

ANTICUERPOS DE CADENA PESADA QUE SE UNEN AL PSMA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/830,130, presentada el 5 de abril de 2019, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0001.1] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia ASCII, creada el 9 de julio de 2020, se denomina TNO-0016-WO_SL.txt y tiene un tamaño de 121 310 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a anticuerpos de cadena pesada humanos (por ejemplo, UniAbs™) que se unen al PSMA. La invención se refiere además a métodos para preparar dichos anticuerpos, composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden dichos anticuerpos, y su uso para tratar trastornos que se caracterizan por la expresión de PSMA.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

PSMA

[0003] PSMA, también conocido como Antígeno Prostático Específico de Membrana y glutamato carboxipeptidasa II (UniProt Q04609), es una proteína transmembrana de tipo II que tiene actividad dipeptidasa ácida N-acetilada-alfa-ligada, folato hidrolasa y dipeptidil-peptidasa. Está codificado por el gen FOLH1 en humanos y consta de un dominio citoplásmico de 19 aminoácidos, una parte transmembrana de 24 aminoácidos y una parte extracelular de 707 aminoácidos. La proteína es enzimáticamente activa como homodímero no covalente. El PSMA se expresa en el tejido del epitelio de la próstata y se regula por aumento en el cáncer de próstata y la neovascularización de los tumores sólidos. También se expresa en niveles bajos en tejidos sanos como el cerebro, los riñones y las glándulas salivales, pero su sobreexpresión en el tejido prostático maligno lo convierte en un objetivo atractivo para el tratamiento terapéutico del cáncer de próstata. También puede ser relevante para terapia o

imagenología de tumores sólidos, dada su alta expresión en neovasculatura maligna. Se han descrito anticuerpos monoclonales, conjugados anticuerpo-fármaco y linfocitos T receptores de antígeno quimérico dirigidos a PSMA para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico (Hernandez-Hoyos et ál. 2016, PMID: 27406985, DiPippo et ál. 2014, PMID: 25327986, Serganova et ál. 2016, PMID: 28345023). Además, se están investigando conjugados de radionúclidos específicos de PSMA para la obtención de imágenes y el tratamiento del cáncer de próstata (por ejemplo, Hofman et ál., 2018 PMID: 29752180).

Anticuerpos de cadena pesada

- 10 **[0004]** En un anticuerpo IgG convencional, la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera se debe en parte a una interacción hidrofóbica entre la región constante de la cadena ligera y el dominio constante CH1 de la cadena pesada. Hay residuos adicionales en las regiones marco 2 (FR2) y marco 4 (FR4) de la cadena pesada que también contribuyen a esta interacción hidrofóbica entre las cadenas pesada y ligera.
- 15 **[0005]** Sin embargo, se sabe que los sueros de camélidos (el suborden Tylopoda que incluye camellos, dromedarios y llamas) contienen un tipo principal de anticuerpos compuestos únicamente por cadenas H emparejadas (anticuerpos únicamente de cadena pesada o UniAbs™). Los UniAbs™ de *Camelidae* (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanaco*, *Lama alpaca* y *Lama vicugna*) tienen una estructura única que consta de un solo dominio variable (VHH), una región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3), muy homólogos con respecto a los dominios CH2 y CH3 de los anticuerpos clásicos. Estos UniAbs™ carecen del primer dominio de la región constante (CH1) que está presente en el genoma, pero se empalman durante el procesamiento del ARNm. La ausencia del dominio CH1 explica la ausencia de la cadena ligera en los UniAbs™, dado que este dominio es el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera. Tal UniAbs™ evolucionó naturalmente para
- 20 conferir especificidad de unión al antígeno y alta afinidad por tres CDR de anticuerpos convencionales o fragmentos de los mismos (Muyldermans, 2001; *J Biotechnol* 74:277–302; Revets et ál., 2005; *Expert Opin Biol Ther* 5:111–124). Los peces cartilaginosos, por ejemplo, los tiburones, también han desarrollado un tipo distintivo de inmunoglobulina, denominado IgNAR, que carece de las cadenas polipeptídicas ligeras y está compuesto completamente por cadenas pesadas. Las moléculas de IgNAR
- 25 pueden manipularse mediante ingeniería molecular para producir el dominio variable de un polipéptido de cadena pesada única (vNAR) (Nuttall et ál. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et ál. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et ál., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).
- 30

[0006] La capacidad de los anticuerpos solo de cadena pesada y desprovistos de cadena ligera de unirse al antígeno se estableció en la década de 1960 (Jaton *et ál.* (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195). La inmunoglobulina de cadena pesada separada físicamente de la cadena ligera retuvo el 80% de la actividad de unión al antígeno en relación con el anticuerpo tetramérico. Sitia *et ál.* (1990) *Cell*, 60, 781-790 demostró que la eliminación del dominio CH1 de un gen μ de ratón reordenado da como resultado la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada, desprovisto de cadena ligera, en cultivo de células de mamífero. Los anticuerpos producidos conservaron la especificidad de unión a VH y las funciones efectoras.

[0007] Pueden generarse anticuerpos de cadena pesada con una alta especificidad y afinidad contra una variedad de antígenos mediante inmunización (van der Linden, R. H., *et ál.* *Biochim. Biophys. Acta*. 1431, 37-46 (1999)) y la parte de VHH se puede clonar y expresar fácilmente en levadura (Frenken, L. G. J., *et ál.* *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Sus niveles de expresión, solubilidad y estabilidad son significativamente más altos que los de los fragmentos F(ab) o Fv clásicos (Ghahroudi, M. A. *et ál.* *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)).

[0008] ratones en los que el locus de la cadena ligera (L) λ (lambda) y/o los loci de la cadena L λ y κ (kappa) se han silenciado funcionalmente y los anticuerpos producidos por dichos ratones se describen en las patentes de estadounidenses 7,541,513 y 8,367,888. Se ha informado sobre la producción recombinante de anticuerpos solo de cadena pesada en ratones y ratas, por ejemplo, en WO2006008548, la publicación de solicitud estadounidense n.º 20100122358, Nguyen *et ál.*, 2003, *Immunology*; 109 (1), 93-101; Brüggemann *et ál.*, *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90; y Zou *et ál.*, 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283. La producción de ratas con inactivación mediante microinyecciones embrionarias de nucleasas con dedos de cinc se describe en Geurts *et ál.*, 2009, *Science*, 325 (5939):433. Los anticuerpos solubles únicamente de cadena pesada y los roedores transgénicos que comprenden un locus de cadena pesada heterólogo que producen dichos anticuerpos se describen en las patentes estadounidenses n.º 8,883,150 y 9,365,655. Las estructuras CAR-T que comprenden anticuerpos de dominio único como dominio de unión (direccionamiento) se describen, por ejemplo, en Iri-Sofla *et ál.*, 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641 y Jamnani *et ál.*, 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378-386.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[0009] Los aspectos de la invención se refieren a anticuerpos de cadena pesada, que incluyen, de modo no taxativo, UniAbsTM, con afinidad de unión a PSMA. Otros aspectos de la invención se refieren a

métodos para preparar tales anticuerpos, composiciones que comprenden tales anticuerpos y su uso en el tratamiento de trastornos que se caracterizan por la expresión de PSMA.

[0010] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 10; y/o (b) una CDR2 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 a 17; y/o (c) una CDR3 que tiene dos o menos sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18 a 23. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una segunda región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 10; y/o (b) una CDR2 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 a 17; y/o (c) una CDR3 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18 a 23. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en ausencia de una secuencia CH1.

[0011] En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 10; y/o (b) una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 a 17; y/o (c) una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 a 23.

[0012] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una segunda región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 10, y/o (b) una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 a 17, y/o (c) una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 a 23.

[0013] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 10, y (b) una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 a 17, y (c) una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 a 23. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 10, y (b) una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 a 17, y (c) una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 a 23.

[0014] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18; o (b) una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 24 a 58. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24 a 58. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 38.

[0015] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de la fórmula:

G G S I S S X₁ X₂ Y X₃ (SEQ ID NO: 67)

donde X₁ es S o N; X₂ es S o N; y X₃ es Y o F; y (b) una secuencia de CDR2 de la fórmula:

X₄ X₅ X₆ S G X₇ T (SEQ ID NO: 68)

donde X₄ es I o V; X₅ es D o Y; X₆ es Y o D; y X₇ es Y o S; y (c) una secuencia de CDR3 de la fórmula:

A R H K A A T A D F D Y (SEQ ID NO: 69), en un formato monovalente o bivalente.

[0016] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de la fórmula:

G F X₁ F X₂ X₃ Y G (SEQ ID NO: 70)

donde X₁ es S, I o T; X₂ es S, T, R o I; y X₃ es R o S; y (b) una secuencia de CDR2 de la fórmula:

I X₄ Y D G S N X₅ (SEQ ID NO: 71)

donde X₄ es W o S; y X₅ es R o K; y (c) una secuencia de CDR3 de la fórmula:

A R E P R X₆ G Y Y Y X₇ X₈ S G Y X₉ S L D Y (SEQ ID NO: 72)

donde X_6 es I o V; X_7 es E o D; X_8 es S o T; y X_9 es Y o D, en un formato monovalente o bivalente.

[0017] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de la fórmula:

G G S I S S X_1 X_2 Y X_3 (SEQ ID NO: 67)

donde X_1 es S o N; X_2 es S o N; y X_3 es Y o F; y (b) una secuencia de CDR2 de la fórmula:

X_4 X_5 X_6 S G X_7 T (SEQ ID NO: 68)

donde X_4 es I o V; X_5 es D o Y; X_6 es Y o D; y X_7 es Y o S; y (c) una secuencia de CDR3 de la fórmula:

A R H K A A T A D F D Y (SEQ ID NO: 69), y una segunda región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de la fórmula:

G F X_1 F X_2 X_3 Y G (SEQ ID NO: 70)

donde X_1 es S, I o T; X_2 es S, T, R o I; y X_3 es R o S; y (b) una secuencia de CDR2 de la fórmula:

I X_4 Y D G S N X_5 (SEQ ID NO: 71)

donde X_4 es W o S; y X_5 es R o K; y (c) una secuencia de CDR3 de la fórmula:

A R E P R X_6 G Y Y Y X_7 X_8 S G Y X_9 S L D Y (SEQ ID NO: 72)

donde X_6 es I o V; X_7 es E o D; X_8 es S o T; y X_9 es Y o D.

[0018] En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una primera y una segunda región variable de cadena pesada, donde la primera región variable de cadena pesada está ubicada más cerca del extremo N con respecto a la segunda región variable de cadena pesada. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada está ubicada más cerca del extremo C con respecto a la segunda región variable de cadena pesada.

[0019] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco de VH humano, donde las secuencias de CDR comprenden una secuencia que tiene dos o menos sustituciones en una secuencia de CDR seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-23.

5 **[0020]** En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco VH humano, donde las secuencias de CDR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-23.

[0021] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18 en un marco VH humano.

10 **[0022]** En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18, en un marco VH humano, en una configuración monovalente o bivalente.

15 **[0023]** En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20 en un marco VH humano.

[0024] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20, en un marco VH humano, en una configuración monovalente o bivalente.

[0025] En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a PSMA comprende: una primera región variable de cadena pesada que comprende: una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18; y una segunda región variable de cadena pesada que comprende: una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20, en un marco VH humano. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una primera región variable de cadena pesada que está ubicada más cerca del extremo N con respecto a la segunda región variable de cadena pesada. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada está ubicada más cerca del extremo C con respecto a la segunda región variable de cadena pesada.

30 **[0026]** En algunas modalidades, un anticuerpo es monoespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene afinidad de unión a una proteína CD3 y una proteína PSMA. En

algunas modalidades, un anticuerpo tiene afinidad de unión a dos epítomos diferentes en la misma proteína PSMA. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene afinidad de unión a una célula efectora. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene afinidad de unión a un antígeno de linfocitos T. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene afinidad de unión a CD3. En algunas modalidades, un anticuerpo está en un formato CAR-T.

[0027] Los aspectos de la invención incluyen un anticuerpo biespecífico que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que tiene afinidad de unión a CD3, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 60 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano; (ii) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 63 y secuencias de CDR3 de la SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano; y (iii) un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18, en un marco VH humano.

