación durante la noche con anticuerpos a 10 µg/ml. Al día siguiente, $2x10^5$ células T humanas primarias se sembraron en placas de cultivo celular con fondo redondo por triplicado y se añadieron $2x10^5$ microesferas revestidas. Después del cultivo durante la noche a 37 °C, las células se cosecharon y se marcaron con el anticuerpo anti-CD69 de Alexa Fluor® 488 (clon FN50; Biolegend) para evaluar la regulación positiva de este marcador de activación. La recolección y el análisis de muestras se realizaron como se describió anteriormente para la unión. Se analizaron varios controles negativos, que incluían las células T solas, las

células T con microesferas no revestidas y las células T con microesferas revestidas de control de isotipo (CD3B94). Todos estos mostraron valores de intensidad de fluorescencia media similares comparables a las células T no teñidas, lo que indica que los antecedentes fueron bajos en este ensayo. Se analizaron varios controles positivos para la comparación, incluyendo el anticuerpo OKT3 (US5929212) y SP34-2 comercialmente disponible.

Después, los aciertos anti-CD3 humanizados se probaron para determinar su capacidad para activar células T CD4+ de cynomolgus primarias (Zen Bio, Triangle Research Park, EE. UU.) en el mismo ensayo (Figura 9). Se ha descrito que el anticuerpo anti-CD69 FN50 es de reacción cruzada con la proteína no humana y, por lo tanto, podría usarse para probar la activación de estas células.

Los datos de activación humana y de cynomolgus se correlacionaron con los datos de unión, en el sentido de que el panel de aciertos mostró un rango de potenciales de activación. Varios aglutinantes fuertes mostraron la capacidad para activar las células T humanas a un grado equivalente o mayor cuando se compararon con SP34-2 comercialmente disponible. Varias variantes mostraron un potencial de activación que fue menor en comparación con SP34-2, mientras que algunos aglutinantes no mostraron evidencia de estimulación de CD69. La incapacidad para activar solo se vio en las variantes que mostraron una unión débil o ninguna, y todos los aglutinantes fuertes mostraron algún nivel de activación, lo que sugiere una correlación entre los potenciales de unión y activación tanto para humanos (Figura 10A) como para cynomolgus (Figura 10B).

Se seleccionaron dos anticuerpos anti-CD3, CD3B146 y CD3B147, con afinidad alta y media, respectivamente, para la preparación de anticuerpos biespecíficos con los anticuerpos específicos PSMA. Estos dos anticuerpos anti-CD3 se prepararon en el

formato GenMab de IgG4 PAA (Labrijn et al, 2013), donde el padre objetivo (PSMA) contiene la mutación de GenMab 409R (aminoácido nativo para IgG4), mientras que el padre destructor (CD3) contiene la mutación de GenMab F405L y R409K. El anticuerpo monoespecífico anti-CD3 se expresó como IgG4, que tiene sustituciones Fc S228P, F234A, L235A, F405L y R409K (brazo CD3) (numeración de acuerdo con el índice de la UE) en sus regiones Fc. Las regiones variables de cadena pesada (HC) se subclonaron en Fc de IgG4-PAA humana que contenía las mutaciones S228P, F234A, L235A, F405L y R409K mediante un vector de expresión interno con el promotor de CMV mediante técnicas estándar de biología molecular. Se subclonaron regiones variables de cadena ligera (LC) en regiones constantes Lambda (λ) humanas mediante un vector de expresión interno con el promotor de CMV mediante técnicas estándar de biología molecular. Los plásmidos resultantes se transfectaron en células Expi293F (Invitrogen) y se expresaron mAb. Los anticuerpos anti-CD3 se purificaron mediante métodos de purificación estándar: una columna de proteína A con un regulador de elución de NaAc 100 mM con pH 3,5 y un regulador de neutralización de Tris 2M con pH 7,5 y NaCl 150 mM. Los mAb se desalaron usando una columna PD10 (Sephadex G25M) y las mezclas se dializaron en D-PBS con un pH 7,2.

Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-CD3 CD3B217 que comprendía las regiones VH y VL que tenían la VH de la sec. con núm. de ident.: 102 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 103 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A, L235A, F405L y R409K. CD3B217 comprende una cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 108 y una cadena ligera de la sec. con núm. de ident.:109. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-CD3 CD3B219 que comprendía las

regiones VH y VL que tenían la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A, L235A, F405L y R409K. CD3B219 comprende una cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 110 y una cadena ligera de la sec. con núm. de ident.:111.

Ejemplo 6. Preparación de anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3

La formación de los anticuerpos biespecíficos CD33×CD3 requiere dos mAb parentales, uno específico para el brazo objetivo (p. ej., PSMA) y otro específico para el brazo efector (p. ej., CD3). Se recombinaron mAb del PSMA con una afinidad media CD3B217 (VH de la sec. con núm. de ident.:102, VL de la sec. con núm. de ident.:103) y brazos de CD3 de alta afinidad CD3B219 (VH de la sec. con núm. de ident.:104, VL de la sec. con núm. de ident.:105). Estos mAb parentales están en el formato GenMab (Labrijn et al, 2013) donde el parental objetivo (PSMA) contiene la mutación 409R GenMab (aminoácido nativo para IgG4), mientras que el parental destructor (CD3) contiene la mutación F405L GenMab y la mutación R409K. El anticuerpo monoespecífico anti-CD3 se expresó como IgG4, que tiene sustituciones Fc S228P, F234A, L235A, F405L y R409K (brazo CD3) (numeración de acuerdo con el índice de la UE) en sus regiones Fc. Los anticuerpos monoespecíficos se expresaron en líneas celulares HEK bajo promotores CMV.

Los anticuerpos parentales PSMA y CD3 se purificaron usando una columna de proteína A con un regulador de elución de NaAc 100 mM con pH 3,5 y un regulador de neutralización de Tris 2 M de con pH 7,5 y NaCl 150 mM. Los mAb se desalaron usando columna PD10 (Sephadex G25M) y se dializaron en D-PBS, regulador con pH 7,2.

Después de la purificación, los anticuerpos PSMA parentales se mezclaron con el anticuerpo CD3 parental deseado en condiciones reductoras en cisteamina-HCl 75 mM y se incubaron a 31 °C durante 4 horas. Las reacciones de recombinación se basaron en relaciones molares, donde una cantidad fija del PSMA (p. ej., 10 mg, o ~67,8 nanomoles) se combinó con el anticuerpo CD3 (p. ej., ~71,8 nanomoles), donde el anticuerpo CD3 se añadió en un exceso de 6 % del anticuerpo PSMA. Las concentraciones de los soluciones madre de anticuerpo PSMA variaron de 0,8 a 6 mg/ml, y los volúmenes de las reacciones de recombinación variaron para cada emparejamiento. Las recombinaciones se dializaron posteriormente contra PBS para eliminar el reductor. Las reacciones de anticuerpos biespecíficos se realizaron con un exceso del anticuerpo CD3 (relación) para minimizar la cantidad de anticuerpo parental CD3 sin reaccionar que queda después de la recombinación. Después de la reducción parcial de los mAb parentales, el reductor se eliminó a través de diálisis durante la noche en PBS.

Los anticuerpos biespecíficos finales producidos, junto con los mAb parentales (es decir, PSMA, CD3 o Nulo) usados en las reacciones de recombinación se enumeran en la Tabla 12, con secuencias enumeradas en las Tablas 11 y 12.

Los impactos de PSMA seleccionados se emparejaron también con un brazo que no mata (Null) para crear controles negativos con fines de prueba. Para anticuerpos biespecíficos de control, se generó un anticuerpo de VSR, B2M1, en el formato IgG4 PAA (VH, de sec. con núm. de ident.: 106, VL de sec. con núm. de ident.:107), se purificó y se combinó con cualquiera de los brazos de CD3 CD3B219 -F405L, R409K para generar CD3B288 (CD3 X nulo) o brazos del PSMA, PSMB162, PSMB126, PSMB130 para generar PS3B37, PS3B39 y PS3B40, respectivamente (PSMA X nulo).

Tabla 10. Se generaron los anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3

Anticuerpo biespecífico	BRAZO 1	Sec. con núm. de ident.:		BRAZO 2	Sec. con núm. de ident.: (VH; IgG4PAA de VL F405L, R409K	
		HC	LC		HC	LC
PS3B2	PSMB25 (FAB PSMB120)	99	100	CD3B217	108	109
PS3B3	PSMB49 (FAB PSMB121)	97	98	CD3B217	108	109
PS3B4	PSMB51 (FAB PSMB122)	96	83	CD3B217	108	109
PS3B5	PSMB55 (FAB PSMB123)	94	95	CD3B217	108	109
PS3B7	PSMB58 (FAB PSMB87)	125	91	CD3B217	108	109
PS3B8	PSMB80 (FAB PSMB126)	90	91	CD3B217	108	109
PS3B9	PSMB83 (FAB PSMB127)	88	89	CD3B217	108	109
PS3B10	PSMB84 (FAB PSMB128)	86	87	CD3B217	108	109
PS3B11	PSMB109 (FAB PSMB129)	82	83	CD3B217	108	109
PS3B12	PSMB86 (FAB PSMB130)	84	85	CD3B217	108	109
PS3B19	PSMB18 (FAB PSMB119)	101	100	CD3B219	110	111
PS3B20	PSMB25 (FAB PSMB120)	99	100	CD3B219	110	111
PS3B21	PSMB49 (FAB PSMB121)	97	98	CD3B219	110	111
PS3B22	PSMB51 (FAB PSMB122)	96	83	CD3B219	110	111
PS3B23	PSMB55 (FAB PSMB123)	94	95	CD3B219	110	111
PS3B24	PSMB56 (FAB PSMB124)	92	93	CD3B219	110	111
PS3B25	PSMB58 (FAB PSMB87)	125	91	CD3B219	110	111
PS3B26	PSMB80 (FAB PSMB126)	90	91	CD3B219	110	111
PS3B27	PSMB83 (FAB PSMB127)	88	89	CD3B219	110	111
PS3B28	PSMB84 (FAB PSMB128)	86	87	CD3B219	110	111

PS3B29	PSMB109 (FAB PSMB129)	82	83	CD3B219	110	111
PS3B30	PSMB86 (FAB PSMB130)	84	85	CD3B219	110	111

Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-CD3 CD3B217 que comprendía las regiones VH y VL que tenían la VH de la sec. con núm. de ident.: 102 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 103 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A, L235A, F405L y R409K. CD3B217 comprende una cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 108 y una cadena ligera de la sec. con núm. de ident.:109. Se generó un anticuerpo monoespecífico anti-CD3 CD3B219 que comprendía las regiones VH y VL que tenían la VH de la sec. con núm. de ident.: 104 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 105 y una región constante de IgG4 con las sustituciones S228P, F234A, L235A, F405L y R409K. CD3B219 comprende una cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 110 y una cadena ligera de la sec. con núm. de ident.:111. Como un control, se generó un anticuerpo monoespecífico anti-VSR, derivado de B21M, que comprendía las regiones VH y VL que tenían la VH de la sec. con núm. de ident.:106 y la VL de la sec. con núm. de ident.:107 y una región constante de IgG4 con S228P, F234A, L235A o F234A, L235A, R409K, F405L para asociarse como brazo nulo con cualquiera de los brazos de CD3 o del PSMA de un anticuerpo biespecífico.