[0028] Aspectos de la invención incluyen un anticuerpo biespecífico que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que tiene afinidad de unión a CD3, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 60 y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 63 y secuencias de CDR3 de la SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano; y (iii) un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18, en un marco VH humano, en una configuración monovalente o bivalente.

[0029] Aspectos de la invención incluyen un anticuerpo biespecífico que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que tiene afinidad de unión a CD3, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 60 y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 63 y secuencias de CDR3 de la SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano; y (iii) un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20, en un marco VH humano.

[0030] Aspectos de la invención incluyen un anticuerpo biespecífico que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que tiene afinidad de unión a CD3, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 60 y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 63 y secuencias de CDR3 de la SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano; y (iii) un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15, y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20, en un marco VH humano, en una configuración monovalente o bivalente.

[0031] Los aspectos de la invención incluyen un anticuerpo multiespecífico que comprende: (i) una región variable de cadena pesada que tiene afinidad de unión a CD3, que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 60 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano; (ii) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 63 y secuencias de CDR3 de la SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano; y (iii) un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA, donde el dominio de unión al antígeno comprende una primera y segunda región de unión al antígeno, en una configuración bivalente, donde: la primera región de unión al antígeno comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 18, en un marco VH humano; y la segunda región de unión al antígeno comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20, en un marco VH humano. En determinadas modalidades, la primera región de unión al antígeno está ubicada más cerca del extremo N en relación con la segunda región de unión al antígeno. En determinadas otras modalidades, la primera región de unión al antígeno está ubicada más cerca del extremo C en relación con la segunda región de unión al antígeno.

[0032] Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos donde la primera y segunda regiones de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA están conectadas por un enlazador polipeptídico. En algunas modalidades, el enlazador polipeptídico es un enlazador GS. En algunas modalidades, el enlazador GS consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 73 o la SEQ ID NO: 74. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA es monoparatópico e induce menos producción de citocinas en comparación con un dominio de unión al antígeno biparatópico. En algunas modalidades,

el dominio de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA es monoparatópico y expande los linfocitos T CD8+ en mayor medida que un dominio de unión al antígeno biparatópico.

[0033] En algunas modalidades, un anticuerpo es biparatópico y tiene mayor afinidad por PSMA en comparación con un anticuerpo anti-PSMA monoparatópico. En algunas modalidades, un anticuerpo es biparatópico y tiene una función efectora aumentada en comparación con un anticuerpo anti-PSMA monoparatópico.

[0034] Los aspectos de la invención se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo descrito en la presente.

[0035] Los aspectos de la invención se refieren a métodos para el tratamiento de un trastorno B caracterizado por la expresión de PSMA que comprenden administrar a un sujeto con dicho trastorno un anticuerpo o una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En determinados otros aspectos, la invención se refiere a usos de un anticuerpo descrito en la presente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno caracterizado por la expresión de PSMA. En otros aspectos adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo descrito en la presente para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la expresión de PSMA. En determinados otros aspectos, la invención se refiere a métodos de tratamiento, que comprenden administrarle a un individuo que lo necesite una dosis eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica descrita en la presente. Con respecto a estos aspectos, y en algunas modalidades, el trastorno es cáncer de próstata.

[0036] Aspectos de la invención se refieren a polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito la presente, vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células que comprenden dichos vectores.

[0037] Aspectos de la invención se refieren a métodos para producir un anticuerpo descrito en la presente, que comprenden cultivar una célula descrita en la presente en condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo de la célula.

[0038] Aspectos de la invención se refieren a métodos para preparar un anticuerpo descrito en la presente, que comprenden inmunizar un animal UniRat con una proteína PSMA e identificar secuencias de anticuerpos que se unen a PSMA.

[0039] Estos y otros aspectos se explicarán con más detalle en el resto de la divulgación, incluidos los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0040] La FIG. 1, paneles A-B, proporciona una serie de gráficos que muestran el título en suero en función de la dilución.

[0041] La FIG. 2, el panel A es un gráfico que muestra la unión celular al PSMA humano.

[0042] La FIG. 2, el panel B es un gráfico que muestra la unión celular al PSMA de mono cynomolgus.

[0043] La FIG. 3 es un gráfico que muestra la competencia de unión entre dos familias de anticuerpos de acuerdo con una modalidad de la invención.

5 **[0044]** La FIG. 4, panel A, es un gráfico de Scatchard que muestra la afinidad de unión al PSMA expresado en la superficie celular de un anticuerpo biespecífico que tiene afinidad de unión a CD3 y PSMA, donde el brazo de PSMA es monoparatópico y monovalente de acuerdo con una modalidad de la invención.

10 **[0045]** La FIG. 4, panel B, es un gráfico de Scatchard que muestra la afinidad de unión al PSMA expresado en la superficie celular de un anticuerpo biespecífico que tiene afinidad de unión a CD3 y PSMA, donde el brazo de PSMA es biparatópico de acuerdo con una modalidad de la invención.

[0046] La FIG. 5, paneles A-C, proporciona ilustraciones esquemáticas de: un anticuerpo anti-PSMA monoespecífico anti-CD3 x monovalente (panel A); un anticuerpo anti-PSMA bivalente anti-CD3 x monoespecífico (panel B); y un anticuerpo anti-PSMA biparatópico anti-CD3 x bivalente (panel C) de acuerdo con modalidades de la invención.

15 **[0047]** La FIG. 6 es un gráfico que representa la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA mediante el uso de linfocitos T preactivados.

[0048] La FIG. 7 es un gráfico que representa la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA utilizando linfocitos T no estimuladas.

20 **[0049]** La FIG. 8 es un gráfico que representa el porcentaje de lisis específica de células DU145 negativas a PSMA en función de la concentración de anticuerpos multiespecíficos en presencia de linfocitos T preactivados.

[0050] La FIG. 9 es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos biespecíficos de PSMA x CD3 a células positivas y negativas a PSMA.

[0051] La FIG. 10 es un gráfico que muestra la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA.

25 **[0052]** La FIG. 11, panel A, es un gráfico que representa la proliferación de linfocitos T en función de la concentración de anticuerpos.

[0053] La FIG. 11, panel B, es un gráfico que representa la proliferación de linfocitos T en función de la concentración de anticuerpos.

30 **[0054]** La FIG. 11, panel C es un gráfico que representa la relación de CD8 con respecto a CD4 de linfocitos T proliferados.

[0055] La FIG. 11, panel D, es un gráfico que representa la relación de CD8 a CD4 de linfocitos T proliferadas.

[0056] La FIG. 12, panel A, es un gráfico que representa la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA en función de la concentración de anticuerpos.

[0057] La FIG. 12, panel B, es un gráfico que representa la liberación de citocinas (IFN γ) en función de la concentración de anticuerpos.

5 **[0058]** La FIG. 12, panel C, es un gráfico que representa la liberación de citocinas (IL-2) en función de la concentración de anticuerpos.

[0059] La FIG. 13 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento tumoral 22Rv1 en un modelo de xenoinjerto tumoral.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODALIDADES PREFERIDAS

[0060] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et ál., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et ál., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et ál., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et ál., 2001); Harlow, Lane y Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

25 **[0061]** Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta de una décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente indique otra cosa, entre el límite superior y el inferior de ese intervalo y cualquier otro valor intermedio o establecido en ese intervalo establecido, se encuentra comprendido dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyan cualquier límite o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

30 **[0062]** A menos que se indique lo contrario, los residuos de anticuerpos en este documento se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (por ejemplo, Kabat et ál., Sequences of Immunological Interest. 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0063] En la siguiente descripción se presentan numerosos detalles específicos con el fin de proveer una comprensión más cabal de la presente invención. Sin embargo, será evidente para el experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito las características conocidas y los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica con el fin de evitar oscurecer la invención.

[0064] Todas las referencias mencionadas a lo largo de la descripción, incluidas solicitudes y publicaciones de patentes, se incorporan en la presente en su totalidad a modo de referencia.

I. Definiciones

[0065] “Comprende” significa que los elementos mencionados son necesarios en la composición/el método/el kit, pero que pueden incluirse otros elementos para formar la composición/el método/el kit, etc. dentro del alcance de la reivindicación.

[0066] “Consiste esencialmente en” implica una limitación del alcance de la composición o el método que se describe a los materiales o las etapas que se especifican que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la presente invención.

[0067] “Consiste en” implica la exclusión de la composición, el método o el kit de cualquier elemento, etapa o ingrediente que no se especifique en la reivindicación.

[0068] Los residuos de anticuerpo en la presente se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración EU. El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et ál., Sequences of Immunological Interest. 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)). Generalmente se utiliza el “sistema de numeración EU” o “índice EU” cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat et ál., supra). El “índice EU como se establece en Kabat” se refiere a la enumeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración del residuo según el sistema de numeración Kabat. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración del residuo según el sistema de numeración EU.

[0069] Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas, comprenden convencionalmente al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio del extremo amino de las cadenas pesada y ligera es de secuencia variable, por lo que se denomina comúnmente dominio de región variable o dominio pesado variable (VH) o ligero variable (VL). Los dos dominios se asocian

convencionalmente para formar una región de unión específica, aunque, como se indicará en el presente, la unión específica también se puede obtener con secuencias variables solo de cadena pesada, y en la técnica se conocen y utilizan una variedad de configuraciones no naturales de anticuerpos.

[0070] Un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno “funcional” o “biológicamente activo” (incluidos los anticuerpos solo de cadena pesada y las moléculas similares a anticuerpos de tres cadenas (TCA) multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) descritos en la presente) tienen la capacidad de ejercer una o más de sus actividades naturales en eventos estructurales, regulatorios, bioquímicos o biofísicos. Por ejemplo, un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, puede tener la capacidad de unirse específicamente a un antígeno y la unión puede, a su vez, provocar o alterar un evento celular o molecular como la transducción de señales o la actividad enzimática. Un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, también puede bloquear la activación del ligando de un receptor o actuar como agonista o antagonista. La capacidad de un anticuerpo u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, para ejercer una o más de sus actividades naturales depende de varios factores, incluido el plegamiento y ensamblaje adecuados de las cadenas polipeptídicas.

[0071] El término “anticuerpo” en la presente se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, monómeros, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos solo de cadena pesada, anticuerpos de tres cadenas, TCA, Fv de cadena simple (scFv), nanocuerpos, etc., y también incluye fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Miller et ál. (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

[0072] El término “anticuerpo” puede hacer referencia a una cadena pesada de longitud completa, una cadena ligera de longitud completa, una molécula de inmunoglobulina intacta; o una parte inmunológicamente activa de cualquiera de estos polipéptidos, es decir, un polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno que se una con inmunoespecificidad a un antígeno de un objetivo de interés o parte suya, donde esas objetivos incluyen, de modo no taxativo, una o más células cancerosas que produzcan anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina descrita en este documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina, incluidas las subclases de ingeniería con porciones de Fc alteradas que proporcionan una actividad de células efectoras reducida o mejorada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos en cuestión pueden ser cadenas ligeras kappa (Vkappa) o cadenas ligeras lambda (Vlambda). Las

inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, la inmunoglobulina es de origen ampliamente humano.

[0073] La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden realizarse a través del método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et ál.*, (1975) *Nature* 256:495, y se pueden realizar también a través de métodos de producción de proteínas recombinantes (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,816,567).

[0074] El término “variable”, tal como se usa en relación con anticuerpos, hace referencia al hecho de que determinadas partes de los dominios variables del anticuerpo difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las partes más ampliamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprende cuatro FR, que en general adoptan una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen cercanas entre sí mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et ál.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0075] El término “región hipervariable” cuando se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, los residuos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de

cadena pesada; Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un “bucle hipervariable”, residuos 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). En algunas modalidades, “CDR” significa una región determinante de complementariedad de un anticuerpo como se define en Lefranc, MP et ál., IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Los residuos de “región marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de región hipervariable/CDR tal como se definen en la presente.

[0076] En este documento, se muestran ejemplos de designaciones de CDR; sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que se utilizan comúnmente varias definiciones de las CDR, incluida la definición de Kabat (véase “Zhao et ál. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions”. *Mol Immunol.* 2010; 47:694–700), que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más utilizada. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural (Chothia et ál. “Conformations of immunoglobulin hypervariable regions”. *Nature.* 1989; 342:877–883). Las definiciones de CDR alternativas de interés incluyen, de modo no taxativo, aquellas descritas por Honegger, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool”. *J Mol Biol.* 2001;309:657–670; Ofran et ál. “Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes”. *J Immunol.* 2008;181:6230–6235; Almagro “Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires”. *J Mol Recognit.* 2004;17:132–143; y Padlan et ál. “Identification of specificity-determining residues in antibodies”. *Faseb J.* 1995;9:133–139, cada una de los cuales se incorpora específicamente mediante referencia.