El anticuerpo biespecífico PS3B2 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB120. El anticuerpo biespecífico PS3B3 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB121 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B4 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB122 -R409. El

anticuerpo biespecífico PS3B5 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB123 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B7 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB58 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B8 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB126 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B9 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB127 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B10 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB128 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B11 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB129 -R409. El anticuerpo biespecífico PS3B12 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B217 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB130 -R409.

El anticuerpo biespecífico PS3B19 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB119-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B20 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB120-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B21 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB121-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B22 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB122-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B23 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb

CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB123-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B24 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB124-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B25 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB165-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B26 comprende el brazo de unión al CD3 del mAb CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB126-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B27 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB127-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B28 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB128-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B29 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB129-R409. El anticuerpo biespecífico PS3B30 comprende el brazo de unión al CD3 de CD3B219 -F405L, R409K y el brazo de unión a PSMA del mAb PSMB130-R409.

Tabla 11. Secuencias de los anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3

Ident. de Ab biespec.	Secuencias de aminoácidos de cadena pesada Brazo de PSMA Brazo de CD3	Sec. con núm. de ident.	Secuencias de aminoácidos de cadena ligera Brazo de PSMA Brazo de CD3	Sec. con núm. de ident.
PS3B2 (PSMB120 x CD3B217)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGWAYDRGLDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS	99	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	100

	QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK			
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B3 (PSMB121 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RASRVWHASYGYLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	97	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSKWLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRFTAPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	98
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109

	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK			
PS3B4 (PSMB122 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGWIIPYNGNANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVNSAALVWERLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSIDRWLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	83
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B5 (PSMB123 x CD3B217)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGLPIWYLDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK	94	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVASDLAWYQQKP GQAPRLLIYFASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQSITWPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	95

	SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B7 (PSMB87 x CD3B217)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSYTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARDYEWELFDSRLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	91

PS3B8 (PSMB126 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFDDYAISWVRQAPGQGLEW MGRIDPIEGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARDRYYYDGVYWYSDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	91
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B9 (PSMB127 x CD3B217)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	88	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	89
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG	109

	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK		TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	
PS3B10 (PSMB128 x CD3B217)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDSDWMSWVRQAPGKGLE WVSAISGNGGSTEYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDPYYYYDGDSYYGMDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK	86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	87
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B11 (PSMB129 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGWISPYNGNANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARVNSAALVWERLDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES	82	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSIDRWLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE	83

	TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK		QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B12 (PSMB130 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFKSYDISWVRQAPGQGLEW MGGIIPIEGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RDYPAGYGFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK	84	EIVLTQSPGTLSLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	85
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT	108	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS	109

	KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK		YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	
PS3B29 (PSMB129 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGWISPYNGNANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARVNSAALVWERLDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	82	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSIDRWLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC….	83
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B30 (PSMB130 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFKSYDISWVRQAPGQGLEW MGGIIPIEGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RDYPAGYGFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP	84	EIVLTQSPGTLSLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	85

	REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK			
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B28 (PSMB128 x CD3B219)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDSDWMSWVRQAPGKGLE WVSAISGNGGSTEYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDPYYYYDGDSYYGMDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK	86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	87
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111

	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK			
PS3B27 (PSMB127 x CD3B219)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	88	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	89
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B26 (PSMB126 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFDDYAISWVRQAPGQGLEW MGRIDPIEGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARDRYYYDGVYWYSDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	91

	FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK			
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B25 (PSMB87 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSYTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARDYEWELFDSRLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	91
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111

PS3B24 (PSMB124 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGWISPYNGNANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARDSDRSYNLDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISGWLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	93
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B23 (PSMB123 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGLPIWYLDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	94	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVASDLAWYQQKP GQAPRLLIYFASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQSITWPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	95
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG	111

	SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK		TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	
PS3B22 (PSMB123 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGWIIPYNGNANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVNSAALVWERLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSIDRWLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	83
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B21 (PSMB121X CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RASRVWHASYGYLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST	97	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSKWLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRFTAPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE	98

	AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK		QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111
PS3B20 (PSMB120 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGWAYDRGLDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK	99	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	100
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS	111

	KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK		YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	
PS3B19 (PSMB119 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARAYHYSKGLDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK	101	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	100
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	111

Tabla 12. Secuencias de VH/VL de anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3

Anticuerpo biespecífico	BRAZO 1	Sec. con núm. de ident.:		BRAZO 2	Sec. con núm. de ident.: (VH; IgG4PAA de VL F405L, R409K	
		Vh	Vl		Vh	Vl

PS3B2	PSMB25 (FAB PSMB120)	77	78	CD3B217	102	103
PS3B3	PSMB49 (FAB PSMB121)	75	76	CD3B217	102	103
PS3B4	PSMB51 (FAB PSMB122)	74	61	CD3B217	102	103
PS3B5	PSMB55 (FAB PSMB123)	75	76	CD3B217	102	103
PS3B7	PSMB58 (FAB PSMB87)	160	64	CD3B217	102	103
PS3B8	PSMB80 (FAB PSMB126)	68	69	CD3B217	102	103
PS3B9	PSMB83 (FAB PSMB127)	66	67	CD3B217	102	103
PS3B10	PSMB84 (FAB PSMB128)	64	65	CD3B217	102	103
PS3B11	PSMB109 (FAB PSMB129)	60	61	CD3B217	102	103
PS3B12	PSMB86 (FAB PSMB130)	62	63	CD3B217	102	103
PS3B19	PSMB18 (FAB PSMB119)	79	78	CD3B219	104	105
PS3B20	PSMB25 (FAB PSMB120)	77	178	CD3B219	104	105
PS3B21	PSMB49 (FAB PSMB121)	75	76	CD3B219	104	105
PS3B22	PSMB51 (FAB PSMB122)	74	61	CD3B219	104	105
PS3B23	PSMB55 (FAB PSMB123)	75	76	CD3B219	104	105
PS3B24	PSMB56 (FAB PSMB124)	70	71	CD3B219	104	105
PS3B25	PSMB58 (FAB PSMB87)	160	65	CD3B219	104	105
PS3B26	PSMB80 (FAB PSMB126)	68	69	CD3B219	104	105
PS3B27	PSMB83 (FAB PSMB127)	66	67	CD3B219	104	105
PS3B28	PSMB84 (FAB PSMB128)	64	65	CD3B219	104	105
PS3B29	PSMB109 (FAB PSMB129)	60	61	CD3B219	104	105
PS3B30	PSMB86 (FAB PSMB130)	62	63	CD3B219	104	105

Ejemplo 7. Caracterización mediante unión celular

Se probaron los anticuerpos biespecíficos contra PSMA X CD3 para determinar la unión a líneas celulares LNCAP positivas para PSMA, HEK del PSMA humano, HEK del PSMA de chimpancé y HEK del PSMA de cynomolgus. Para evaluar las capacidades de unión de los anticuerpos biespecíficos contra PSMA, se usó el ensayo de unión a células (descrito anteriormente). Brevemente, las células tumorales que expresan el PSMA se unen mediante anticuerpos biespecíficos a concentraciones conocidas y el anticuerpo unido se detecta mediante un reactivo de detección conjugado con PE de cadena ligera anti-kappa humano (Invitrogen). La intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) es la medida del anticuerpo biespecífico unido. La MFI se convierte en una EC_{50} relativa. La EC_{50} es una curva de respuesta a la dosis comúnmente usada, donde la concentración máxima eficaz o el punto de EC_{50} se define como el punto de inflexión de la curva. La EC_{50} se determinó mediante la medición de concentraciones biespecíficas y conocidas unidas a células. Las concentraciones altas resultaron en la unión máxima al antígeno objetivo, es decir, la saturación de unión completa. Después, las curvas de respuesta a la dosis se diluyeron hasta la de los antecedentes, o sin unión biespecífica. El punto de inflexión de esta curva refleja el punto de EC_{50}. La EC_{50} calculada se determina al tomar la cantidad en ug/ml del anticuerpo biespecífico en el punto de EC_{50} y convertirla en un valor de molaridad basado en el peso molecular del anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos se normalizaron para la concentración de proteínas y después se incubaron con el mismo número de células que expresaban PSMA humano o cyno. El MFI en cada concentración se recolectó por citometría de flujo y se representó como función de la concentración. Los datos se

transformaron mediante log10 y después se trazaron. La regresión no lineal de las curvas de unión se realizó para determinar la EC_{50}. Estos valores relativos se usaron para clasificar la unión del PSMA a las células objetivo. Las Tabla 12 contiene los valores de unión de EC_{50} relativos para los estudios de unión de células enteras usando LNCaP, líneas celulares que expresan el PSMA de cynomolgus y de chimpancé.

La Figura 11 muestra la unión de LNCAP de todos los anticuerpos biespecíficos preparados. Los datos de unión sugieren que se observan 3 poblaciones de unión: 1) unión fuerte, 2) unión media y 3) unión débil/sin unión. Los anticuerpos biespecíficos de brazo nulo PSMA X mantienen la unión a las células LNCAP (Figura 11E), pero no se observa ninguna unión para los anticuerpos biespecíficos de brazo nulo X CD3 (Figura 11F). Los anticuerpos biespecíficos de brazo de CD3 de afinidad media y afinidad alta con el mismo brazo de PSMA se unen de manera similar. Para los ensayos restantes, solo se usaron anticuerpos biespecíficos que eran aglutinantes de LNCaP positivos para evaluar la actividad de unión a HEK del PSMA de chimpancé (Figura 12), HEK del PSMA de cynomolgus (Figura 13), HEK del PSMA humano (Figura 14) o HEK293 parental (no se muestran los datos). Para cada línea celular, se probaron los aglutinantes de CD3 de afinidad alta o de afinidad media. Los datos de unión de HEK del PSMA humano sugieren que puede haber diferencias sutiles entre LNCaP y esta línea celular; sin embargo, el mismo orden general de unión es evidente. PS3B19, derivado de la inmunoadsorción de LNCaP, parece unirse muy fuertemente a las células HEK del PSMA humano. Los anticuerpos biespecíficos muestran una amplia variedad de perfiles de unión en HEK del PSMA de chimpancé. Curiosamente, los aciertos que se inmunoadsorbieron en la línea celular HEK del PSMA de chimpancé

tienen un perfil de unión más fuerte, mientras que aquellos que se inmunoadsorbieron en LNCaP muestran una unión más débil. No se observó unión a las células HEK parentales en este experimento (no se muestran los datos).

Después de la recombinación en anticuerpos biespecíficos, diversos clones superan sistemáticamente a otros y se unen a especies cruzadas. Estos anticuerpos biespecíficos son PS3B21, PS3B22, PS3B26, PS3B27, PS3B28 y PS3B30 que corresponden a los mAb PSMB121, PSMB122, PSMB126, PSMB127, PSMB128 y PSMB130. Las EC_{50} de unión basada en células y las EC_{50} calculadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: EC_{50} de unión basada en células.

bsAb	LNCaP		Cyno		Chimpancé	
	EC_{50} (ng/ml)	**EC_{50} calculada (nM)**	**EC_{50} (ng/ml)**	**EC_{50} calculada (nM)**	**EC_{50} (ng/ml)**	**EC_{50} calculada (nM)**
PS3B19	demasiado débil	N/A	1,757	12,4	5,10	35,93
PS3B20	122,7	864,1	2,003	14,1	3,33	23,44
PS3B21	0,7368	5,2	0,8604	6,1	1,25	8,81
PS3B22	2,603	18,3	1,137	8	3,02	21,23
PS3B23	demasiado débil	N/A	3,744	26,4	0,88	6,18
PS3B24	demasiado débil	N/A	18,22	128,3	1,10	7,75
PS3B26	0,07147	0,5	0,3706	2,6	0,05	0,34
PS3B27	2,07	14,6	1,403	9,9	3,24	22,83
PS3B28	1,157	8,1	0,6879	4,8	1,01	7,08
PS3B29	7,766	54,7	2,539	17,9	4,11	28,93
PS3B30	1,203	8,5	5,37	37,8	3,29	23,19

Todos los anticuerpos biespecíficos mantienen su capacidad de unión a líneas celulares positivas para PSMA. Varios de los anticuerpos se unieron bien a células

que expresan PSMA de chimpancé y de cynomolgus, pero solo débilmente a las células LNCaP. Las EC_{50} de unión a LNCAP variaron de 0,5 nM a 864 nM, mientras que las EC_{50} de unión a HEK que expresan el PSMA de cynomolgus variaron de 0,9 a 128 nM y las de unión a HEK del PSMA de chimpancé variaron de 36 - 0,3 nM (Tabla 12). Con base en las EC_{50} de unión celular, varios de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMA cumplen los criterios de unión de 20 nM o más estrecha para el PSMA humano y unión de 50 nM o más estrecha para el PSMA de cynomolgus.

Ejemplo 8. Caracterización de afinidad mediante Proteon y Biacore

Para evaluar aún más los anticuerpos, se midieron las velocidades de asociación y disociación de ECD de PSMA de chimpancé para los aciertos que se llevaron a cabo a partir de ensayos de unión celular. Las interacciones de mAb biespecíficos contra PSMAxCD3 con el objetivo (PSMA, de chimpancé recombinante) se estudiaron mediante la resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando un sistema ProteOn XPR36 (BioRad). Se preparó una superficie biosensora mediante el acoplamiento de Fc anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratory, cat. núm. 109-005-098) a la superficie de capa de polímero de alginato modificado de un chip GLC (BioRad, cat. núm. 176-5011) mediante las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de aminas. Se inmovilizaron aproximadamente 4400 UR (unidades de respuesta) de anticuerpos Fc anti-IgG humana. Los experimentos cinéticos se realizaron a 25 °C en un regulador de migración (DPBS+0,03 % de P20+100 µg/ml de BSA). Para realizar experimentos cinéticos, se capturaron 100 UR de anticuerpos biespecíficos, seguidos de inyecciones de analitos (ECD de PSMA de

chimpancé recombinante) en concentraciones que variaban de 3,7 nM a 300 nM (en una dilución en serie de 3 veces). La fase de asociación se monitoreó durante 3 minutos a 50 µl/min, seguido de 15 minutos de flujo de regulador (fase de disociación). La superficie del chip se regeneró con dos pulsos de 18 segundos de ácido fosfórico 100 mM (H_3PO_4, Sigma, cat. núm. 7961) a 100 µl/min.

Los datos obtenidos se procesaron mediante el uso del software ProteOn Manager. En primer lugar, se realizó la corrección de los datos con el fondo mediante el uso de puntos intermedios. Después, se realizó la sustracción de doble referencia de los datos mediante el uso de la inyección de regulador de pH para las inyecciones de analitos. El análisis cinético de los datos se realizó mediante el uso de un modelo de unión de Langmuir 1:1. El resultado para cada mAb se informó en el formato de K_a (constante de asociación), K_d (constante de disociación) y K_D (constante de disociación en equilibrio). Los resultados se muestran en las Tablas 14 - 18.

Resultados:

Tabla 14: Resumen de la cinética y afinidad para la unión de PS3B25 y PS3B27 al PSMA **humano** recombinante (3,7 - 300 nM). Los parámetros reportados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1. Afinidad, $K_D = k_d/k_a$.

También conocido como	Ident. de proteína de Ab biespecífico	k_a (1/Ms) 10^5	k_d (1/s) 10^{-03}	K_D (nM)
PSMB87 x CD3B219	**PS3B25**	1,88 ± 0,13	1,01 ± 0,05	5,38 ± 0,55
PSMB127 x CD3B219	**PS3B27**	2,87 ± 0,36	2,89 ± 0,70	10,3 ± 3,2

N = 3 experimentos independientes con 2 réplicas. Resultados enumerados como promedio ± desviación estándar.

Tabla 15: Resumen de cinética y afinidad para unión de PS3B25 y PS3B27 al PSMA de **chimpancé** recombinante (3,7-300 nM). Los parámetros reportados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1. Afinidad, $K_D = k_d/k_a$.

También conocido como	Ident. de proteína de Ab biespecífico	k_a (1/Ms) 10^5	k_d (1/s) 10^{-03}	K_D (nM)
PSMB87 x CD3B219	**PS3B25**	2,81 ± 0,08	0,99 ± 0,04	3,54 ± 0,25
PSMB127 x CD3B219	**PS3B27**	2,08 ± 0,38	1,56 ± 0,37	7,48 ± 0,97

N = 3 experimentos independientes con 2 réplicas. Resultados enumerados como promedio ± desviación estándar.

Tabla 16: Resumen de la cinética y afinidad para la unión de PS3B25 y PS3B27 a PSMA de **cynomolgus** recombinante (3,7-300 nM). Los parámetros reportados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1. Afinidad, $K_D = k_d/k_a$.

También conocido como	Ident. de proteína de Ab biespecífico	k_a (1/Ms) 10^5	k_d (1/s) 10^{-03}	K_D (nM)
PSMB87 x CD3B219	**PS3B25**	0,98 ± 0,04	7,97 ± 0,34	81,1 ± 3,3
PSMB127 x CD3B219	**PS3B27**	1,59 ± 0,12	1,10 ± 0,04	7,00 ± 0,68

N = 3 experimentos independientes con 2 réplicas. Resultados enumerados como promedio ± desviación estándar.

Tabla 17: Comparación de la afinidad de unión de PS3B25 y PS3B27 de humano, de chimpancé y de cynomolgus. Afinidad, $K_D = k_d/k_a$.

Muestra	K_D humana (nM)	K_D de chimpancé (nM)	K_D de cynomolgus (nM)
PS3B25	5,38 ± 0,55	3,54 ± 0,25	81,1 ± 3,3
PS3B27	10,3 ± 3,2	7,48 ± 0,97	7,00 ± 0,68

Tabla 18: Resumen de cinética y afinidad para la unión de mAb biespecíficos al PSMA de **chimpancé** recombinante (3,7 - 300 nM). Los parámetros reportados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1. Afinidad, $K_D = k_d/k_a$.

Ident. de proteína de Ab biespecífico	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
PS3B19	1,26E+04	2,98E-04	23,6
PS3B20	1,76E+04	3,78E-04	21,4
PS3B21	6,70E+04	4,73E-04	7,1
PS3B22	6,51E+04	1,24E-03	19
PS3B23	9,89E+05	1,76E-03	1,8
PS3B24	6,26E+03	2,52E-04	40,3
PS3B25	1,95E+05	1,06E-03	5,5
PS3B26			Sin unión
PS3B27	1,70E+05	1,76E-03	10,4
PS3B28	1,34E+05	2,33E-03	17,4
PS3B29	6,71E+04	6,80E-03	101
PS3B30	7,34E+04	1,65E-03	22,4
PS3B31			Sin unión
PS3B32			Sin unión
PS3B33			Sin unión
PS3B34			Sin unión
PSMA nulo			Sin unión

En su mayor parte, la unión de Proteon iguala la unión celular. Sin embargo, uno de los anticuerpos biespecíficos no mostró unión al ECD de PSMA de chimpancé recombinante, si bien se unió al PSMA de chimpancé en la superficie celular de las células HEK. Este anticuerpo, PS3B26, es un aglutinante solo celular y se seleccionó de experimentos de unión posteriores. Uno de los aglutinantes positivos, PS3B23, mostró unión bifásica y no encajaba bien en el modelo de unión 1:1. Diez de los anticuerpos

biespecíficos fueron aglutinantes positivos para el ECD de PSMA de chimpancé recombinante mediante Proteon, y su afinidad se perfiló, además, mediante BIACORE.

Unión al PSMA de chimpancé recombinante mediante Biacore. Las mediciones de afinidad mediante la resonancia de plasmón de superficie (SPR) se realizaron usando un biosensor óptico Biacore 3000 (Biacore-GE Healthcare). Se preparó una superficie biosensora mediante el acoplamiento de Fc anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratory, cat. núm. 109-005-098) a la superficie de dextrano carboximetilado de un chip CM-5 (Biacore, cat. núm. BR-1000-12) mediante las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de aminas. Aproximadamente 16,000 UR (unidades de respuesta) de anticuerpos anti-Fc de IgG humana se inmovilizaron en cada una de las cuatro células de flujo. Los experimentos cinéticos se realizaron a 25 °C en regulador de migración (DPBS + 0,03 % de P20 + 100 µg/ml de BSA). Las diluciones de antígeno (PSMA de chimpancé recombinante, concentración ya sea de 1,2-300 nM o 3,7-900 nM en una dilución en serie de 3 veces) se prepararon en regulador de migración. Aproximadamente 100 UR de mAb biespecíficos PSMAxCD3 se capturaron en la celda de flujo 2 a 4 del chip sensor. La celda de flujo 1 se usó como superficie de referencia. La captura del mAb biespecífico PSMAxCD3 fue seguida de una inyección de 3 o 5 minutos (fase de asociación) de antígeno (PSMA de chimpancé recombinante) a 50 µl/min, seguida de 15 o 20 minutos de flujo de regulador (fase de disociación). La superficie de chip se regeneró mediante dos inyecciones de 18 segundos de ácido fosfórico 100 mM (H_3PO_4, Sigma, cat. núm. 7961) a 50 µl/min.

Los datos recolectados se procesaron usando el software BIAevaluation (Biacore). Primero, se realizó una doble sustracción de referencia de los datos mediante la

sustracción de las curvas generadas por la inyección de regulador de las curvas sustraídas de referencia para las inyecciones de analito. El análisis cinético de los datos se realizó usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 con ajuste global. El resultado para cada mAb biespecífico PSMAxCD3 se informó en el formato de K_a (constante de asociación), K_d (constante de disociación) y K_D (constante de disociación en equilibrio).

Tabla 19: Resumen de cinética y afinidad para la unión de mAb biespecíficos al ECD de PSMA de chimpancé recombinante mediante Biacore

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
PS3B19	6,24E+03	4,14E-04	66,3
PS3B20	7,82E+03	4,61E-04	59,1
PS3B21	1,10E+04	4,89E-04	44,4
PS3B22	1,66E+04	1,00E-03	60,4
PS3B23	1,34E+05	1,22E-03	9,1
PS3B24	2,35E+04	9,07E-04	38,6
PS3B25	6,59E+04	1,08E-03	16,4
PS3B27	8,90E+04	2,00E-03	22,4
PS3B28	6,20E+04	1,91E-03	30,8
PS3B29	2,74E+04	1,59E-03	58,1
PS3B30	3,48E+04	1,82E-03	52,3

Todos los anticuerpos biespecíficos que se unieron al ECD de PSMA de chimpancé mediante Proteon, también se unieron a través de Biacore. Las afinidades de unión fueron algo más débiles mediante Biacore.