[0077] Los términos “anticuerpo solo de cadena pesada” y “anticuerpo de cadena pesada” se usan indistintamente en la presente y se refieren, en el sentido más amplio, a anticuerpos, o más o más porciones de un anticuerpo, por ejemplo, uno o más brazos de un anticuerpo, que carece de la cadena ligera de un anticuerpo convencional. Los términos incluyen específicamente, sin limitación, anticuerpos homodiméricos que comprenden el dominio de unión al antígeno VH y los dominios constantes CH2 y CH3, en ausencia del dominio CH1; variantes funcionales (de unión a antígeno) de dichos anticuerpos, variantes de VH solubles, Ig-NAR que comprende un homodímero de un dominio variable (V-NAR) y cinco dominios constantes de tipo C (C-NAR) y fragmentos funcionales de los mismos; y anticuerpos solubles de dominio único (sUniDabs™). En una modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno de región variable compuesto por marco 1, CDR1, marco

2, CDR2, marco 3, CDR3 y marco 4. En otra modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y dominios CH2 y CH3. En otra modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH2. En una modalidad adicional, un anticuerpo solo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH3. En la presente, también se encuentran incluidos anticuerpos únicamente de cadena pesada en los que el dominio CH2 y/o CH3 se encuentran truncos. En una modalidad adicional, una cadena pesada está compuesta por un dominio de unión al antígeno, y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4) pero sin región bisagra. El anticuerpo solo de cadena pesada puede estar en forma de un dímero, en el que dos cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro o, de lo contrario, unidas covalente o no covalentemente entre sí. El anticuerpo únicamente de cadena pesada puede pertenecer a la subclase de IgG, pero también se encuentran incluidos en la presente anticuerpos pertenecientes a otras subclases, tales como las subclases IgM, IgA, IgD e IgE. En una modalidad particular, un anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en particular el subtipo IgG1. En una modalidad, los anticuerpos de solo cadena pesada de la presente se usan como un dominio de unión (de direccionamiento) de un receptor de antígenos quiméricos (CAR). La definición incluye específicamente anticuerpos solo de cadena pesada humanos, producidos por ratas transgénicas de inmunoglobulina humana (UniRatTM), llamados UniAbsTM. Las regiones variables (VH) de UniAbsTM se denominan UniDabsTM y son bloques de construcción versátiles que se pueden vincular a regiones Fc o albúmina sérica para el desarrollo de terapias novedosas con especificidad múltiple, mayor potencia y vida media extendida. Dado que los UniAbsTM homodiméricos carecen de una cadena ligera y, por tanto, de un dominio VL, el antígeno es reconocido por un solo dominio, es decir, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada (VH o VHH).

[0078] Una “cadena de anticuerpo intacta”, tal como se usa en la presente, es aquella que comprende una región variable de longitud completa y una región constante de longitud completa (Fc). Un anticuerpo “convencional” intacto comprende una cadena ligera intacta y una cadena pesada intacta, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, bisagra, CH2 y CH3 para la IgG secretada. Otros isotipos, tales como IgM o IgA, pueden tener dominios CH diferentes. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de una secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de una secuencia de nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de estos. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que hacen referencia a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región constante Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones

efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento, la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis y la regulación negativa de los receptores de la superficie celular. Las variantes de región constante incluyen aquellas que alteran el perfil efector, la unión a receptores de Fc, y similares.

5 **[0079]** Según la secuencia de aminoácidos del Fc (dominio constante) de las cadenas pesadas, los anticuerpos y diversas proteínas de unión a antígenos se pueden asignar como diferentes clases. Existen cinco clases principales de regiones Fc de cadena pesada: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de Fc que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se
10 denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Las formas de Ig incluyen modificaciones de bisagra o formas sin bisagra (Roux et ál., (1998) J. Immunol. 161:4083-4090; Lund et ál., (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos, denominados
15 κ (kappa) y λ (lambda), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Los anticuerpos de acuerdo con las modalidades de la invención pueden comprender secuencias de cadena ligera kappa o secuencias de cadena ligera lambda.

[0080] Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia natural. Los ejemplos no limitantes de funciones efectoras incluyen unión de C1q, CDC, unión al receptor de Fc, ADCC, ADCP, regulación en descenso de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor
20 de linfocitos B), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc interactúe con un receptor, por ejemplo, los receptores de Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB1, Fc γ RIIB2, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB y el receptor de FcRn de baja afinidad, y esto puede evaluarse mediante el uso de varios ensayos conocidos en la técnica. Un Fc “muerto” o “silenciado” es uno mutado para retener la actividad con respecto a, por
25 ejemplo, extensión de la vida media en suero, pero que no activa un receptor de Fc de gran afinidad o que tiene una menor afinidad con respecto a un receptor de Fc.

[0081] Una “región Fc de secuencia natural” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas se secuencia nativa incluyen, por ejemplo, una región Fc de IgG1 humana se secuencia nativa
30 (alotipos A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana se secuencia nativa, y la región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como también variantes de origen natural de estas.

[0082] Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en la presente memoria, preferiblemente, poseerá al menos alrededor de 80 % de homología con respecto a una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original y, lo más preferiblemente, al menos alrededor de 90 % de homología con respecto a esta, más preferiblemente, al menos alrededor de 95 % de homología con respecto a esta.

[0083] Las secuencias de Fc variante pueden incluir tres secuencias de aminoácidos en la región CH2 para reducir la unión a FcγRI en las posiciones 234, 235 y 237 según el índice EU (véase Duncan et ál., (1988) Nature 332:563). Dos sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a C1q del complemento en las posiciones 330 y 331 según el índice EU reducen la fijación del complemento (véase Tao et ál., J. Exp. Med. 178:661 (1993) y Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). La sustitución en residuos de IgG1 o IgG2 humana en las posiciones 233-236 y residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reduce en gran medida la ADCC y la CDC (véase, por ejemplo, Armor KL. et ál., 1999 Eur J Immunol. 29 (8): 2613-24; y Shields RL. et ál., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). La secuencia de aminoácidos de Fc de IgG4 humana (UniProtKB No. P01861) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 76. La IgG1 silenciada se describe, por ejemplo, en Boesch, A.W., et ál., “Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions”. MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

[0084] Otras variantes de Fc son posibles, lo cual incluye, de modo no taxativo, una en la que se elimine una región capaz de formar un enlace disulfuro, o en la que se eliminen determinados residuos de aminoácidos en el extremo N de un Fc natural o se agregue un residuo de metionina a este. Por lo tanto, en algunas modalidades, una o más partes de Fc del anticuerpo pueden comprender una o más mutaciones en la región bisagra para eliminar los enlaces disulfuro. En aun otra modalidad, la región bisagra de una Fc puede retirarse por completo. En incluso otra modalidad, un anticuerpo puede comprender una variante de Fc.

[0085] Además, se puede construir una variante de Fc para retirar o reducir sustancialmente las funciones efectoras mediante la sustitución (mutación), eliminación o adición de residuos de aminoácidos para efectuar la unión al complemento o la unión al receptor de Fc. A modo de ejemplo no

taxativo, se puede producir una eliminación en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q. Las técnicas para preparar dichos derivados de secuencias del fragmento Fc de inmunoglobulina se describen en las publicaciones de patentes internacionales n.º WO 97/34631 y WO 96/32478. Además, el dominio Fc puede modificarse mediante fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

[0086] En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W, que puede denominarse opcionalmente en la presente como una secuencia de botón CH3 de IgG4. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, una mutación L368A, y una mutación Y407V, que puede denominarse opcionalmente en la presente como una secuencia de botón CH3 de IgG4. Las mutaciones CH3 de IgG4 descritas en la presente se pueden utilizar de cualquier manera adecuada para colocar un “botón” en una primera región constante de cadena pesada de un primer monómero en un dímero de anticuerpo, y un “ojal” en una segunda región constante de cadena pesada de un segundo monómero en un dímero de anticuerpo, lo que facilita el apareamiento adecuado (heterodimerización) del par deseado de subunidades polipeptídicas de cadena pesada en el anticuerpo.

[0087] En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una subunidad polipeptídica de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A y una mutación T366W (botón). En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una subunidad polipeptídica de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A, una mutación T366S, una mutación L368A, y una mutación Y407V (ojal).

[0088] La expresión “anticuerpo que comprende una región Fc” hace referencia a un anticuerpo que comprende una región Fc. Es posible eliminar la lisina del extremo C (residuo 447 conforme al sistema de numeración EU) de la región Fc, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante la modificación recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, un anticuerpo con una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con o sin K447.

[0089] Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de solo cadena pesada en una configuración monovalente o bivalente. Como se usa en la presente, el término “configuración monovalente” como se usa en referencia a un dominio de región variable de cadena pesada solamente significa que solo está presente un dominio de región variable de cadena pesada solamente, que tiene un solo sitio de unión (véase la FIG. 5, Panel A, brazo derecho del anticuerpo). En

contraste, el término “configuración bivalente” como se usa en referencia a un dominio de región variable de cadena pesada solamente significa que dos dominios de región variable de cadena pesada solamente están presentes (donde cada uno tiene un solo sitio de unión), y están conectados por una secuencia enlazadora (véase la FIG. 5, Paneles B y C, brazos derechos de anticuerpos). Los ejemplos no taxativos de secuencias enlazadoras se tratan adicionalmente en la presente e incluyen, de modo no taxativo, secuencias enlazadoras GS de varias longitudes. Cuando una región variable de solo cadena pesada está en una configuración bivalente, cada uno de los dos dominios de región variable de solo cadena pesada puede tener afinidad de unión con el mismo antígeno o a diferentes antígenos (por ejemplo, a diferentes epítopos de la misma proteína; a dos proteínas diferentes, etc.). Sin embargo, a menos que se indique específicamente lo contrario, se entiende que una región variable de solo cadena pesada indicada como en una “configuración bivalente” contiene dos dominios de región variable solo de cadena pesada idénticos, conectados por una secuencia enlazadora, donde cada uno de los dos dominios de la región variable de solo cadena pesada tienen afinidad de unión con el mismo antígeno objetivo.

[0090] Los aspectos de la invención incluyen anticuerpos que tienen configuraciones multiespecíficas, que incluyen, sin limitación, biespecíficos, triespecíficos, etc. Se conocen y utilizan una gran variedad de métodos y configuraciones de proteínas en anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAB), anticuerpos triespecíficos, etc.

[0091] Se han desarrollado diversos métodos para la producción de anticuerpos artificiales multivalentes mediante la fusión recombinante de dominios variables de dos o más anticuerpos. En algunas modalidades, un primer y segundo dominio de unión al antígeno en un polipéptido están enlazados por un enlazador polipeptídico. Un ejemplo no taxativo de dicho enlace polipeptídico es un enlazador GS, que tiene una secuencia de aminoácidos de cuatro residuos de glicina, seguida de un residuo de serina y donde la secuencia se repite n veces donde n es un número entero que varía entre 1 y alrededor de 10, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 (SEQ ID NO: 94). Los ejemplos no taxativos de dichos enlazadores incluyen GGGGS (SEQ ID NO: 73) (n=1) y GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74) (n=2). También pueden usarse otros enlazadores adecuados, y se describen, por ejemplo, en Chen et ál., Adv Drug Deliv Rev. 2013, 15 de octubre; 65 (10): 1357-69, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0092] El término “molécula similar a un anticuerpo de tres cadenas” o “TCA” se usa en este documento para referirse a moléculas similares a anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente o consisten en tres subunidades polipeptídicas, dos de las cuales comprenden, consisten esencialmente o consisten en una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal, o fragmentos funcionales de unión a antígeno de tales cadenas de anticuerpo, que comprenden una región de unión

a antígeno y al menos un dominio CH. Este par cadena pesada/cadena ligera tiene especificidad de unión con respecto a un primer antígeno. La tercera subunidad polipeptídica comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una parte Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en ausencia de un dominio CH1, y uno o más dominios de unión al antígeno (por ejemplo, dos dominios de unión al antígeno) que se une a un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno, donde dicho dominio de unión se deriva de o tiene identidad de secuencia con la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. Partes de esa región variable pueden ser codificadas por segmentos génicos V_H y/o V_L , segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L . La región variable puede ser codificada por segmentos génicos V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , o V_LJ_L reorganizados.