Ejemplo 9. Evaluación de Ab biespecíficos contra PSMA x CD3 en un ensayo de destrucción celular funcional

Se usaron ensayos de citotoxicidad mediada por células T como un análisis funcional de la actividad de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos bispecíficos se

probaron para determinar la capacidad para lisar las células HEK que sobreexpresan el PSMA humano, así como la línea celular de cáncer de próstata humano LNCAP. Además, los anticuerpos biespecíficos se probaron para determinar la capacidad para destruir células HEK del PSMA de cynomolgus para confirmar la reactividad cruzada de especies

Se usó un ensayo de liberación de cromo-51 para medir la citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos individuales. La citotoxicidad se mide por la cantidad de liberación de cromo en el medio de cultivo como resultado de la lisis celular en presencia de células T activadas. La cantidad de liberación se compara con la liberación espontánea de cromo en las células objetivo solamente y la máxima liberación a través de la lisis celular objetivo total con Triton-X.

Las células Pan T humanas (CD3+) de múltiples donantes se preactivaron durante la noche con matraces revestidos con OKT3 (1 ug/ml) e IL-2 a 20 U/ml. Las células T se lavaron 2 veces. La línea celular objetivo se marcó durante 1 h con cromo-51. Las células T y las células objetivo se cultivaron a una relación de 5:1 durante 18 - 24 horas antes de cosechar y analizar el sobrenadante de cultivo. Todos los puntos se analizaron por triplicado y se informaron como una media de citotoxicidad del triplicado y SEM. Se usaron diluciones de anticuerpo biespecífico de 10 ug/ml - 0,00001 ug/ml.

La Figura 15 muestra la destrucción mediada por células T para todos los anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 contra las células HEK del PSMA humano. Para este experimento, se probaron los anticuerpos biespecíficos de brazo para CD3 de afinidad media y alta. La destrucción celular es evidente para la mayoría de las moléculas de brazo CD3 de afinidad alta, y varios de los anticuerpos biespecíficos muestran la destrucción a la concentración más baja probada. PS3B9 fue el único anticuerpo

biespecífico de afinidad media que mostró una destrucción celular significativa a concentraciones más bajas. La Figura 16 muestra la destrucción mediada por células T para varios pares de anticuerpos biespecíficos. A partir de estos datos, está claro que los anticuerpos biespecíficos de unión al CD3 de afinidad alta generan la mayor destrucción celular, y estos fueron el objeto de ulteriores experimentos de destrucción de células.

La Figura 17 muestra datos de destrucción celular para los anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 con el brazo para CD3 de afinidad alta generados contra las células LNCAP. PS3B25, PS3B27, PS3B28, PS3B30, PS3B23 y PSB22 tuvieron todos una actividad de redireccionamiento de células T. PS3B29 mostró actividad en la célula HEK del PSMA humano a las concentraciones más altas, pero no en LNCAP, lo que sugiere que debido a que es un aglutinante débil del PSMA no es capaz de unirse bien cuando los niveles de expresión del PSMA son bajos. En contraste, PS3B25, PS3B27 y PS3B28 mostraron la lisis de células tumorales LNCAP más alta. Un anticuerpo biespecífico PS3B38 que consiste en un brazo nulo y PSMB125 contra la proteína de VSR no tuvo actividad citolítica como se esperaba debido a la incapacidad para unirse a las células T.

Para confirmar la función de redireccionamiento de células T de PSMA de cynomolgus, se probaron anticuerpos biespecíficos para determinar la lisis de células HEK del PSMA de cynomolgus, que se muestra en la Figura 18. Todos los anticuerpos biespecíficos probados fueron capaces de destruir células que expresan el PSMA de cynomolgus con PS3B27 y PS3B28 que tienen la mayor actividad. A partir de los estudios de unión celular anteriores, estos brazos anti-PSMA tuvieron mayor afinidad para el PSMA de cynomolgus que para el humano, y esta observación

también se reflejó en la destrucción de células objetivo de PSMA de cynomolgus. PS3B27 y PS3B30 se probaron para determinar la destrucción de la línea celular HEK parental, y no lisaron la línea celular parental HEK (los datos no se muestran).

Los anticuerpos para PSMA PSMB127 y PSMB130, que generan los anticuerpos biespecíficos contra PSMAxCD3 PS3B27 y PS3B30, respectivamente, se seleccionaron para un análisis posterior. PS3B27 y PS3B30 destruyeron los objetivos PSMA humano y de cynomolgus, y tenían el brazo para CD3 de alta afinidad. PS3B27 unido a líneas celulares que expresan el PSMA humano con sustancialmente la misma afinidad, EC50 de ~14,6 nM y de cynomolgus de ~9,9 nM. PS3B30 se unió al PSMA humano con una diferencia de afinidad de aproximadamente 5 - 6 veces, con una EC50 de ~8 - 8,5 nM y al PSMA de cynomolgus a ~37,8 - 57 nM. Aunque la diferencia entre la unión al humano y al de cynomolgus puede ser mayor en 5 veces, PS3B27 mostró una destrucción funcional de los objetivos tanto el humano como el de cynomolgus.

Se repitieron las interacciones de PS3B27 con el ECD del PSMA de chimpancé recombinante y se estudiaron las interacciones con el ECD de PSMA de cynomolgus recombinante y el ECD del PSMA humano mediante la resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando un sistema ProteOn XPR36 (BioRad) como se describió anteriormente para el ECD del PSMA de chimpancé recombinante. El resumen de la cinética y afinidad para la unión al ECD de PSMA de chimpancé, de cynomolgus y humano se muestra en la Tabla 20. Este anticuerpo biespecífico se une a todos los objetivos con sustancialmente la misma afinidad.

Tabla 20: Resumen de cinética y afinidad para la unión de PS3B25 y PS3B27 a los ECD de PSMA objetivo recombinante

Objetivo	k_a (1/Ms) 10^5		k_d (1/s) 10^{-03}		K_D (nM)	
	PS3B25	**PS3B27**	**PS3B25**	**PS3B27**	**PS3B25**	**PS3B27**
De chimpancé	2,81 ± 0,08	2,08 ± 0,38	0,99 ± 0,04	1,56 ± 0,37	3,54 ± 0,25	7,48 ± 0,97
Cyno	0,98 ± 0,04	1,59 ± 0,12	7,97 ± 0,34	1,10 ± 0,04	81,1 ± 3,3	7,00 ± 0,68
Humano	1,88 ± 0,13	2,87 ± 0,36	1,01 ± 0,05	2,89 ± 0,70	5,38 ± 0,55	10,3 ± 3,2

Evaluación del anticuerpo biespecífico, PS3B27, en un ensayo de caspasa. La destrucción mediada por células T de PS3B27 se midió mediante un segundo ensayo de toxicidad celular. El ensayo de citotoxicidad de caspasa mide indirectamente la destrucción celular por medio de la escisión de un sustrato fluorescente mediante la caspasa activa 3/7. La escisión del sustrato da como resultado un tinte de ADN fluorescente con fluorescencia restringida al núcleo celular. Se toman mediciones de fluorescencia repetidas en cada pocillo durante el transcurso del ensayo, mediante el uso de un objetivo motorizado de 10X capaz de obtener imágenes de los pocillos con precisión en las mismas coordenadas. Las poblaciones de células objetivo se identifican basándose en restricciones de tamaño definidas y/o mediante el uso de una etiqueta secundaria.

Se aislaron células pan T CD3+ congeladas (adquiridas de Biological Specialty Corporation, Colmar, PA) mediante selección negativa de donantes sanos normales. Se cultivaron células de cáncer de próstata que expresan el PSMA (LNCaP, C42) en RPMI 1640 con HI FBS al 10 % + suplementos (adquiridos en Life Technologies).

Las células T y las células objetivo se combinaron en una proporción de efector a objetivo (E:T, por sus siglas en inglés) de 3:1 en RPMI libre de rojo fenol + FBS a 10 % y suplementos (Life Technologies), sin reactivos de selección y 0,6 ul de

reactivo de caspasa NucView (Essen Bioscience) a cada ml de células, según las pautas del fabricante. Se añadió un volumen total de 0,1 ml de células a los pocillos apropiados de una placa de fondo plano transparente de 96 pocillos (BD Falcon). Se prepararon anticuerpos biespecíficos PS3B27 (CD3xPSMA), CD3B288 (CD3xNull) o PS3B46 (PSMAxNull) a una concentración final 2X en RPMI libre de rojo fenol, preparado como se indicó anteriormente, y se añadieron 0,1 ml de compuestos a cada pocillo. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, para minimizar la agregación celular en el borde de los pocillos, las placas se transfirieron al instrumento Zoom Incucyte (Essen Bioscience). El instrumento Incucyte reside en una incubadora humidificada a 37 °C, CO2 al 5 %.

Las definiciones de procesamiento en el Incucyte se diseñaron para cada línea celular probada, según las pautas de fabricación. Las mediciones se tomaron cada seis horas, hasta que se observó una meseta en la señal de caspasa, seguida de tres o más disminuciones sucesivas de la señal máxima en los pocillos que contenían la concentración más alta del compuesto o compuestos de prueba.

Una vez finalizado el ensayo, se analizó cada placa mediante el uso de la definición de procesamiento adecuada. Los datos fluorescentes sin procesar se exportaron desde el software Incucyte Zoom y se pegaron en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). La actividad de caspasa 3/7 se determinó mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) para cada pocillo en GraphPad. Los valores de AUC se representaron gráficamente en función del compuesto Log10 nM. La EC_{50} para cada curva de dosis, en nanomolar (nM), se informó después de un análisis de regresión no lineal (ajuste de 4 parámetros, mínimos cuadrados ordinarios). Cada ensayo contenía un

mínimo de tres réplicas biológicas, y cada línea celular se probó usando células de cinco donantes sanos. Los datos se analizaron además mediante estadísticas no clínicas mediante el uso de un modelo de regresión no lineal. Los ejemplos de gráficos se muestran en la Figura 19. Los resultados calculados se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Resumen de los valores de EC_{50} para el ensayo de citotoxicidad dependiente de células T

Donante	FGc de LNCaP	C-42B
M2550	0,27 nM	0,11 nM
M5524	0,09 nM	0,06 nM
M5772	0,04 nM	0,03 nM
M7259	0,05 nM	0,06 nM
M7444	0,09 nM	0,05 nM

Ejemplo 10. Activación de células T por PS3B27 en líneas celulares positivas para PSMA

Las células T Pan CD3+ purificadas se obtuvieron de donantes sanos normales a través de Biological SpecialtyCorporation mediante la selección negativa de glóbulos blancos obtenidos por aféresis, y se almacenaron congeladas a -80 °C o en nitrógeno líquido hasta que estén listas para el uso. Las células T ingenuas, inactivadas, se combinaron con las células objetivo y los anticuerpos biespecíficos CD3xPSMA o los controles nulos (CD3xNulo o PSMAxNulo) a una relación de efector a objetivo de 3:1. Después de una incubación de 48 horas, los sobrenadantes se analizaron para determinar la secreción de citocinas por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas tipo sándwich (ELISA) (Descubrimiento de meso escala). La expresión de los marcadores de activación de células T CD25 se midió por citometría de flujo mediante la tinción de células T para CD45, CD8, CD25 y una tinción de IR

cercano live/dead. Las poblaciones de CD8+/CD25+ se determinaron mediante una primera selección en una población de células en bruto (FSC-A frente a SSC-A) para excluir los residuos y los agregados celulares. El subconjunto de selección de células se redujo aún más para las células que se determinó que estaban vivas, mediante la exclusión de la tinción live/dead. Las células vivas se seleccionaron para las células CD45+/CD8+. Finalmente, se identificó el subconjunto positivo para CD8+/CD25+. La EC_{50} de PS3B27 o control se obtuvo mediante la representación gráfica del porcentaje de CD8+/CD25+ contra Log10 nM de anticuerpo biespecífico o control, seguida de una regresión no lineal (ajuste de 4 parámetros, método de mínimos cuadrados) (Figura 20). Todos los análisis de datos se realizaron en GraphPad Prism.