[0093] Un compuesto de unión a TCA utiliza un “anticuerpo solo de cadena pesada”, “anticuerpo de cadena pesada” o “polipéptido de cadena pesada” que, según se usa en la presente, significa un anticuerpo de cadena única que comprende las regiones constantes de cadena pesada CH2 y/o CH3 y/o CH4, pero no contiene un dominio CH1. En una modalidad, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y los dominios CH2 y CH3. En otra modalidad, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH2. En una modalidad adicional, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH3. En la presente, también se encuentran incluidos anticuerpos de cadena pesada en los que el dominio CH2 y/o CH3 se encuentran truncos. En una modalidad adicional, la cadena pesada está compuesta por un dominio de unión a antígeno y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4) pero sin región bisagra. El anticuerpo de solo cadena pesada puede estar en forma de un dímero, en el que dos cadenas pesadas están unidas por disulfuro de cualquier otra manera covalentemente o no covalentemente acopladas entre sí y, opcionalmente, incluyen una interfaz asimétrica entre uno o más de los dominios CH para facilitar el apareamiento adecuado entre cadenas polipeptídicas. El anticuerpo de cadena pesada puede pertenecer a la subclase de IgG, pero los anticuerpos que pertenecen a otras subclases, tales como la subclase IgM, IgA, IgD e IgE, también se incluyen en la presente. En una modalidad particular, el anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en particular el subtipo IgG1 o el subtipo IgG4. Se describen ejemplos no taxativos de un compuesto de unión a TCA, por ejemplo, en los documentos WO2017/223111 y WO2018/052503, cuyas descripciones se incorporan en la presente mediante esta referencia en su totalidad.

[0094] Los anticuerpos de cadena pesada constituyen alrededor de una cuarta parte de los anticuerpos de IgG producidos por los camélidos, por ejemplo, camellos y llamas (Hamers-Casterman C., et ál. Nature. 363, 446-448 (1993)). Estos anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas, pero no tienen cadenas ligeras. Como consecuencia, la parte de unión al antígeno variable se denomina dominio VHH y representa el sitio de unión al antígeno intacto más pequeño de origen natural, con una longitud de solo 120 aminoácidos (Desmyter, A., et ál. J. Biol. Chem. 276, 26285-26290 (2001)). Se pueden generar anticuerpos de cadena pesada con una especificidad y afinidad altas contra una variedad de antígenos a través de la inmunización (van der Linden, R. H., et ál. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999)) y la parte de VHH puede clonarse fácilmente y expresarse en levadura (Frenken, L. G. J., et ál. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000)). Sus niveles de expresión, solubilidad y estabilidad son significativamente más altos que los de los fragmentos F(ab) o Fv clásicos (Ghahroudi, M. A. et ál. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997)). También se ha demostrado que los tiburones tienen un único dominio similar a VH en sus anticuerpos, denominado VNAR. (Nuttall et ál. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et ál. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004); Dooley et ál., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)).

[0095] El término “PSMA”, como se usa en la presente, se refiere a una proteína transmembrana de tipo II que tiene actividad de depeptidasa ácida N-acetilada-alfa-unida, folato hidrolasa y dipeptidil-peptidasa. El término “PSMA” incluye una proteína PSMA de cualquier especie animal humana y no humana, y específicamente incluye PSMA humano, así como PSMA de mamíferos no humanos.

[0096] El término “PSMA humano”, como se usa en la presente, incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del PSMA humano (UniProt Q04609), independientemente de su fuente o modo de preparación. Por tanto, “PSMA humano” incluye PSMA humano expresado naturalmente por células y PSMA expresado en células transfectadas con el gen PSMA humano.

[0097] Los términos “anticuerpo anti-PSMA de cadena pesada solamente”, “anticuerpo PSMA de cadena pesada solamente”, “anticuerpo anti-PSMA de cadena pesada” y “anticuerpo PSMA de cadena pesada” se usan en la presente indistintamente para referirse a un anticuerpo solo de cadena pesada como se definió anteriormente, que se une inmuno específicamente a PSMA, incluido PSMA humano, como se definió anteriormente. La definición incluye, sin limitación, anticuerpos de cadena pesada humanos producidos por animales transgénicos, tales como ratas transgénicas o ratones transgénicos que expresan inmunoglobulina humana, incluidas UniRats™ que produce anticuerpos humanos anti-PSMA UniAb™, como se definió anteriormente.

[0098] “Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia

candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. A los efectos de la presente, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

[0099] Un anticuerpo “aislado” es aquel que se identificó y separó y/o recuperó a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En modalidades preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de un 95 % en peso del anticuerpo, tal como se determina por el método Lowry, y más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) a un punto suficiente como para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o de extremo N terminal, por medio del uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, mediante el uso de azul de Coomassie o, preferiblemente, tintura plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0100] Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos tienen más de una especificidad de unión. El término “multiespecífico” incluye específicamente “biespecífico” y “triespecífico”, así como afinidades de unión específicas independientes de orden superior, tales como especificidad poliepitópica de orden superior, así como anticuerpos tetravalentes y fragmentos de anticuerpos. Los términos “anticuerpo multiespecífico”, “anticuerpo solo de cadena pesada multiespecífico”, “anticuerpo de cadena pesada multiespecífico” y “UniAb™ multiespecífico” se utilizan en la presente en el sentido más amplio y cubren todos los anticuerpos con más de una especificidad de unión. Los anticuerpos anti-PSMA de cadena pesada multiespecíficos de la presente invención incluyen, específicamente, anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a dos o más epítopos no superpuestos en una proteína PSMA, tal como un PSMA humano (es decir,

bivalente y biparatópico). Los anticuerpos anti-PSMA de cadena pesada multiespecíficos de la presente invención también incluyen, específicamente, anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo en una proteína PSMA, como PSMA humano, y a un epítipo en una proteína diferente, como, por ejemplo, una proteína CD3, como el CD3 humano (es decir, bivalente y biparatópico). Los anticuerpos anti-PSMA de cadena pesada multiespecíficos de la presente invención también incluyen, específicamente, anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a dos o más epítopos no superpuestos o parcialmente superpuestos en una proteína PSMA, tal como una proteína PSMA humana, y a un epítipo en una proteína diferente, tal como, por ejemplo, una proteína CD3, tal como la proteína CD3 humana (es decir, trivalente y biparatópico).

[0101] Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoespecíficos, que tienen una especificidad de unión. Los anticuerpos monoespecíficos incluyen, específicamente, anticuerpos que comprenden una única especificidad de unión, así como anticuerpos que comprenden más de una unidad de unión con la misma especificidad de unión. Los términos “anticuerpo monoespecífico”, “anticuerpo solo de cadena pesada monoespecífico”, “anticuerpo de cadena pesada monoespecífico” y “UniAb™ monoespecífico” se utilizan en la presente en el sentido más amplio y abarcan todos los anticuerpos con una especificidad de unión. Los anticuerpos anti-PSMA de cadena pesada monoespecíficos de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo en una proteína PSMA, tal como un PSMA humano (monovalente y monoespecífico). Los anticuerpos anti-PSMA monoespecíficos de cadena pesada de la presente invención también incluyen específicamente anticuerpos que tienen más de una unidad de unión (por ejemplo, anticuerpos multivalentes) que se unen inmuno-específicamente a un epítipo en una proteína PSMA, tal como PSMA humana. Por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico de acuerdo con las modalidades de la invención puede incluir una región variable de cadena pesada que comprende dos dominios de unión a antígeno, donde cada dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en una proteína PSMA (es decir, bivalente y monoespecífico).

[0102] Un “epítipo” es el sitio en la superficie de una molécula de antígeno al que se une una molécula de anticuerpo individual. Generalmente, un antígeno tiene varios o muchos epítopos diferentes y reacciona con muchos anticuerpos diferentes. El término incluye específicamente epítopos lineales y epítopos conformacionales.

[0103] “Mapeo de epítopos” es el proceso de identificar los sitios de unión, o epítopos, de anticuerpos en sus antígenos objetivo. Los epítopos de anticuerpo pueden ser epítopos lineales o epítopos conformacionales. Los epítopos lineales se forman mediante una secuencia continua de

aminoácidos en una proteína. Los epítomos conformacionales se forman a partir de aminoácidos que son discontinuos, pero que se juntan luego de que la proteína se pliega en su estructura tridimensional.

[0104] “Especificidad poliepitópica” hace referencia a la capacidad de unirse de forma específica a dos o más epítomos diferentes en uno o más objetivos iguales o diferentes. Tal como se indicó anteriormente, la presente invención incluye específicamente anticuerpos de cadena pesada anti-PSMA con especificidades poliepitópicas, es decir, anticuerpos de cadena pesada anti-PSMA que se unen a uno o más epítomos no superpuestos en una proteína PSMA, tal como un PSMA humano; y anticuerpos de cadena pesada anti-PSMA que se unen a uno o más epítomos en una proteína PSMA y a un epítomo en una proteína diferente, tal como, por ejemplo, una proteína CD3. El término “epítomos no superpuestos” o “epítomos no competitivos” de un antígeno se define en la presente para significar epítomo(s) que son reconocidos por un miembro de un par de anticuerpos específicos de antígeno, pero no el otro miembro. Los pares de anticuerpos o las regiones de unión al antígeno que se dirigen al mismo antígeno en un anticuerpo multiespecífico reconocen que los epítomos que no se superponen no compiten por unirse a ese antígeno y pueden unirse a ese antígeno simultáneamente.

[0105] Un anticuerpo se une “esencialmente al mismo epítomo” como un anticuerpo de referencia cuando los dos anticuerpos reconocen epítomos superpuestos idénticos o estéricos. Los métodos más ampliamente utilizados y rápidos para la determinación de si dos epítomos se unen a epítomos idénticos o estéricamente superpuestos son ensayos de competencia, que pueden configurarse en una cantidad de diferentes formatos, por ejemplo, mediante el uso de un antígeno etiquetado o anticuerpo etiquetado. Usualmente, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos, y la capacidad que tienen los anticuerpos no etiquetados para bloquear la unión de anticuerpos etiquetados se mide mediante etiquetas radioactivas o enzimáticas.

[0106] El término “valente”, tal como se usa en la presente, se refiere a una cantidad especificada de sitios de unión en una molécula de anticuerpo.

[0107] Un anticuerpo “monovalente” tiene un sitio de unión. Por tanto, un anticuerpo monovalente también es monoespecífico.

[0108] Un anticuerpo “multivalente” tiene dos o más sitios de unión. Por tanto, los términos “bivalente”, “trivalente” y “tetravalente” se refieren a la presencia de dos sitios de unión, tres sitios de unión y cuatro sitios de unión, respectivamente. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es al menos bivalente y puede ser trivalente, tetravalente o de otro modo multivalente. Un anticuerpo bivalente de acuerdo con las modalidades de la invención puede tener dos sitios de unión al mismo epítomo (es decir, bivalente, monoparatópico), o a dos epítomos diferentes (es decir, bivalente, biparatópico).

[0109] Se conocen y usan una gran variedad de métodos y configuraciones de proteínas para la preparación de anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAB), anticuerpos trispecíficos y similares.

[0110] El término “molécula similar a un anticuerpo de tres cadenas” o “TCA” se usa en la presente para referirse a moléculas similares a un anticuerpo que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en tres subunidades polipeptídicas, dos de las cuales comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal, o fragmentos funcionales de unión al antígeno de tales cadenas de anticuerpo, que comprenden una región de unión al antígeno y al menos un dominio CH. Este par cadena pesada/cadena ligera tiene especificidad de unión con respecto a un primer antígeno. La tercera subunidad polipeptídica comprende, consiste esencialmente o consiste en un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una parte Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en ausencia de un dominio CH1, y un dominio de unión a antígeno que se une un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno, donde dicho dominio de unión se deriva de la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo o tiene identidad de secuencia con esta región variable. Partes de esa región variable pueden ser codificadas por segmentos génicos V_H y/o V_L, segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L. La región variable puede ser codificada por segmentos génicos V_HDJ_H, V_LDJ_H, V_HJ_L, o V_LJ_L reorganizados. Una proteína de TCA usa un anticuerpo únicamente de cadena pesada como se definió anteriormente.