Ejemplo 11. La eficacia antitumoral en la prevención de la tumorigénesis de xenoinjertos de HEK293-PSMA en ratones NSG humanizados con CMSP.

Todos los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de Janssen R & D, Spring House, PA.

La eficacia de PS3B27 (anticuerpo biespecífico contra PSMA x CD3) se evaluó por la prevención de la tumorigénesis (modelo profiláctico) de xenoinjertos humanos de HEK293 de PSMA usando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donante humano inoculadas en ratones NSG machos (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL2rg*^{tmlWjl}/SzJ or NOD SCID Gamma, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Los ratones se inyectaron por vía intravenosa (IV) en la vena de cola lateral con 1 x 10^7 CMSP humanas 7 días antes de la implantación de células tumorales. Posteriormente, a los ratones se implantó por vía

subcutánea (SC) 1 x 10^7 células HEK293 de PSMA en el flanco trasero derecho. A partir de la fecha de la implantación del tumor, se administró el control de PBS (solución salina regulada con fosfato), PS3B27, CD3B288 (CD3 x nulo) o PS3B46 (PSMA x nulo) por vía intravenosa a 0,4 mg/kg *q2d-q3d* por un total de 5 dosis los días 0, 3, 5, 7 y 10.

El volumen tumoral se calculó con la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = (a x $b^2/2$); donde 'a' representa la longitud y 'b' el ancho del tumor según lo determinado por las mediciones del calibre, y se monitorearon dos veces por semana durante todo el estudio. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) se definió como la diferencia entre los volúmenes tumorales medios de los grupos tratado y de control (PBS), calculada como TGI = [(TVc-TVt)/TVc)*100] donde TVc es el volumen tumoral medio de un grupo de control dado y TVt es el volumen tumoral medio del grupo tratado. Según lo definido por los criterios del NCI, ≥ 60 % de TGI se considera biológicamente significativo (Johnson, et al (2001) Br J Cancer 84(10) 1424-31). Los animales se retiraron de los estudios cuando se alcanzó un volumen tumoral máximo de 1500 mm^3.

El injerto de CMSP humanas conduce, eventualmente, a la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en los ratones, donde las células T de donantes injertadas se activan y se infiltran en los tejidos del huésped, lo que conduce a la pérdida de peso corporal, la insuficiencia de un órgano e, inevitablemente, la muerte. Para monitorear la aparición y gravedad de la EICH, se registró el peso corporal dos veces a la semana y se expresó en gramos (g). El cambio porcentual del peso corporal puede calcularse mediante la fórmula: Cambio en el peso corporal = [($(B_t-B_0)/B_0$)*100] donde B_t es el peso corporal en un día determinado del estudio y B_0 es el peso corporal al inicio del

tratamiento. Los animales con pérdida de peso corporal sostenida mayor que 20 % del peso corporal inicial se consideraron moribundos y se eliminaron del estudio.

La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con el software Graph Pad Prism (versión 6). El tratamiento con PS3B27 retrasó eficazmente la tumorigénesis y el crecimiento tumoral de PSMA-HEK293 (Figura 21). Pequeños pero palpables, los tumores de PSMA-HEK293 eran detectables en siete de los ocho ratones en el grupo tratado con PBS el día 16 del estudio (6 días después del último tratamiento terapéutico), mientras que solo un ratón de los ocho en el grupo tratado con PS3B27 tuvo un tumor. Cinco de los ocho ratones tenían tumores palpables en el grupo de tratamiento CD3B288 y dos de los ocho ratones tenían tumores pequeños en el grupo PS3B46. La inhibición del crecimiento tumoral se evaluó 27 días después de la interrupción del tratamiento (día 37 después de la implantación tumoral), cuando cada grupo tenía un mínimo de 7 animales. El crecimiento tumoral en el grupo tratado con el anticuerpo biespecífico contra PSMA x CD3 (PS3B27) se inhibió al 90 % en comparación con los controles tratados con PBS (n = 8/grupo, $p<0,001$). El anticuerpo biespecífico contra PSMA x Nulo (PS3B46) también inhibió la tumorigénesis y el crecimiento en una forma estadísticamente significativa (TGI = 42 %, n = 7) frente a control con PBS, ($p<0,05$), aunque no se consideró como un efecto biológicamente significativo con base en los criterios del NCI [1].

Los grupos de animales que recibieron las CMSP sucumben, eventualmente, a la EICH progresiva; sin embargo, la pérdida de peso corporal fue leve en el presente estudio. No se observó una diferencia significativa entre los pesos corporales medios

de los animales tratados con 0,4 mg/kg de PS3B27 y los tratados con PBS como se muestra en la Figura 22 hasta el día 37 después del implante tumoral ($p>0,05$). Por lo tanto, la redirección de células T mediada por PS3B27 no contribuyó más a la pérdida de peso corporal relacionada con la EICH.

A pesar de una menor pérdida de peso en el presente estudio, se observaron muertes esporádicas relacionadas con la EICH. Un ratón en el grupo de anticuerpo biespecífico contra PSMA x nulo PS3B46 se sacrificó debido a la pérdida excesiva de peso corporal (>20 %) relacionada con la EICH el día 30 después del implante tumoral. El día 42 después del implante tumoral, se observaron muertes adicionales relacionadas con la EICH en el grupo PBS (n = 1) y el grupo de anticuerpo biespecífico contra PSMA x Nulo PS3B46 (n = 2), y varios ratones adicionales se eliminaron del estudio debido a que alcanzaron el punto final de volumen tumoral de 1500 mm^3, momento en el cual se terminó todo el estudio.

Ejemplo 12. Eficacia de PS3B27 en la prevención de la tumorigénesis de mezcla de xenoinjertos de células HEK293-PSMA/T en ratones desnudos machos CD1

La eficacia de PS3B27 se evaluó en un modelo de xenoinjerto de mezcla donde las células pan T CD3+ humanas y las células tumorales se coinyectaron en ratones desnudos machos CD1 (NU-Foxn1nu, Charles River Laboratories, Wilmington, MA).

El anticuerpo biespecífico contra PSMA humano x CD3 humano PS3B27, o los anticuerpos biespecíficos de control se administraron por vía intravenosa cada 2-3 días (q2d o q3d) por un total de 5 dosis como se indica. Los ratones se monitorearon (mediciones de peso corporal y del tamaño del tumor) dos veces a la semana durante

los estudios. Las dosis de fármaco expresadas como µg/animal se convirtieron en mg/kg con base en un peso corporal de 25 g (ejemplo: 10 µ g/animal = 0,4 mg/kg). Las dosis de fármaco se administraron como mg/kg, se dosificó 10 ml/kg con base en el peso corporal (ejemplo: ratón de 25 g = 0,25 ml).

El volumen tumoral se calculó con la fórmula: Volumen tumoral (mm3) = (a x b2/2); donde ‘a’ representa la longitud y ‘b’ el ancho del tumor según lo determinado por la mediciones del calibrador], y se monitorearon dos veces por semana durante todo el estudio. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se definió como la diferencia entre los volúmenes tumorales medios del grupo tratado en comparación con el grupo de control, calculado como TGI = [(TVc-TVt)/TVc)*100] donde TVc es el volumen tumoral medio de un grupo de control determinado y TVt es el volumen tumoral medio del grupo de tratamiento. Según lo definido por los criterios del NCI, ≥ 60 % de TGI se considera biológicamente significativo. Los animales se retiraron de los estudios cuando se alcanzó un volumen tumoral máximo de 1500 mm^3.

La tolerabilidad de PS3B27 no pudo evaluarse con respecto a la unión de CD3 en los tejidos huésped debido a la falta de reactividad cruzada del brazo CD3 con los correspondiente antígenos de ratón. Sin embargo, las células T inyectadas con las células tumorales expresan el CD3 humano y pueden unirse a PS3B27 y los controles CD3 X Nulo. El cambio porcentual del peso corporal puede calcularse mediante la fórmula: El cambio en el peso corporal = [((Bt B0)/B0)*100], donde Bt es el peso corporal en un día de estudio determinado y B0 es el peso corporal al inicio del tratamiento.

La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con el software Graph Pad Prism (versión 6).

La eficacia de PS3B27 se evaluó por la prevención de la tumorigénesis de xenoinjertos de mezcla que contenían células HEK293-PSMA y células pan T positivas para CD3 activadas y expandidas en una relación de efector a objetivo de 1:5 en los ratones desnudos CD1 machos (ref. de ELN: CD3-PSMA-2013-00003). Las células T se activaron y se expandieron in vitro usando el kit de activación/expansión de células T en el medio que contenía IL-2 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, catálogo núm. 130-091-441, 130-097-743) durante 12 días. Se implantó a los ratones por vía subcutánea una mezcla de 5 x 106 células HEK293-PSMA y 1 x 106 células T activadas y expandidas por ratón, en Cultrex al 50 % (Trevigen, Gaithersburg, MD, catálogo núm. 3433-005-01) y el medio RPMI 1640 al 50 % libre de suero, en el flanco trasero derecho. A partir del mismo día de la implantación del tumor, se administró por vía IV PBS, PS3B27 a 0,005-0,5 mg/kg, CD3B288 (anticuerpo biespecífico CD3 x Nulo) a 0,5 mg/kg o PS3B46 (anticuerpo biespecífico contra PSMA x Nulo) a 0,5 mg/kg, en función del peso corporal, q2d-q3d, por un total de 5 dosis los días 0, 2, 4, 7 y 9. (n = 10/grupo). El tratamiento con PS3B27 también se evaluó con la administración por vía IP (los datos no se muestran). Un animal se eliminó los días 46 y 49 en el grupo de control con PBS, por su excesiva carga tumoral. Los datos de volumen tumoral se representaron gráficamente hasta el día 64, después del cual la mitad de los animales de control se eliminaron del estudio debido al volumen tumoral excesivo.

Como se muestra en la Figura 23, la tumorigénesis y el crecimiento se evaluaron durante 55 días después de la interrupción del tratamiento (hasta el día 64). El tratamiento con PS3B27 inhibió significativamente la tumorigénesis y retrasó el crecimiento en comparación con el control con PBS en todas las dosis (0,005, 0,05 o 0,5 mg/kg), lo que resultó en una TGI de 73 %, 81 % y 82 %, respectivamente ($p<0,001$, $P<0,0001$, $P<0,001$, respectivamente) el día 64. El tratamiento con PS3B27 mediante la administración por vía IP mostró una eficacia similar a la de la administración por vía IV (los datos no se muestran). Los animales tratados con CD3B288 (anticuerpo biespecífico CD3 x Nulo) o PS3B46 (anticuerpo biespecífico contra PSMA x Nulo) mostraron algo de actividad antitumoral con una TGI de 51 % y 38 %, respectivamente, el día 64 ($p<0,05$, p=ns, respectivamente); sin embargo, esto no se considera biológicamente significativo con base en los criterios del NCI de TGI de 60 %, lo que demuestra la necesidad de la unión tanto a CD3 como a PSMA del anticuerpo biespecífico para lograr eficacia.

No hubo pérdida de peso corporal durante el estudio; sin embargo, los animales tratados con PS3B27 a 0,5 y 0,005 mg/kg tuvieron un aumento significativamente menor en el peso corporal en comparación con los PBS ($p<0,001$, $p<0,0001$, respectivamente, Figura 24); sin embargo, esto podría deberse a una menor carga tumoral en estos animales.

Ejemplo 13. Estructura cristalina del ECD de PSMA humano unido al brazo Fab anti-PSMA del anticuerpo biespecífico PS3B27

PSMA es una proteína homodimérica expresada en la superficie celular. PSMA es una glicoproteína de tipo II integral de 750 residuos por monómero, compuesto de

un gran dominio ECD (705 residuos) con actividad de peptidasa, un dominio TM de un solo paso y un dominio intracelular corto de 19 residuos. La estructura cristalina de la región extracelular (ECD) de PSMA humano unida al brazo Fab de anti-PSMA del anticuerpo biespecífico PS3B27 se determinó a una resolución de 3,15 Å para comprender mejor el sitio de combinación entre PSMA y el anticuerpo.

La región extracelular de PSMA humano (residuos 44-750) se expresó en células de insectos High Five™ con un péptido señal gp67 N-terminal seguido de una etiqueta de hexahistidina escindible (sec. con núm. de ident.: 158). La proteína secretada se purificó a partir del sobrenadante mediante un procedimiento de tres etapas que comprende una captura de afinidad Ni^{2+}-NTA inicial, escisión mediada por TEV de la etiqueta de histidina seguida de una etapa de cromatografía de afinidad inversa y una etapa final de cromatografía de exclusión por tamaño. El PSMA-ECD purificado se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C en 10 mM de HEPES con pH de 7,4, 150 mM de NaCl, 2 mM de $CaCl_2$, 0,1 mM de $ZnCl_2$

El Fab de PSMB83, que es el brazo Fab de anti-PSMA parental en el anticuerpo biespecífico PS3B27, se expresó en las células HEK293 Expi con una etiqueta de hexahistidina (sec. con núm. de ident.: 158) y se purificó mediante la cromatografía de afinidad (HisTrap, GE Healthcare) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-300, Phenomenex Yarra). El Fab se almacenó a 4 °C en 50 mM de NaCl, 20 mM de Tris a un pH 7,4.

El complejo Fab de PSMA ECD / PSMB83 humano se preparó mediante un procedimiento de tres etapas. Primero, se cambió el regulador del Fab en 20 mM de MES con pH 6,0, 150 mM de NaCl. Después, se mezclaron el Fab y PSMA (1,5 molar

de Fab en exceso sobre monómero de PSMA) y se incubaron durante la noche a 4 °C mientras se dializaba en 20 mM de MES con pH de 6,0. Finalmente, el complejo se unió a una columna monoS 5/50 en 20 mM de MES con pH de 6,0 y se eluyó con un gradiente de NaCl.

Los cristales adecuados para la difracción de rayos X se obtuvieron usando el método de difusión de vapor de gota asentada a 20 °C y un robot Mosquito LCP (TTP Labtech). Los cristales de Fab de PSMB83 unidos a ECD de PSMA humano se cultivaron a partir de PEG al 18 % de 3 kDa, 0,2 M de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 M de Tris con pH de 8,5 con microsemillas y el complejo PSMA/Fab inicialmente a 7,3 mg/ml. Se obtuvieron cristales de Fab de PSMB83 libre a partir de PEG al 25 % de 3 kDa, 0,2 M de LiCl, 0,1 M de acetato con pH de 4,5 con el Fab inicialmente a 8,8 mg/ml.

Las estructuras se resolvieron mediante sustitución molecular (MR) con Phaser (Phaser Crystallographic Software, Universidad de Cambridge). El modelo de búsqueda de MR para la estructura de Fab de PSMB83 fue el código PDB 4M6O. La estructura del complejo PSMA/Fab se resolvió usando las estructuras cristalinas de PSMA (código PDB: 2C6G) y Fab de PSMB83 (estructura a una resolución de 1,93 Å; datos no mostrados) como modelos de búsqueda de MR. Las estructuras se refinaron con PHENIX (Adams, et al, 2004) y los ajustes del modelo se llevaron a cabo usando COOT (Emsley y Cowtan, 2004) Todos los demás cálculos cristalográficos se realizaron con el conjunto de programas CCP4 (Collaborative Computational Project número 4, 1994). Todos los gráficos moleculares se generaron con PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, versión 1.4.1, Schrödinger, LLC.) y las regiones de determinación por complementariedad (CDR) se determinaron usando la definición de Kabat.

La estructura de PSMA/Fab incluye los residuos 1-211 de la cadena ligera de Fab, los residuos 1-224 de la cadena pesada de Fab (excepto los residuos 138-146, que están desordenados) y los residuos 56-750 de PSMA, que corresponde a la proteasa (residuos 56-116 y 352-590), dominios apical (residuos 117-351) y helicoidal (residuos 591-750), y siete de diez posibles glucanos unidos a N (en Asn-76, -121, -140, -195, -459, -476 y -638) por subunidad de dímero de PSMA. El sitio activo de PSMA se encuentra en la interfaz entre los tres dominios y contiene dos átomos de zinc coordinados por residuos de histidina (H377 y H553) y glutamato/aspartato (D387, catalítico E424, E425 y D453) y una molécula de agua. La unidad asimétrica de cristal contiene un dímero de PSMA con cada subunidad unida de manera similar a un Fab de PSMB83. El sitio de combinación de Fab/PSMA está bien definido por el mapa de densidad de electrones, que permite un posicionamiento confiable de los residuos de unión. Las moléculas de Fab y PSMA se enumeran secuencialmente en las Figura 25-30.

El epítopo, el parátopo y las interacciones de PSMB83. PSMB83, que es el brazo Fab anti-PSMA parental en el anticuerpo biespecífico PS3B27, reconoce un epítopo conformacional y discontinuo en el dominio apical de PSMA (Figura 25). El área de superficie de PSMA enterrada por el Fab es de aproximadamente 700 $Å^2$. Específicamente, los residuos del epítopo PSMB83 son I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 y K324-P326. La hélice α7 (residuos Y299-E307) es una región predominante del epítopo y se une a través de las CDR de cadena pesada y ligera de Fab. En un extremo de la hélice, Y299 y Y300 forman un grupo aromático con los residuos de Fab $Y57^H$, $W94^L$ y los residuos de PSMA F235 y P237, mientras que E307, en el otro extremo de la hélice, forma un puente salino con $R91^L$ y los enlaces de

hidrógeno $Y32^L$. Las Figura 26 y 27 muestran las principales interacciones de PSMA con las cadenas ligera y pesada de PSMB83. Los residuos del epítopo de PSMB83 se conservan entre el humano y de mono cynomolgus (Figura 28), y el anticuerpo biespecífico PS3B27 demostró que se une con una similar afinidad al PSMA humano y al de cynomolgus. Por el contrario, se espera que las mutaciones del epítopo G238A y, especialmente, Y300D de humano a ratón reduzcan la afinidad de unión de PSMB83 a PSMA de ratón en comparación con el humano. La mutación Y300D interrumpe un contacto de enlace de hidrógeno con $N59^H$ y una interacción de apilamiento π con $W94^L$. El parátopo de PSMB83 está compuesto de residuos de todas las CDR excepto de CDR-L2 y CDR-H1 (Figura 29). Específicamente, los residuos de parátopo son la cadena ligera $S30^L$, $Y32^L$, $R91^L$, $S92^L$, $W94^L$ y la cadena pesada $G56^H$-$N59^H$, $K65^H$, $G66^H$, $Y101^H$, $V107^H$, y $D109^H$. La Figura 30 muestra los contactos de interacción entre PSMA y PSMB83. La ubicación accesible del epítopo facilita la unión del brazo Fab de PSMB83 en el anticuerpo biespecífico PS3B27 al PSMA unido a la membrana, mientras que el otro brazo Fab todavía está unido a CD3 en la membrana de células T. No se espera que PSMB83 inhiba la actividad enzimática de PSMA ya que el anticuerpo se une lejos del sitio activo y no causa ningún cambio estructural significativo en PSMA que pueda afectar la función enzimática, tal como los movimientos de bucle que cierran el sitio activo o el desplazamiento de residuos catalíticos (RMSD de 0,3 Å para la superposición de Cα de moléculas de PSMA en estructuras unidas y no unidas de Fab (Barinka et al, 2007)).

Ejemplo 14. Maduración en afinidad anti-PSMA

La maduración en afinidad se realizó en clones de fagos de Fab anti-PSMA de dos genotecas de maduración en afinidad de PSMA para identificar un anticuerpo con mayor afinidad de unión en comparación con el PSMB127 parental (ident. de fab = PSMB83). Se generaron dos genotecas para la maduración en afinidad de PSMB127. En la primera genoteca, se aleatorizaron CDR1 y CDR2 de cadena pesada de acuerdo con el diseño en la Tabla 22 (PH9H9L1). El fragmento H-CDR3 se amplificó por PCR a partir de pDR000024032 y se digirió con SacII + XhoI. Este fragmento se clonó en la genoteca PH9H9L1/PH9L3. Este se transformó en células de E. coli MC1061F' y se generó el fago que muestra esta genoteca Fab. En la segunda genoteca las CDR de cadena ligera se aleatorizaron de acuerdo con el diseño de la Tabla 25 (PH9L3L3). La cadena pesada de PSMB83 (PSMH360) se amplificó por PCR y se digirió con NcoI + XhoI. Este fragmento se clonó en el ADN de la genoteca PH9L3L3 (ELN: genoteca de fagos De Novo 2010 SRI-021). Este se transformó en células de E. coli MC1061F' y se generó el fago que muestra esta genoteca Fab.

Tabla 22: Diseño de la genoteca de PH9H9L1

Posición	AA parental	Genoteca AA
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Y	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	A	A, E, L, N, R, T, W, Y
52	S	A, D, L, N, R, S
54	S	A, E, N, S, Y
57	S	D, N, R, S, T, Y

59	Y	E, G, N, Q, R, Y

Tabla 23: Diseño de la genoteca de PH9L3L3

Posición	AA parental	Genoteca AA
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Y	D, N, R, S, Y
49	Y	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	S	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

Una inmunoadsorción de solución de las genotecas de Fab-pIX de maduración por afinidad de PSMA se realizó contra ECD de PSMA humano biotinilado durante tres rondas. El antígeno unido al fago se capturó en glóbulos de neutravidina (GE HealthCare Life Science, cat. núm. 78152104011150) de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido de lavados extensivos en 1x PBST (0,05 % tween 20) y una incubación de una hora con PSMA ECD sin marcar en exceso molar de 500 veces del antígeno biotinilado. Esta inmunoadsorción produjo los clones, PSMXP46R3_59H09, PSMXP46R3_59H06, PSMXP46R3_59E03, PSMXP46R3_59C09, PSMXP46R3_59H01, PSMXP46R3_59F11, y PSMXP46R3_59F07.

Para determinar el nivel de expresión de los clones Fab de anti-PSMA, se recubrieron placas Maxisorb de 96 pocillos durante la noche a 4 C con IgG de Fd antihumana, se lavaron y se bloquearon con leche al 3 %-PBS-Tween al 0,05 % durante 1 hora. Las muestras de sobrenadante de fagos se diluyeron en serie 2 veces

para 11 diluciones en el regulador de bloqueo con el pocillo final en blanco. Se capturaron 100 ul de estas soluciones en las placas recubiertas durante 1 hora. Las placas se lavaron y se añadieron 100 ul de anticuerpo anti-F(ab')2-HRP durante 1 hora. Las placas se lavaron y se revelaron con 100 ul de reactivo de peroxidasa, y se leyó la luminiscencia en el Envision (**Figura 31**).