[0111] La expresión “receptor de antígenos quiméricos” o “CAR” se usa en la presente en el sentido más amplio para hacer referencia a un receptor modificado genéticamente, que injerta una especificidad de unión deseada (por ejemplo, la región de unión a antígenos de un anticuerpo monoclonal u otro ligando) a los dominios de señalización intracelular y que abarcan la membrana. Normalmente, el receptor se usa para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en un linfocito T para crear receptores de antígenos quiméricos (CAR). (*J Natl Cancer Inst*, 2015; 108(7):dvj439; y Jackson et ál., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016; 13:370–383). Las células CAR-T son linfocitos T que han sido modificados genéticamente para producir un receptor de linfocitos T artificial para su uso en inmunoterapia. En una modalidad, “célula CAR-T” significa un linfocito T terapéutico que expresa un transgén que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos que comprenden como mínimo un dominio extracelular, un dominio transmembrana y al menos un dominio citosólico.

[0112] La expresión “anticuerpo humano”, se usa en la presente para que incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*. El término “anticuerpo

humano” incluye específicamente anticuerpos solo de cadena pesada que tienen secuencias de región variable de cadena pesada humana, producidos por animales transgénicos, tales como ratas o ratones transgénicos, en particular UniAbs™ producidos por UniRats™, como se definió anteriormente.

[0113] Por “anticuerpo quimérico” o “inmunoglobulina quimérica” se entiende una molécula de inmunoglobulina que comprende secuencias de aminoácidos de al menos dos locus de Ig diferentes, por ejemplo, un anticuerpo transgénico que comprende una parte codificada por un locus de Ig humana y una parte codificada por un locus de Ig de rata. Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos transgénicos con regiones Fc no humanas o regiones Fc artificiales, e idiotipos humanos. Dichas inmunoglobulinas se pueden aislar a partir de los animales de la invención que se han modificado genéticamente para producir dichos anticuerpos quiméricos.

[0114] Tal como se utiliza en la presente, la expresión “célula efectora” hace referencia a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en oposición a las fases de activación y cognitivas de una respuesta inmunitaria. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y realizan funciones inmunitarias específicas. En algunas modalidades, una célula efectora tal como una célula asesina natural es capaz de inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Por ejemplo, los monocitos y macrófagos, que expresan el FcR, están involucrados en la destrucción específica de células objetivo y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a células que presentan antígenos. En algunas modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo o célula objetivo.

[0115] Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan receptores como receptores de linfocitos T o FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células asesinas naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, sangre o PBMC tal como se describe en la presente.

[0116] El término “célula inmunitaria” se utiliza en la presente en el sentido más amplio, que incluye, sin limitación, células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (como linfocitos B y linfocitos T, incluidos linfocitos T citolíticos (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos.

[0117] Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complementos (CDC); unión al receptor Fc;

citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de los linfocitos B; BCR), etc.

[0118] “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos de unión en una célula objetivo y posteriormente causan lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente estadounidense n.º 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et ál. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[0119] “Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula de lisar un objetivo en presencia de un complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et ál.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0120] “Afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente, “afinidad de unión” hace referencia a una afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X respecto a su compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante el uso de métodos comunes conocidos en la técnica. Los anticuerpos de baja afinidad por lo general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de gran afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos.

[0121] Tal como se utiliza en la presente, la “K_d” o “valor K_d” hace referencia a una constante de disociación que se determina mediante interferometría de BioLayer, mediante el uso de un instrumento QK384 octeto (Fortebio Inc., Menlo Park, CA) en modo de cinética. Por ejemplo, se cargan sensores Fc

anti-ratón con antígeno fusionado con Fc de ratón y luego se sumergen en pocillos que contienen anticuerpo para medir las tasas de asociación que dependen de la concentración (kon). Las tasas de disociación (koff) de anticuerpos se miden en la etapa final, donde los sensores se sumergen en pocillos que contienen solamente solución amortiguadora. La Kd es la relación de koff/kon. (Por más información véase, Concepcion, J, et ál., *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(8), 791-800, 2009).

[0122] Los términos “tratamiento”, “tratar” y similares se utilizan en la presente generalmente para hacer referencia a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o un síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, según se usa en este documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no cuente con diagnóstico, (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo, o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. El agente terapéutico se puede administrar antes, durante o después de la aparición de la enfermedad o lesión. El tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos indeseables del paciente, es de interés particular. Tal tratamiento se lleva a cabo, preferentemente, antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. La terapia en cuestión se administrará durante la etapa sintomática de la enfermedad y, en algunos casos, después de la etapa sintomática de la enfermedad.

[0123] Una “cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a una cantidad de agente activo necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que induce, mejora o provoca de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o condiciones fisiológicas asociadas a una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

[0124] El término “cáncer de próstata”, como se usa en la presente, se refiere a un tumor maligno de origen glandular en la glándula prostática.

[0125] El término “caracterizado por la expresión de PSMA” se refiere ampliamente a cualquier enfermedad o trastorno donde la expresión de PSMA está asociada o implicada con uno o más procesos patológicos que son característicos de la enfermedad o trastorno. Dichos trastornos incluyen, de modo no taxativo, cáncer de próstata.

[0126] Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a un mamífero en evaluación para un tratamiento y/o en tratamiento. En una modalidad, el mamífero es un ser humano. Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” comprenden,

de modo no taxativo, individuos con cáncer, individuos con enfermedades autoinmunitarias, con infecciones patogénicas, y similares. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluir otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades en seres humanos, por ejemplo, ratones, ratas, etc.

- 5 **[0127]** La expresión “formulación farmacéutica” hace referencia a una preparación en forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se administraría la formulación. Tales formulaciones son estériles. Los excipientes (vehículos, aditivos) “farmacéuticamente aceptables” son aquellos que se pueden administrar a un sujeto mamífero en forma razonable a fin de proporcionar una
10 dosis efectiva del ingrediente activo utilizado.

[0128] Una formulación “estéril” es aséptica o libre o esencialmente libre de todo microorganismo vivo y sus esporas. Una formulación “congelada” se encuentra a una temperatura por debajo de 0 °C.

- [0129]** Una formulación “estable” es aquella en la cual la proteína de esta conserva esencialmente su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica una vez almacenado.
15 Preferentemente, la formulación esencialmente retiene la estabilidad física y química, así como también su actividad biológica tras el almacenamiento. El período de almacenamiento se selecciona generalmente con base en la vida media deseada de la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas se encuentran disponibles en la técnica y se reseñan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, Pubs. (1991)
20 y Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90) (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada para un período de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar de forma cualitativa y/o cuantitativa en una variedad de formas diferentes que incluyen la evaluación de formación de agregado (por ejemplo, mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño, al medir la turbidez y/o mediante inspección visual); al evaluar heterogeneidad de carga mediante el uso
25 de cromatografía de intercambio de cationes, enfoque isoeléctrico capilar (icIEF), o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencia de extremo amino o extremo carboxi, análisis de espectrometría de masas; análisis SDS-PAGE para comparar el anticuerpo reducido e intacto; análisis de mapa de péptidos (por ejemplo tríptico o LYS-C); evaluar la actividad biológica o la función de unión al antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede implicar cualquiera una o más de: agregación, desamidación (por
30 ejemplo, desamidación Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación Met), isomerización (por ejemplo, isomerización Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteínas no emparejadas, extensión de extremo N, procesamiento de extremo C, diferencias de glicosilación, etc.

II. Descripción detallada

Anticuerpos anti-PSMA

[0130] La presente invención proporciona una familia de anticuerpos estrechamente relacionados que se unen al PSMA humano. Los anticuerpos de esta familia comprenden un conjunto de secuencias de CDR como se define en la presente y se muestra en la Tabla 1 y se ilustran mediante las secuencias de la región variable de cadena pesada (VH) proporcionadas de las SEQ ID NO: 24 a 54 establecidas en la Tabla 2. La familia de anticuerpos proporciona una serie de beneficios que contribuyen a su utilidad como agentes clínicamente terapéuticos. Los anticuerpos incluyen miembros con una variedad de afinidades de unión, lo cual permite la selección de una secuencia específica con una afinidad deseada.

[0131] Tabla 1: secuencias de aminoácidos de CDR únicas de anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA.

SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
GGSISSSNFY (SEQ ID NO: 2)	VDYSGYT (SEQ ID NO: 12)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 19)
GGSISSNSYY (SEQ ID NO: 3)	IYDSGST (SEQ ID NO: 13)	AREPRIGYYYESSGYYS LDY (SEQ ID NO: 20)
GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYDSSGYYS LDY (SEQ ID NO: 22)
GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRVGYYYETSGYYS LDY (SEQ ID NO: 23)
GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNR (SEQ ID NO: 17)	
GFSFTSYG (SEQ ID NO: 8)		
GFTFISYG (SEQ ID NO: 9)		
GFTFSSYG		

(SEQ ID NO: 10)		
-----------------	--	--

[0132] Tabla 2. Secuencias de aminoácidos del dominio variable del anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA.

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
325920	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIG SIDYS GYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YR GQGTLVTVSS	24
346181	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYS GYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YR GQGTLVTVSS	25
346165	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIG SVDYS GYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YR GQGTLVTVSS	26
346172	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIG SIDYS GYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YR GQGTLVTVSS	27
326109	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYWGWIRQSPGKGLEWL GSIYDS GSTHYNPSLKSRVIISGDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHKAATADFD YRG QGTLVTVSS	28

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
325867	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	29
325742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	30
325748	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYSLDIRGQGTLTVSS	31
325940	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYSLDIRGQGTLTVSS	32
325836	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	33
326027	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	34

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
326087	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	35
326084	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYSLDIRGQGTLTVSS	36
326028	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYDSLDIRGQGTLTVSS	37
345497	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYSLDIRGQGTLTVSS	38
326029	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRVGY YY ETSGYSLDIRGQGTLTVSS	39
345461	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFTSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYSLDIRGQGTLTVSS	40

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
345493	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	41
345436	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	42
345443	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	43
345490	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	44
345482	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	45
345485	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	46

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
345463	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	47
325932	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	48
345505	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKGLEGVAV IWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	49
345508	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	50
345480	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	51
326116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVA VISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYD SSGYDSLDYRGQGTLVTVSS	52

N.º de id. de clon	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
345509	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	53
345444	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	54
345421	QVQLVESVGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	55
345447	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VISY DGSNRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	56
345510	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	57
345438	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGY YYE SSGYYSLDYRGQGTLVTVSS	58

[0133] Puede seleccionarse un anticuerpo adecuado de los proporcionados en la presente para el desarrollo y uso terapéutico o de otro tipo, incluido, de modo no taxativo, el uso como anticuerpo biespecífico, por ejemplo, como se muestra en la FIG. 5, paneles A-C, o anticuerpo trispecífico, o como parte de una estructura CAR-T. La FIG. 5, paneles A-C, proporciona ilustraciones de anticuerpos multiespecíficos anti-CD3 x anti-PSMA, donde el dominio anti-PSMA es monovalente y monoespecífico, bivalente y monoespecífico, o bivalente y biespecífico (biparatópico). El dominio anti-CD3 contiene un dominio CH1 y se para con una cadena ligera, mientras que los dominios anti-PSMA derivan de anticuerpos de solo cadena pesada y no contienen un dominio CH1 ni interactúan con una cadena ligera. En algunas modalidades, las dos cadenas pesadas se cortan mediante el uso, por ejemplo, de tecnología de botones en ojales. Volviendo a los anticuerpos representados en la FIG. 5, el panel A representa un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-PSMA donde el brazo de unión anti-PSMA es monovalente y monoespecífico, y el dominio de unión al antígeno del brazo anti-PSMA está en una configuración monovalente, es decir, solo está presente un dominio de unión al antígeno. El panel B muestra un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-PSMA donde el brazo de unión anti-PSMA es bivalente y monoespecífico, y el dominio de unión al antígeno del brazo anti-PSMA está en una configuración bivalente, lo que significa que hay dos dominios de unión al antígeno idénticos ubicados en tándem. El panel C representa un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-PSMA donde el brazo de unión anti-PSMA es bivalente y biparatópico, y los dominios de unión al antígeno del brazo anti-PSMA están en una configuración bivalente.