Para determinar la unión de los clones Fab de anti-PSMA a la proteína recombinante humana y de cynomolgus, se recubrieron placas Maxisorb de 96 pocillos con 100 µl de 5 µg/ml de neutravidina durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y bloquearon con leche al 3 % -PBS-Tween al 0,05 % durante 1 hora. Se capturaron las proteínas PSMA biotiniladas humanas y de cynomolgus recombinantes a 2,5 ug/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y 100 µl de sobrenadante de fab diluido en serie por 2 veces se capturó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y después hubo una incubación de 2,5 horas con 200 ul de leche al 0,3 % en PBST para eliminar algunos de los fab de afinidad débil. Después, hubo otros 30 minutos de incubación con 200 ul de leche al 0,3 % en PBST para eliminar los fab de afinidad más débil. Las placas se lavaron y se añadieron 100 ul de anticuerpo anti-F(ab')2-HRP durante 1 hora. Las placas se lavaron y se revelaron con 100 ul de reactivo de peroxidasa, y se leyó la luminiscencia en el Envision (Figura 32 y Figura 33). La Figura 31 demuestra que la expresión de proteína del Fab parental y la de los Fab madurados por afinidad eran similares. Los valores del eje y representan la luminiscencia del reactivo de detección que equivale a la abundancia de proteína fab sobre la curva de dilución; cuanto mayor sea la lectura de luminiscencia, más proteína en el pocillo disminuyó con diluciones sucesivas al doble. Había más proteína en los pocillos con los

fab madurados por afinidad, pero el aumento con respecto al parental es como máximo cinco veces mayor, según lo demostrado por los valores de EC_{50} (que es la concentración de proteína que da la mitad de la respuesta máxima). Estos datos demuestran que la diferencia en los perfiles de unión del PSMA en la Figura 32 y la Figura 33 no se debe a una diferencia en la concentración de Fab.

La Figura 32 demuestra una unión mejorada de los Fab madurados por afinidad al antígeno recombinante humano con respecto al Fab anti-PSMA parental (PSMB83). Nuevamente, el eje y del gráfico representa los valores de luminiscencia En este caso, cuanto mayor sea el valor, más Fab se unirá a la proteína PSMA humana. Esta es una medida de unión, ya que el aumento de las concentraciones de Fab (a lo largo del eje x) genera valores de luminiscencia más altos. Hubo una unión insignificante del Fab parental en estas condiciones, como lo demuestra la ausencia de señal incluso a altas concentraciones (círculos abiertos a lo largo del eje x). Se observó la unión de los Fab madurados por afinidad sobre las concentraciones probadas lo que equivale a una capacidad de unión más fuerte a la proteína PSMA humana. Dado que la unión de Fab parental a la proteína PSMA humana fue cero, no se pudo generar la EC_{50}.

La Figura 33 demuestra la unión mejorada de los Fab madurados por afinidad al antígeno recombinante de cynomolgus con respecto al Fab anti-PSMA parental (PSMB83). Nuevamente, el eje y del gráfico representa los valores de luminiscencia En este caso, cuanto mayor sea el valor, más Fab se unirá a la proteína PSMA de cynomolgus. Esta es una medida de unión, ya que el aumento de las concentraciones de Fab (a lo largo del eje x) genera valores de luminiscencia más altos. Hubo una unión insignificante del Fab parental en estas condiciones, como lo demuestra la

ausencia de señal incluso a altas concentraciones (círculos abiertos a lo largo del eje x). Se observó la unión de los Fab maduros por afinidad sobre las concentraciones ensayadas, lo que equivale a una capacidad de unión más fuerte a la proteína PSMA humana. Dado que la unión de Fab parental a la proteína PSMA humana fue cero, no se pudo generar la EC_{50} para una comparación directa.

En general, los perfiles de unión de Fab de los fagos demuestran una unión mejorada al antígeno recombinante humano y de cynomolgus sobre el mAb anti-PSMA parental (PSMB127). Esta mejora no es el resultado de diferencias en los perfiles de expresión de Fab, como se demuestra en la Figura 34 y la Figura 35, que muestran la unión de Fab maduros por afinidad normalizados a los niveles de expresión de Fab. Los cinco candidatos Fab principales identificados a partir de la detección de ELISA se produjeron en un formato de anticuerpo monoclonal en IgG4 PAA. La Tabla 24 enumera los identificadores de mAb posteriores y las Tablas 25 y 26 proporcionan información de secuencia.

Tabla 24: Cinco anticuerpos maduros de afinidad principales identificados en base a ELISA

	HC	LC	
Ident. de pocillo	Sec. con núm. de ident.:	Sec. con núm. de ident.:	Ident. de proteína MAB
PSMXP46R3_59C09	PSMH859	PSML160	PSMB346
PSMXP46R3_59E03	PSMH859	PSML159	PSMB345
PSMXP46R3_59F07	PSMH862	PSML158	PSMB349
PSMXP46R3_59H01	PSMH860	PH9L3	PSMB347
PSMXP46R3_59H06	PSMH859	PH9L3	PSMB344

Tabla 25. Secuencias VH y VL de los cinco candidatos Fab de PSMA principales

Ident. de MAb	Secuencia de aminoácidos VH	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos VL	Sec. con núm. de ident.
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	138	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	67
PSMB345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	138	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPGQAPRLLIHDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	142
PSMB346	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	138	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASYRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	143
PSMB347	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSMKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	67
PSMB349	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRGNWPLTFGQGTKVEIK	144

Tabla 26. Secuencias de cadena pesada y cadena ligera de los cinco candidatos de PSMA principales en formato de anticuerpo monoclonal en IgG4 PAA

Ident. de mAb	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera	Sec. con núm. de ident.
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS	145	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST	89

	VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK		YSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
PSMB345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	145	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSNYLAWYQQKPGQA PRLLIHDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRRNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	148
PSMB346	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	145	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASYRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRRNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	149
PSMB347	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT	146	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	89

	CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK			
PSMB349	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSLKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	147	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRGNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	150

Las 3 HC diferentes y las 4 LC diferentes se combinaron en un formato de matriz para ampliar la diversidad de aciertos (Tabla 26). Dado que la metionina en la CDR2 de PSMH860 es un riesgo postraduccional, una nueva secuencia se generó con M64L e identificada como PSMH865. PSMH865 se emparejó con PSML160 para generar PSMB365. Las Tablas 27 y 28 proporcionan información de secuencia.

Tabla 26: Formato de la matriz de 3 cadenas pesadas y 4 cadenas ligeras combinadas

	PSMH859	PSMH860	PSMH862
PH9L3	PSMB344	PSMB347	PSMB358
PSML158	--	PSMB361	PSMB349
PSML159	PSMB345	PSMB362	PSMB359
PSML160	PSMB346	PSMB363	PSMB360

Tabla 27. Secuencias VH y VL de aciertos de PSMA recombinados de la matriz

Ident. de MAb	Secuencia de aminoácidos VH	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos VL	Sec. con núm. de ident.
PSMB358	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSLKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	67
PSMB359	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSLKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSNYLAWYQQKPGQ APRLLIHDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	142
PSMB360	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSLKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASYRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	143
PSMB361	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSMKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRGNWPLTFGQGTKVEIK	144
PSMB362	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSMKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSNYLAWYQQKPGQ APRLLIHDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	142
PSMB363	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSMKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SYDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASYRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	143
PSMB365	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEWVS EISGSGGYTNYADSLKSRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YDSSLYVGDYFDYWGQGTLVTVSS	141	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASYRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQRRNWPLTFGQGTKVEIK	143

Tabla 28. Secuencias de cadena pesada y cadena ligera de aciertos de PSMA recombinados con matriz

Ident. de MAb	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera	Sec. con núm. de ident.

PSMB358	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSLKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	147	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRS NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	89
PSMB359	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSLKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	147	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIHDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRR NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	148
PSMB360	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSLKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	147	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASYRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRR NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	149
PSMB361	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSMKSRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT	146	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRG NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK	150

	VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK		ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	
PSMB362	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSMKSRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	146	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIHDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRR NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	148
PSMB363	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSMKSRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	146	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASYRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRR NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	149
PSMB365	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FKSDAMHWVRQAPGKGLEWVSEISGSG GYTNYADSLKSRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	151	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASYRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRR NWPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	149

La Tabla 29 proporciona las CDR para todos para los aciertos madurados por afinidad.

Tabla 29. Secuencias CDR de aciertos de PSMA madurados por afinidad

Ident. de MAb		**CDR (sec. con núm. de ident.:)**		
		CDR1	**CDR2**	**CDR3**
PSMB344	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB345	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB346	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB347	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB349	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRGNWPLT (136)
PSMB358	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB359	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB360	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB361	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRGNWPLT (136)
PSMB362	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRRNWPLT (132)
PSMB363	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSMKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)
PSMB365	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLKS (137)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)

	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRRNWPLT (132)

Ejemplo 15. Generación de anticuerpo biespecífico contra PSMA×CD3 madurado por afinidad

Se generaron dos tipos de anticuerpos biespecíficos contra PSMA × CD3 madurados por afinidad: uno específico para el brazo de direccionamiento (p. ej., anti-PSMA madurado por afinidad) recombinado con un brazo CD3 de alta afinidad [CD3B219 de la sec. con núm. de ident.: 104, VL de la sec. con núm. de ident.: 105; Sec. con núm. de ident. HC: 110, sec. con núm. de ident. LC: 111)] o un brazo CD3 de baja afinidad llamado CD3B376 [CD3B376 (VH, sec. con núm. de ident.: 152, VL de sec. con núm. de ident.: 153; Sec. con núm. de ident. HC: 154, sec. con núm. de ident. LC: 155)].

Tabla 30. Secuencias para el brazo CD3 de baja afinidad (CD3B376)

Ident. de MAb	**Secuencia de aminoácidos VH**	**Sec. con núm. de ident.**	**Secuencia de aminoácidos VL**	**Sec. con núm. de ident.**
	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAIS GDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVN PDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYC ARGYSSSFDYWGQGTLVTVSS	152	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSNIGTYKFVSWYQQHPDK APKVLLYEVSKRPSGVSSRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	153
	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada		**Secuencia de aminoácidos de cadena ligera**	
CD3B376	MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQ QSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVF NNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTY YRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYS SSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD	154	MARSALLILALLLLGLFSPGAWG QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSNIGTYKFVSWYQQHPDK APKVLLYEVSKRPSGVSSRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	155

	GSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK			

Estos mAb parentales están en el formato GenMab (Labrijn et al, 2013) donde el parental objetivo (PSMA) contiene la mutación 409R GenMab (aminoácido nativo para IgG4), mientras que el parental destructor (CD3) contiene la mutación F405L GenMab y la mutación R409K. El anticuerpo monoespecífico anti-CD3 se expresó como IgG4, que tiene sustituciones Fc S228P, F234A, L235A, F405L y R409K (brazo CD3) (numeración de acuerdo con el índice de la UE) en sus regiones Fc. El parental de direccionamiento (PSMA) está en IgG4 humana con sustituciones de Fc S228P, F234A, L235A. Los anticuerpos monoespecíficos se expresaron en líneas celulares HEK bajo promotores CMV.