[0134] La determinación de afinidad para una proteína candidata se puede realizar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como mediciones Biacore. Los miembros de la familia de anticuerpos pueden tener una afinidad por PSMA con una Kd de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-11} , incluso, de modo no taxativo: de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-10} ; de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-9} ; de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-8} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-11} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-10} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-9} ; de alrededor de 10^{-9} a alrededor de 10^{-11} ; de alrededor de 10^{-9} a alrededor de 10^{-10} ; o cualquier valor dentro de estos intervalos. La selección de afinidad puede confirmarse con una evaluación biológica para modular, por ejemplo, bloquear, una actividad biológica del PSMA, lo que incluye en ensayos *in vitro*, modelos preclínicos y ensayos clínicos, así como también la evaluación de la posible toxicidad.

[0135] Los miembros de la familia de anticuerpos de la presente no presentan reactividad cruzada con la proteína PSMA del *macaco Cynomolgus*, pero pueden modificarse para proporcionar reactividad

cruzada con la proteína PSMA del macaco *Cynomolgus* o con el PSMA de cualquier otra especie animal, si se desea.

[0136] La familia de anticuerpos específicos del PSMA de la presente comprende un dominio VH, que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en una estructura de VH humana. Las secuencias de CDR pueden estar ubicadas, por ejemplo, en la región de alrededor de los residuos de aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-116 para las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de región variable ilustrativas proporcionadas, establecidas en las SEQ ID NO: 24 a 58. Un experto en la técnica entenderá que las secuencias de CDR pueden estar en diferentes posiciones si se selecciona una secuencia marco diferente, aunque generalmente el orden de las secuencias seguirá siendo el mismo.

[0137] Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos anti-PSMA de la presente invención pueden estar incluidas en las siguientes fórmulas estructurales, donde una X indica un aminoácido variable, que puede ser un aminoácido específico tal como se indicará más adelante.

CDR1

G G S I S S X₁ X₂ Y X₃ (SEQ ID NO: 67)

donde X₁ es S o N;
X₂ es S o N; y
X₃ es Y o F; y

CDR2

X₄ X₅ X₆ S G X₇ T (SEQ ID NO: 68)

donde X₄ es I o V;
X₅ es D o Y;
X₆ es Y o D; y
X₇ es Y o S; y

CDR3

A R H K A A T A D F D Y (SEQ ID NO: 69)

[0138] Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos anti-PSMA de la presente invención pueden estar incluidas en las siguientes fórmulas estructurales, donde una X indica un aminoácido variable, que puede ser un aminoácido específico tal como se indicará más adelante.

CDR1

5

G F X₁ F X₂ X₃ Y G (SEQ ID NO: 70)

donde X₁ es S, I o T;
X₂ es S, T, R o I; y
X₃ es R o S; y

10

CDR2

I X₄ Y D G S N X₅ (SEQ ID NO: 71)

donde X₄ es W o S; y
X₅ es R o K; y

15

CDR3

A R E P R X₆ G Y Y Y X₇ X₈ S G Y X₉ S L D Y (SEQ ID NO: 72)

donde X₆ es I o V;
X₇ es E o D;
X₈ es S o T; y
X₉ es Y o D.

20

[0139] Las secuencias representativas de CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en las Tablas 1 y 3.

Tabla 3: secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo de cadena pesada anti-PSMA.

25

N.º de id. de clon	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
325920	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)

N.º de id. de clon	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
346181	GGSISSSNYF (SEQ ID NO: 2)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
346165	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	VDYSGYT (SEQ ID NO: 12)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
346172	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
326109	GGSISSNSYY (SEQ ID NO: 3)	IYDSGST (SEQ ID NO: 13)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
325867	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 19)
325742	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 19)
325748	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYYS LDY (SEQ ID NO: 20)
325940	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYYS LDY (SEQ ID NO: 20)
325836	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326027	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326087	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326084	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYDSSGYYS LDY (SEQ ID NO: 22)
326028	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
345497	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYYS LDY (SEQ ID NO: 20)
326029	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRVGYYYETSGYYSL DY (SEQ ID NO: 23)

N.º de id. de clon	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
345461	GFSFTSYG (SEQ ID NO: 8)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345493	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345436	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345443	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345490	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345482	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345485	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345463	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
325932	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345505	GFTFISYG (SEQ ID NO: 9)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345508	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345480	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
326116	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRIGYYYDSSGYDSL (SEQ ID NO: 21)
345509	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345444	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 10)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)

N.º de id. de clon	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
345421	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345447	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	ISYDGSNR (SEQ ID NO: 17)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345510	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345438	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)

[0140] En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de CDR1 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10. En una modalidad en particular, la secuencia de CDR1 es la SEQ ID NO: 2 o 7.

- 5 **[0141]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de CDR2 de cualquiera de las SEQ ID NO: 11-17. En una modalidad en particular, la secuencia de CDR2 es la SEQ ID NO: 11 o 15.

- [0142]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de CDR3 de cualquiera de las SEQ ID NO: 18-23. En una modalidad en particular, la secuencia de CDR3 es la SEQ ID NO: 18 o 20.

[0143] En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-PSMA solo de cadena pesada comprende la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 2; la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 11; y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 18.

- 15 **[0144]** En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 15; y la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 20.

[0145] En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-PSMA comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 24 a 58 (Tabla 2).

- [0146]** En otra modalidad, un anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25.

[0147] En otra modalidad, un anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 38.

- [0148]** En algunas modalidades, una secuencia de CDR en un anticuerpo anti-PSMA de la invención comprende una o dos sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 o conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 23 (Tabla 1).
- 5 **[0149]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende preferentemente un dominio variable de cadena pesada (VH) en el que la secuencia de CDR3 tiene una identidad de secuencia mayor o igual que 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% a nivel de aminoácidos con una secuencia de CDR3 de cualquiera de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR3 se proporcionan en la Tabla 1, y se une a PSMA.
- 10 **[0150]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende preferentemente un dominio variable de cadena pesada (VH) en el que el conjunto completo de CDR 1, 2 y 3 (combinadas) tiene una identidad de secuencia mayor o igual a 85% (ochenta y cinco por ciento) a nivel de aminoácidos con las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR se proporcionan en la Tabla 1, y se une a PSMA.
- 15 **[0151]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende preferentemente un dominio variable de cadena pesada (VH) en el que el conjunto completo de CDR 1, 2 y 3 (combinadas) tiene una identidad de secuencia mayor o igual a 85% (ochenta y cinco por ciento) a nivel de aminoácidos con las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR se proporcionan en la Tabla 3, y se une a PSMA.
- 20 **[0152]** En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de región variable de cadena pesada con al menos alrededor de 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 98% de identidad, o al menos al menos un 99% de identidad con cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada de las SEQ ID NO: 24 a 58 (que se muestran en la Tabla 2), y se une a PSMA.
- 25 **[0153]** En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, que pueden tener cualquiera de las configuraciones discutidas en la presente, incluida, de modo no taxativo, una molécula similar a un anticuerpo de tres cadenas biespecífico (TCA). En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico puede comprender al menos una región variable de cadena pesada que tiene especificidad de unión para PSMA, y al menos una región variable de cadena pesada que tiene
- 30 especificidad de unión para una proteína distinta de PSMA. En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende al menos dos dominios de unión al antígeno, donde cada uno de los dominios de unión al antígeno tiene especificidad de unión para PSMA. En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico puede comprender un par

de cadena pesada/cadena ligera que tiene especificidad de unión por un primer antígeno (por ejemplo, CD3) y una cadena pesada de un anticuerpo solo de cadena pesada. En determinadas modalidades, la cadena pesada del anticuerpo solo de cadena pesada comprende una parte Fc que comprende dominios CH2, CH3 y/o CH4, en ausencia de un dominio CH1. En una modalidad en particular, un anticuerpo

5 bienespecífico comprende un par de cadena pesada/cadena ligera que tiene especificidad de unión para un antígeno en una célula efectora (por ejemplo, una proteína CD3 en un linfocito T) y una cadena pesada de un anticuerpo solo de cadena pesada solamente que comprende un dominio de unión al antígeno que tiene especificidad de unión para PSMA.

[0154] En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende un dominio VH de unión a

10 CD3 que está apareado con un dominio variable de cadena ligera. En determinadas formas de modalidad, la cadena ligera es una cadena ligera fija. En algunas modalidades, el dominio VH de unión a CD3 comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 59, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 60 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 61, en un marco VH humano. En algunas modalidades, la

15 cadena ligera fija comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 62, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 63 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 64, en un marco VL humano. Juntos, el dominio VH de unión a CD3 y el dominio variable de cadena ligera tienen afinidad de unión por CD3. En algunas modalidades, el dominio VH de unión a CD3 comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, un dominio VH de unión a CD3 comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor

20 de 90%, al menos alrededor de 95%, o al menos alrededor de 99% por ciento de identidad con la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, o al menos

25 alrededor de 99% de porcentaje de identidad con la secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 66.

[0155] Los anticuerpos multiespecíficos que comprenden el dominio VH de unión a CD3 y el dominio variable de cadena ligera descritos anteriormente tienen propiedades ventajosas, por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud PCT número WO2018/052503, cuya descripción se incorpora en

30 la presente mediante referencia en su totalidad. Cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos y dominios de unión al antígeno descritos en la presente, que tenga afinidad de unión a PSMA, se puede combinar con los dominios de unión a CD3 y dominios de cadena ligera fija descritos en la presente (véase, por ejemplo, la Tabla 4 y Tabla 5), así como secuencias adicionales, tales como las que se

proporcionan en la Tabla 6 y la Tabla 7, para generar anticuerpos multiespecíficos que tengan afinidad de unión a uno o más epítomos de PSMA, así como a CD3.

5 Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3 de cadena ligera y pesada anti-CD3.

	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
Cadena pesada	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 59)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 60)	AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 61)
Cadena ligera	QSVSSN (SEQ ID NO: 62)	GAS (SEQ ID NO: 63)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 64)

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera y pesada anti-CD3.

VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 66)

Tabla 6: secuencias de la región Fc de IgG1 e IgG4 humanas

IgG1 humana (UniProt n.º P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)
IgG4 humana (UniProt n.º P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 76)
IgG1 humana con mutaciones silenciadoras (región Fc)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 77)

IgG4 humana con mutaciones silenciadoras (región Fc)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDK DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNKGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)
--	--

Tabla 7: secuencias adicionales.

Secuencia de la región constante de la cadena ligera anti-CD3 (cadena ligera kappa)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 79)
Secuencia de cadena pesada anti-CD3 (VH + Fc de IgG1 wt)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)

Secuencia de cadena pesada anti-CD3 (con Fc de IgG1 silenciada)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)
Secuencia de región constante de cadena pesada anti-CD3 (con Fc de IgG4 wt)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 82)

Secuencia de región constante de cadena pesada anti-CD3 (con Fc de IgG4 silenciada)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIQYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 83)
IgG4 silenciado (bisagra – CH2 – CH3; ojal (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSL <u>S</u> <u>C</u> <u>A</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 84)
IgG4 silenciado (bisagra – CH2 – CH3; botón (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 85)
Cadena ligera de longitud completa anti-CD3 (VL + kappa CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNN WPWTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

Cadena pesada anti-CD3 de longitud completa (VH + Fc de IgG4 silenciado + botón (S228P, F234A, L235A; T366W))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SL<u>W</u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 87)
Cadena pesada monovalente de PSMA (id. de clon 346181) + Fc de IgG4 silenciada, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKG LEWIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV YNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>S</u><u>CA</u>VKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 88)

Cadena pesada bivalente de PSMA (id. de clon 346181) + Fc de IgG4 silenciada, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKG LEWIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV YNCARHKAATADFDYRGQGT LVT VSSGGGGSGGGGS QLQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIGSIDY SGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKA ATADFDYRGQGT LVT VSSSESKYGPPCP <u>PC</u>PAPE <u>AA</u>GGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SC</u><u>A</u>VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL <u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 89)
Cadena pesada monovalente de PSMA (id. de clon 345497) + Fc de IgG4 silenciada, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKG LEGVAWIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGT LVT VSSSESKYGPPCP <u>PC</u>PAPE <u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SC</u><u>A</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL <u>V</u>SRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 90)

Cadena pesada bivalente de PSMA (id. de clon 345497) + Fc de IgG4 silenciada, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKG LEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSSESKYGPP CP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQV SL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL<u>V</u>SR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 91)
Cadena pesada bivalente de PSMA (id. de clon 346181 x id. de clon 345497) + Fc IgG4 silenciado, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKG LEWIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAV YNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWY DGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE PRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>G GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 92)

Cadena pesada bivalente de PSMA (id. de clon 345497 x id. de clon 346181) + Fc IgG4 silenciado, ojal (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKG LEGVAVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSSGGGGSGGG GSQQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPG KGLEWIGSIDYSGYTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYN CARHKAATADFDYRGQGTLTVSSSESKYGPPCP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSL<u>SC</u>AVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 93)
---	---

[0156] En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, que pueden tener cualquiera de las configuraciones discutidas en la presente, incluida, de modo no taxativo, una molécula similar a un anticuerpo de tres cadenas biespecífico (TCA). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico puede comprender al menos una región variable de cadena pesada que tiene especificidad de unión para PSMA, y al menos una región variable de cadena pesada que tiene especificidad de unión para una proteína distinta de PSMA. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico puede comprender un par de cadena pesada / cadena ligera que tiene especificidad de unión para un primer antígeno, y una cadena pesada de un anticuerpo solo de cadena pesada, que comprende una parte Fc que comprende CH2 y/o CH3 y/o Dominios CH4, en ausencia de un dominio CH1, y un dominio de unión a antígeno que une un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno. En una modalidad en particular, un anticuerpo biespecífico comprende un par de cadena pesada/cadena ligera que tiene especificidad de unión para un antígeno en una célula efectora (por ejemplo, una proteína CD3 en un linfocito T) y una cadena pesada de un anticuerpo solo de cadena pesada solamente que comprende un dominio de unión al antígeno que tiene especificidad de unión para PSMA.

[0157] En algunas modalidades, cuando un anticuerpo de la invención es un anticuerpo biespecífico, un brazo del anticuerpo (un resto de unión o una unidad de unión) es específico para PSMA humana, mientras que el otro brazo puede ser específico para células objetivo, antígenos asociados a tumores, antígenos dirigidos, por ejemplo, integrinas, etc., antígenos patógenos, proteínas de puntos de control y similares. Las células objetivo incluyen específicamente células cancerosas, que incluyen, sin limitación,

células de tumores sólidos, por ejemplo, tumores de próstata, como se describe a continuación. En algunas modalidades, un brazo del anticuerpo (un resto de unión o una unidad de unión) es específico para PSMA humano, mientras que el otro brazo es específico para CD3.

[0158] En algunas modalidades, un anticuerpo comprende un polipéptido de cadena ligera anti-CD3 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 66 unida a la secuencia de la SEQ ID NO: 79, un polipéptido de cadena pesada anti-CD3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 u 85, y un polipéptido de cadena pesada anti-PSMA que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 24-58, en una configuración monovalente o bivalente, unido a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 84 u 85. Estas secuencias se pueden combinar de diversas formas para producir un anticuerpo biespecífico de una subclase de IgG deseada, por ejemplo, IgG1, IgG4, IgG1 silenciada, IgG4 silenciada. En una modalidad preferida, un anticuerpo es un TCA que comprende un primer polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 86, un segundo polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 87 y un tercer polipéptido que comprende las SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 o 93. En una modalidad preferida, un anticuerpo es un TCA que consiste en un primer polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 86, un segundo polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 87 y un tercer polipéptido que consiste en las SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 o 93.

[0159] Varios formatos de anticuerpos multiespecíficos están dentro del ámbito de la invención, que incluyen, sin limitación, polipéptidos de cadena sencilla, polipéptidos de dos cadenas, polipéptidos de tres cadenas, polipéptidos de cuatro cadenas y múltiplos de los mismos. Los anticuerpos multiespecíficos de la presente incluyen específicamente anticuerpos multiespecíficos de linfocitos T (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a PSMA y CD3 (anticuerpos anti-PSMA x anti-CD3). Dichos anticuerpos inducen una muerte potente mediada por células T de células que expresan PSMA.

Preparación de anticuerpos anti-PSMA

[0160] Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica. En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente son producidos por animales transgénicos, incluidos ratones y ratas transgénicos, preferiblemente ratas, donde los genes de inmunoglobulina endógenos están inactivados o inhabilitados. En una modalidad preferida, los anticuerpos de cadena pesada de la presente se producen en UniRat™. UniRat™ tienen sus genes endógenos de inmunoglobulina silenciados y utilizan un translocus de cadena pesada de inmunoglobulina humana para expresar un repertorio optimizado de origen natural diverso HCAb completamente humanos. Mientras que los loci de inmunoglobulina endógenos en ratas pueden ser desactivados o silenciados mediante el uso de una variedad de tecnologías, en UniRat™ se usó la

tecnología de (endo)nucleasa de dedos de cinc (ZNF) para inactivar el locus J de cadena pesada de rata endógeno, locus Ck de cadena ligera y locus Cλ de cadena ligera. Las construcciones de ZNF para la microinyección en ovocitos pueden producir líneas con inactivación (KO) de IgH e IgL. Para más detalles, véase, por ejemplo, Geurts et ál., 2009, Science 325:433. La caracterización de ratas con inactivación de la cadena pesada de Ig ha sido informada por Menoret et ál., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Las ventajas de la tecnología de ZNF son que la unión de extremos no homólogos para silenciar un gen o locus mediante eliminaciones de hasta varios kb también puede proporcionar un sitio objetivo para la integración homóloga (Cui et ál., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67). Los anticuerpos de cadena pesada humanos producidos en UniRat™ se denominan UniAbs™ y pueden unirse a epítomos que no pueden ser atacados con anticuerpos convencionales. Su alta especificidad, afinidad y pequeño tamaño los hacen ideales para aplicaciones monoespecíficas y poliespecíficas.

[0161] Además de los UniAbs™, en la presente se incluyen específicamente anticuerpos solo de cadena pesada que carecen de la estructura VHH y mutaciones de camélido, así como sus regiones VH funcionales. Dichos anticuerpos solo de cadena pesada pueden producirse, por ejemplo, en ratas o ratones transgénicos que comprenden loci génicos solo de cadena pesada completamente humana, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/008548, pero otros mamíferos transgénicos, tales como el conejo, el cobayo, la rata también se pueden utilizar, y se prefieren las ratas y los ratones. Los anticuerpos solo de cadena pesada, incluidos sus fragmentos funcionales VHH o VH, también se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante, mediante expresión del ácido nucleico codificante en un hospedador eucariota o procariota adecuado, incluidas, por ejemplo, células de mamífero (por ejemplo, células CHO), E. coli o levadura.

[0162] Los dominios de los anticuerpos solo de cadena pesada combinan las ventajas de los anticuerpos y los fármacos de molécula pequeña: pueden ser monovalentes o multivalentes, tienen baja toxicidad y su elaboración es económica. Debido a su pequeño tamaño, estos dominios son fáciles de administrar, incluida la administración oral o tópica, se caracterizan por su alta estabilidad, incluida la estabilidad gastrointestinal; y su semivida se puede adaptar al uso o la indicación deseada. Además, los dominios VH y VHH de los HCAb se pueden fabricar de forma rentable.

[0163] En una modalidad particular, los anticuerpos de cadena pesada de la presente invención, lo que incluye UniAbs™, tienen el residuo de aminoácido nativo en la primera posición de la región FR4 (posición de aminoácido 101 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat), sustituido con otro residuo de aminoácido, que es capaz de interrumpir un parche hidrofóbico expuesto en la superficie que comprende, o está asociado con, el residuo de aminoácido nativo en esa posición. Dichos parches hidrofóbicos normalmente están enterrados en la interfaz con la región constante de la cadena ligera del

anticuerpo, pero quedan expuestos en la superficie en los HCAb y son, al menos parcialmente, para la acumulación no deseada y la asociación de cadena ligera de HCAb. El residuo de aminoácido sustituido está cargado preferentemente, y más preferentemente, está cargado positivamente, tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) o histidina (His, H), preferentemente arginina (R). En una modalidad preferida, los anticuerpos de cadena pesada derivados de los animales transgénicos contienen una mutación de Trp a Arg en la posición 101. Los HCAb resultantes tienen, preferentemente, una alta afinidad de unión a antígenos y solubilidad en condiciones fisiológicas en ausencia de acumulación.

[0164] Como parte de la presente invención, se identificó que los anticuerpos de cadena pesada anti-PSMA de IgG humana con secuencias únicas de animales UniRatTM (UniAbTM) se unen a PSMA humano en ensayos de unión de células y proteína de ELISA. Las secuencias identificadas de la región variable de cadena pesada (VH) son positivas para la unión a la proteína PSMA humana y/o para la unión a células PSMA+, y todas son negativas para la unión a células que no expresan PSMA. Ver, por ejemplo, la Tabla 8.

[0165] Los anticuerpos de cadena pesada que se unen a epítomos no superpuestos en una proteína PSMA, por ejemplo, UniAbsTM, pueden identificarse mediante ensayos de unión competitiva, tales como inmunoensayos ligados a enzimas (ensayos ELISA) o ensayos de unión competitiva por citometría de flujo. Por ejemplo, uno puede usar competición entre anticuerpos conocidos que se unen al antígeno objetivo y el antígeno de interés. Mediante el uso de este enfoque, uno puede dividir un conjunto de anticuerpos en aquellos que compiten con el anticuerpo de referencia y aquellos que no. Los anticuerpos no competitivos se identifican como que se unen a un epítomo distinto que no se superpone con el epítomo unido por el anticuerpo de referencia. A menudo, se inmoviliza un anticuerpo, se une el antígeno y se prueba un segundo anticuerpo marcado (por ejemplo, Biotinilado) en un ensayo ELISA para determinar su capacidad para unirse al antígeno capturado. Esto se puede realizar también mediante el uso de plataformas de resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés), que incluyen ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 y Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) y generador de imágenes MX96 SPR (Ibis technologies B.V.), así como también en plataformas de interferometría de biocapas, tal como Octet Red384 y Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Para obtener más detalles, ver los ejemplos en la presente.

[0166] Normalmente, un anticuerpo “compite” con un anticuerpo de referencia si provoca una reducción de alrededor de un 15-100% en la unión del anticuerpo de referencia al antígeno objetivo, según se determina mediante técnicas estándar, tales como los ensayos de unión competitiva descritos anteriormente. En varias modalidades, la inhibición relativa es de al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%,

al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50% al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95% o más.

5

Composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento

[0167] Otro aspecto de la presente invención consiste en proporcionar composiciones farmacéuticas que comprendan uno o más anticuerpos de la presente invención mezcladas con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se usan en la presente incluyen, de modo no taxativo, adyuvantes, portadores sólidos, agua, soluciones amortiguadoras u otros portadores usados en la técnica para contener componentes terapéuticos, o combinaciones de estos.

[0168] En una modalidad, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada (por ejemplo, UniAb™) que se une a PSMA. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada multiespecífico (que incluye biespecífico) (por ejemplo, UniAb™) con especificidad de unión para dos o más epítomos que no se superponen en una proteína PSMA. En una modalidad preferida, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada multiespecífico (incluido biespecífico y TCA) (por ejemplo, UniAb™) con especificidad de unión a PSMA y con especificidad de unión a un objetivo de unión en una célula efectora (por ejemplo, un objetivo de unión en un linfocito T, tal como, por ejemplo, una proteína CD3 en un linfocito T).

[0169] Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de proteínas que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición., Osol, A. Ed. (1980)), como en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquilparabenos, tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos,

disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no-iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5 **[0170]** Las composiciones farmacéuticas para su administración parenteral son preferentemente estériles y sustancialmente isotónicas y fabricadas en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés). Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración). La formulación depende de la vía de administración elegida. Los anticuerpos en la presente se pueden administrar mediante
 10 inyección intravenosa o infusión o de forma subcutánea. Para la administración por inyección, los anticuerpos en la presente se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en soluciones amortiguadoras compatibles fisiológicamente para reducir la incomodidad en el sitio de inyección. La solución puede contener portadores, excipientes o estabilizadores como se trató anteriormente. De manera alternativa, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para la constitución con un vehículo
 15 adecuado, por ejemplo, agua esterilizada sin pirógenos, previo al uso.