Los anticuerpos parentales PSMA y CD3 se purificaron usando una columna de proteína A con un regulador de elución de 100 mM de NaAc con pH de 3,5 y un regulador de neutralización de 2,5 M de Tris, con pH de 7,2 Los mAb parentales neutralizados se usaron para preparar anticuerpos PSMAxCD3 biespecíficos. Una parte de los mAb parentales se intercambió adicionalmente con el regulador en D-PBS, regulador de pH 7,2 para mediciones analíticas y ensayos.

Después de la purificación, se realizó un intercambio controlado de brazo Fab para producir anticuerpos biespecíficos, como se describe en el Ejemplo 6.

Los anticuerpos biespecíficos finales producidos, junto con los mAb parentales (es decir, PSMA, CD3 o Nulo) usados en las reacciones de recombinación se enumeran en la Tabla 27 y 28.

Los impactos de PSMA seleccionados se emparejaron también con un brazo que no mata (Null) para crear controles negativos con fines de prueba. Para los

anticuerpos biespecíficos de control, B2M1, se generó un anticuerpo VRS en el formato IgG4 PAA, este se purificó y se combinó con cualquiera de los brazos CD3 CD3B219 -F405L, R409K para generar CD3B288 (CD3 x nulo) o brazos PSMA, PSMB122, PSMB126, PSMB130 para generar PS3B37, PS3B39 y PS3B40 respectivamente (PSMA x nulo). Estos mAb madurados por afinidad específicos de PSMA se cruzaron (como en los métodos anteriores) con CD3B219 y CD3B376 para generar los anticuerpos biespecíficos que se muestra en la Tabla 31.

Tabla 31. Generación de anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 madurados por afinidad generados a partir de PSMB127 madurado por afinidad

Ident.	Brazo 1	HC Sec. con núm. de ident.:	LC Sec. con núm. de ident.:	Brazo 2	HC Sec. con núm. de ident.:	LC Sec. con núm. de ident.:
PS3B60	PSMB344	145	89	CD3B219	110	111
PS3B61	PSMB345	145	148	CD3B219	110	111
PS3B62	PSMB346	145	149	CD3B219	110	111
PS3B63	PSMB347	146	89	CD3B219	110	111
PS3B64	PSMB349	147	150	CD3B219	110	111
PS3B70	PSMB358	147	89	CD3B219	110	111
PS3B71	PSMB359	147	148	CD3B219	110	111
PS3B72	PSMB360	147	149	CD3B219	110	111
PS3B73	PSMB361	146	150	CD3B219	110	111
PS3B74	PSMB362	146	148	CD3B219	110	111
PS3B75	PSMB363	146	149	CD3B219	110	111
PS3B76	PSMB358	151	149	CD3B376	154	155
PS3B77	PSMB349	145	89	CD3B376	154	155
PS3B78	PSMB359	145	148	CD3B376	154	155
PS3B79	PSMB360	145	149	CD3B376	154	155
PS3B80	PSMB347	146	89	CD3B376	154	155
PS3B81	PSMB361	147	150	CD3B376	154	155
PS3B82	PSMB362	147	89	CD3B376	154	155
PS3B83	PSMB363	147	148	CD3B376	154	155
PS3B84	PSMB344	147	149	CD3B376	154	155

PS3B85	PSMB345	146	150	CD3B376	154	155
PS3B86	PSMB346	146	148	CD3B376	154	155
PS3B90	PSMB365	146	149	CD3B376	154	155

Se analizaron los anticuerpos biespecíficos contra PSMA×CD3 para determinar la unión a la línea celular positiva de PSMA, LNCAP, a la línea celular negativa de PSMA, PC3. Para evaluar las capacidades de unión de los anticuerpos biespecíficos contra PSMA, se usó el ensayo de unión a células (descrito anteriormente). Los anticuerpos biespecíficos se normalizaron para la concentración de proteínas y después se incubaron con el mismo número de células que expresaban PSMA humano o cyno. El MFI en cada concentración se recolectó por citometría de flujo y se representó como función de la concentración. Los datos se transformaron mediante log10 y después se trazaron. Se realizó una regresión no lineal de las curvas de unión para determinar las EC_{50}.

Estos valores relativos se usaron para clasificar la unión de PSMA a las células objetivo. Las Figuras 36-38 muestran la unión de LNCAP de todos los anticuerpos biespecíficos preparados. En la Figura 38, ninguno de los constructos demostró unión a la línea celular negativa para PSMA. En la Figura 36 y la Figura 37, todos los aciertos madurados por afinidad demostraron una mayor afinidad de unión a través de curvas desplazadas a la izquierda y un aumento de cMax en comparación con el mAb parental, PS2B27.

Las interacciones de los anticuerpos biespecíficos maduros por afinidad con el ECD de cyno de PSMA recombinante y el ECD de PSMA humano se estudiaron mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando un sistema ProteOn XPR36 (BioRad) como se describió anteriormente para el ECD del PSMA recombinante de chimpancé. Todos los anticuerpos biespecíficos se unen a ambos objetivos con

sustancialmente la misma afinidad, las KD en el rango de 0,05 nM a 0,27 nM para ECD de PSMA humano y de 0,05 nM a 0,23 nM de ECD de PSMA de cyno.

Ejemplo 16. La evaluación de Ab biespecíficos maduros en afinidad PSMA x CD3 en un ensayo de destrucción celular funcional

Con base en los datos anteriores, en las mediciones de afinidad y en la identidad de secuencia, se caracterizaron aún más tres anticuerpos PSMA, PSMB347, PSMB360 y PSMB365 como biespecíficos con ya sea CD3B219 o CD3B376, por su capacidad para mediar en la citotoxicidad de células T redirigidas y específicas de PSMA La muerte mediada por células T se mide usando un ensayo de citotoxicidad caspasa, que mide indirectamente la muerte celular por escisión de un sustrato fluorescente por caspasa 3/7 activa. La escisión del sustrato da como resultado un tinte de ADN fluorescente con fluorescencia restringida al núcleo celular. Se toman mediciones de fluorescencia repetidas en cada pocillo durante el transcurso del ensayo, mediante el uso de un objetivo motorizado de 10X capaz de obtener imágenes de los pocillos con precisión en las mismas coordenadas. Las poblaciones de células objetivo se identifican basándose en restricciones de tamaño definidas y/o mediante el uso de una etiqueta secundaria. Se aislaron células pan T CD3+ congeladas (adquiridas de Biological Specialty Corporation, Colmar, PA) mediante selección negativa de donantes sanos normales. Se cultivaron células de cáncer de próstata, que expresan PSMA, (LNCaP, C42) en RPMI 1640 con HI FBS + suplementos al 10 % (adquiridos de Life Technologies).

Las células T y las células objetivo se combinaron en una proporción de efector a objetivo (E:T, por sus siglas en inglés) de 3:1 en RPMI libre de rojo fenol + FBS a

10 % y suplementos (Life Technologies), sin reactivos de selección y 0,6 ul de reactivo de caspasa NucView (Essen Bioscience) a cada ml de células, según las pautas del fabricante. Se añadió un volumen total de 0,1 ml de células a los pocillos apropiados de una placa de fondo plano transparente de 96 pocillos (BD Falcon). Se prepararon anticuerpos biespecíficos PS3B27 (CD3xPSMA), CD3B288 (CD3xNull) o PS3B46 (PSMAxNull) a una concentración final 2X en RPMI libre de rojo fenol, preparado como se indicó anteriormente, y se añadieron 0,1 ml de compuestos a cada pocillo. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente para minimizar la agregación celular en el borde de los pocillos, las placas se transfirieron al instrumento Zoom Incucyte (Essen Bioscience). El instrumento Incucyte reside en una incubadora humidificada a 37 °C, CO2 al 5 %.

Las definiciones de procesamiento en el Incucyte se diseñaron para cada línea celular probada, según las pautas de fabricación. Las mediciones se tomaron cada seis horas, hasta que se observó una meseta en la señal de caspasa, seguida de tres o más disminuciones sucesivas de la señal máxima en los pocillos que contenían la concentración más alta del compuesto o compuestos de prueba. Como muestran los datos en la Figura 39, las curvas para PS3B80, PS3B79, PS3B89, PS3B90, PS3B63 y PS3B72 se desplazan a la izquierda, lo que indica una mayor potencia sobre PS3B27. Los controles del brazo nulo no indujeron la muerte celular como se esperaba.

Ejemplo 17. Eficacia antitumoral en la prevención de tumorigénesis de xenoinjertos de LnCaP en ratones NSG humanizados

Se evaluó la eficacia de PS3B79 y PS3B90 en xenoinjertos de cáncer de próstata humano 3D LnCaP AR.TB establecidos en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} / SzJ (NSG) macho humanizados intraperitonealmente (*ip*) con células T humanas. Se dosificó PS3B79 y PS3B90 a 2,5 y 5 mg/kg o control de anticuerpos Null×CD3B376 *q3d-q4d* los días 36, 39, 43, 47, 50, 53, 56, 60 y 63 para un total de 8 dosis. El día 53 de posimplante tumoral, que fue la última fecha del estudio cuando quedaron nueve (9) animales por grupo, se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (% TGI). Se observó una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral para PS3B79 a 5 mg/kg con una TGI de 42 % (ANOVA bidireccional con prueba de Bonferroni, *p<0,0001, Figura 40), y para PS3B90 a 2,5 y 5 mg/kg con 53 % y 33 % respectivamente en comparación con el control Nulo×CD3 (ANOVA bidireccional con prueba de Bonferroni, *p<0,001, Figura 41) Por lo tanto, CD3B376 es capaz de inducir la activación y citotoxicidad de las células T in vivo y dar como resultado la inhibición del crecimiento tumoral en un formato biespecífico con brazos de unión a PSMA de alta afinidad, PSMB360 y PSMB365.

Ejemplo 18. Eficacia de PSMAxCD3 en el modelo de tumor de próstata LuCaP 86.2 de xenoinjerto derivado de paciente establecido en ratones NSG humanizados con células T

La eficacia antitumoral de PS3B72 se evaluó en el modelo de tumor de próstata LuCaP 86.2 de xenoinjerto derivado de paciente (PDX, por sus siglas en inglés) establecido en ratones macho NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) humanizados por vía

intraperitoneal (*ip*) con células pan-T humanas. El anticuerpo PS3B72 a 0,5 o 5 mg/kg o el control NuloxCD3 se dosificó *q3d-q4d* los días 45, 49, 52, 56, 59, 63, 66, 70, 73 y 77 después de la implantación por un total de 10 dosis. El día 83 después del implante de tumor, que fue el último día del estudio, cuando diez animales quedaban por grupo, se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI). La inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa se observó para PSMAxCD3 a 0,5 y 5 mg/kg, con 108 % y 101 % de ΔTGI (análisis de efectos mixtos lineales usando el ajuste de FDR, *p<0,0001, Figura 42), respectivamente, en comparación con el control Nulo x CD3. Al final del periodo de dosificación de 5 semanas, se observaron 9 de 10 regresiones completas (RC) en el grupo PSMAxCD3 a 0,5 mg/kg. Estos 9 ratones permanecieron libres de tumores hasta la terminación del estudio. En la terminación del estudio, se observaron 4 de 10 RC en el grupo PS3B72 a 5 mg/kg. Cuando los ratones se dosificaron con PS3B72 a 5 mg/kg en ausencia de humanización de células T, no se observó eficacia antitumoral.