[0171] Las formulaciones de anticuerpos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 9,034,324. Se pueden usar formulaciones similares para los anticuerpos de cadena pesada, incluidos los UniAbs™, de la presente invención. Las formulaciones de anticuerpos subcutáneos se describen, por ejemplo, en los documentos US20160355591 y US20160166689.

20

Métodos de uso

[0172] Los anticuerpos anti-PSMA y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden usar para el tratamiento de enfermedades y afecciones caracterizadas por la expresión de PSMA, que incluyen, de modo no taxativo, las afecciones y enfermedades descritas más adelante en la presente.

25 **[0173]** PSMA es una proteína transmembrana tipo II que se expresa en el tejido del epitelio de la próstata y se regula por aumento en el cáncer de próstata y la neovascularización de los tumores sólidos. También se expresa a niveles bajos en tejidos sanos como el cerebro, los riñones y las glándulas salivales, pero su sobreexpresión en el tejido prostático maligno lo convierte en un objetivo atractivo para el tratamiento terapéutico del cáncer de próstata. También puede ser relevante para terapia o imagenología de tumores
 30 sólidos, dada su alta expresión en neovascularización maligna. Se han descrito anticuerpos monoclonales, conjugados de anticuerpo y fármaco y linfocitos T del receptor de antígeno quimérico dirigidas a PSMA para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico (Hernandez-Hoyos et ál., 2016, PMID: 27406985, DiPippo et ál., 2014, PMID: 25327986, Serganova et ál., 2016, PMID: 28345023). Además, se están

investigando conjugados de radionúclidos específicos de PSMA para imagenología y el tratamiento del cáncer de próstata (por ejemplo, Hofman et ál., 2018 PMID: 29752180).

[0174] En un aspecto, los anticuerpos anti-PSMA (por ejemplo, UniAbs™) y las composiciones farmacéuticas de la presente pueden usarse para tratar trastornos caracterizados por la expresión de PSMA, que incluyen, de modo no taxativo, cáncer de próstata y tumores sólidos.

[0175] Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de enfermedades varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero los mamíferos no humanos también pueden tratarse, por ejemplo, animales de compañía tales como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio tales como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosificaciones del tratamiento pueden titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

[0176] Los niveles de dosificación pueden ser determinados fácilmente por el médico y pueden modificarse según se requiera, por ejemplo, según se requiera para modificar la respuesta de un sujeto a la terapia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación individual varía en función del hospedador tratado y el modo de administración particular. Las formas de dosificación unitarias contendrán generalmente entre alrededor de 1 mg y alrededor de 500 mg de ingrediente activo.

[0177] En algunas modalidades, la dosis terapéutica del agente puede variar de alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de régimen de tratamiento implica una administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención habitualmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares tal como se indica mediante la medición de los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. De manera alternativa, las entidades terapéuticas de la presente invención pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían en virtud de la semivida del polipéptido en el paciente.

[0178] Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Las composiciones farmacéuticas en la presente

son adecuadas para la administración subcutánea o intravenosa, directamente o después de la reconstitución de composiciones sólidas (por ejemplo, liofilizadas). La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas, tales como un poliláctido, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, tal como se describió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que puede formularse de manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Por lo general, las composiciones farmacéuticas se formulan como estériles, sustancialmente isotónicas y en cumplimiento absoluto con todas las normativas de Prácticas correctas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU.

[0179] La toxicidad de los anticuerpos y las estructuras de anticuerpos descritos en la presente se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, al determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) o la LD100 (la dosis letal para el 100% de la población). La relación de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en humanos. La dosificación de los anticuerpos que se describen en la presente se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la dosis eficaz con una toxicidad escasa o nula. La dosificación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico particular puede elegir la formulación, vía de administración y dosificación exactas en vista del trastorno del paciente.

[0180] Las composiciones para la administración comúnmente incluirán un anticuerpo u otro agente de ablación disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un portador acuoso. Pueden utilizarse diversos portadores acuosos, por ejemplo, solución salina amortiguada y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia no deseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según sea necesario para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de amortiguación y ajuste del pH, agentes para ajustar la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluido, las viscosidades, el peso corporal y similares, de acuerdo con el modo de

administración particular seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15.^a ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et ál., eds., 1996)).

[0181] También se encuentran dentro del alcance de la invención los kits que comprenden los agentes activos y formulaciones de estos de la invención e instrucciones de uso. Un kit puede contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, etc. Los kits incluyen típicamente una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término “etiqueta”, según se usa en este documento, incluye cualquier escritura o material registrado suministrado en o con un kit o que acompañe un kit de otra forma.

[0182] Ahora que se ha descrito por completo la invención, será evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Ejemplo 1: inmunización de UniRat™ con PSMA humano recombinante

[0183] Se inmunizaron doce animales UniRat™ con proteína PSMA humana recombinante fusionada a una etiqueta his (n.º de cat. de R&D Systems: 4234-ZN). Los animales se inmunizaron dos veces por semana durante ocho semanas. Después de un transcurso de tiempo de inmunización de 35 días, se recogió suero de las ratas para determinar los títulos en suero.

Resultados de la titulación del suero

[0184] La información resumida del título en suero se muestra en la FIG. 1, paneles A-B. En los gráficos representados en la FIG. 1, paneles A-B, cada línea representa un animal individual. Las leyendas de los gráficos muestran el número de identificación de cada animal individual. La actividad de unión para una serie de dilución de 12 puntos de suero se probó mediante ELISA contra una proteína de etiqueta huPSMA+His de y una proteína fuera del objetivo de etiqueta His. Entre este grupo de animales, se observó un intervalo de niveles de reactividad en suero a la proteína PSMA humana. No se observó respuesta en suero a la proteína fuera del objetivo de la etiqueta de His.

Ejemplo 2: Análisis de citometría de flujo de la unión a células positivas y negativas de PSMA mediante UniAbs™ anti-PSMA

[0185] La unión a células positivas a PSMA se evaluó mediante citometría de flujo (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore) mediante el uso de la línea celular LNCaP (ATCC: CRL-1740), línea celular 22Rv1 (ATCC CRL-2505), una línea celular PC3 (ATCC CRL-1435) transfectadas de forma estable para expresar PSMA humano, o la línea celular DU-145 (ATCC HTB-81). En resumen, se tiñeron 50 000 células objetivo con una serie de dilución de UniAbs™ purificados durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con tampón de citometría de flujo (1X PBS, 1% BSA, 0,1% de NaN₃) y se tiñeron con anticuerpo de cabra F(ab')₂ IgG anti-humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Southern Biotech, n.º de cat. 2042-09) para detectar anticuerpos unidos a células. Después de una incubación de 20 minutos a 4°C, las células se lavaron dos veces con tampón de citometría de flujo y se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante citometría de flujo. El MFI de las células teñidas con el anticuerpo secundario solo se utilizó para la determinación de la señal de fondo y la unión de cada anticuerpo se convirtió en un pliegue sobre el fondo. La unión a células positivas de PSMA de cynomolgus se determinó mediante el uso del mismo protocolo con las siguientes modificaciones: las células objetivo eran de células Freestyle 293-F (ThermoFisher R79007) transfectadas transitoriamente para expresar el dominio extracelular de PSMA de cynomolgus. En algunos experimentos, los valores de EC50 se calcularon mediante el uso de GraphPad Prism 7.

[0186] La Tabla 8 resume la actividad de unión al objetivo de varios de los anticuerpos de cadena pesada (HCAb) anti-PSMA descritos en la presente. La columna 1 indica la ID del clon del HCAb. La columna 2 indica la unión a células LNCaP medida como pliegue sobre la señal MFI de fondo.

Tabla 8: Unión a la línea celular que expresa PSMA

Columna 1: ID. DE CLON	Columna 2: LNCaP
325920	282
346181	264
346165	243
346172	216
326109	25
325867	210
325742	200
325748	193

Columna 1: ID. DE CLON	Columna 2: LNCaP
325940	169
325836	163
326027	138
326087	129
326084	125
326028	117
345497	112
326029	109
345461	102
345493	101
345436	87
345443	84
345490	80
345482	80
345485	71
345463	68
325932	64
345505	59
345508	55
345480	47
326116	38
345509	37
345444	23
345421	22
345447	14
345510	13
345438	13

[0187] Las diferencias en la unión a PSMA de cynomolgus, como se muestra en la FIG. 2, paneles A y B, apoya la diferencia en el epítipo de PSMA humano reconocido por HCAb 346181 y 345497.

Ejemplo 3: unión a proteínas recombinantes mediante interferometría de biocapa (BLI)

[0188] Mediante el uso de interferometría de biocapa, se evaluó la competición de unión entre las dos familias de anticuerpos de las que son miembros el id. de clon 345497 y el id. de clon 346181. El análisis de agrupación de epítomos de antígeno-anticuerpo se realizó en Octet QK-384 (ForteBio). Brevemente, se utilizaron sensores de captura anti-Penta HIS (HIS1K) ("Penta HIS" descrito como SEQ ID NO: 95) para inmovilizar el antígeno, PSMA humano recombinante (n.º de catálogo de R&D Systems: 4234-ZN) durante 120 segundos. Después de las lecturas de valor de referencia, los sensores se sumergieron en soluciones que contenían el anticuerpo 1 (325867) durante 300 segundos y se estableció otro valor de referencia durante 60 segundos. Luego, los sensores se sumergieron en pocillos que contenían el anticuerpo 1 como control positivo para el bloqueo o el anticuerpo 2 (325920). Se midieron las tasas de asociación y disociación durante 300 y 600 segundos, respectivamente. El análisis de datos se realizó con Octet Data Analysis HT v11,0 (ForteBio). Tal como se muestra en la FIG. 3, 325920 se unió a la proteína PSMA unida previamente con el anticuerpo 325867, lo cual indica que estos dos anticuerpos reconocen epítomos no superpuestos en PSMA. El cambio en la señal de unión se informa en nanómetros.

Ejemplo 4: Composición de anticuerpos anti-PSMA biparatópicos y bivalentes

[0189] Tal como se muestra en la Tabla 9, el id. de clon 350123 está compuesto por la secuencia del id. de clon 346181 unida a la secuencia del id. de clon 345497 con la secuencia puente GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74). El id. de clon 350122 se compone de dos repeticiones del id. de clon 346181 unidas por la misma secuencia enlazadora. El id. de clon 350123 es biparatópico ya que está compuesto por dos dominios anti-PSMA que reconocen diferentes epítomos en PSMA. El id. de clon 350122 es bivalente pero no biparatópico, ya que está compuesto por el mismo dominio anti-PSMA en tándem. Las ilustraciones esquemáticas de varios anticuerpos anti-PSMA x anti-CD3 se representan en la FIG. 5, paneles A-C.

Tabla 9: Descripción de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos anti-PSMA biparatópicos y bivalentes

Id. de clon	Secuencia 1	Secuencia enlazadora	Secuencia 2
-------------	-------------	----------------------	-------------

		67 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74)	
350123	346181		345497
350122	346181	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74)	346181

Ejemplo 5: determinación de la afinidad por el PSMA humano expresado en la superficie celular

[0190] La afinidad por PSMA de la superficie celular se determinó mediante análisis de Scatchard mediante el uso de la línea celular de carcinoma de próstata humano 22Rv1. Primero, los anticuerpos multiespecíficos PSMAxCD3 se marcaron con Alexa Fluor 488 mediante el uso del kit Alexa Fluor 488 5-SDP Ester (ThermoFisher A30052). A continuación, se evaluó la unión a 22Rv1s mediante citometría de flujo (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore). Brevemente, 100 000 células objetivo se tiñeron con una serie de dilución de Alexa Fluor 488 marcado con anticuerpos multiespecíficos durante 1 hora a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con amortiguador de citometría de flujo y la intensidad de fluorescencia media se midió por citometría de flujo.

[0191] Para establecer una curva estándar para el cálculo de moléculas de fluoróforos solubles equivalentes (MESF), las poblaciones de microesferas de Bangs Lab Quantum Alex Fluor 488 MESF 1 a 4 se combinaron en un solo tubo y se pasaron en el Guava easyCyte 8HT. Las microesferas en blanco se analizaron en un tubo separado. Se midió el MFI de cada población de microesferas para el canal FITC. Se trazó una regresión lineal de Log10 (MFI) contra Log10 (MESF) mediante el uso de GraphPad Prism 7.

[0192] El MFI de cada muestra experimental se interpoló en la curva de calibración y se determinó el MESF para cada muestra. Posteriormente, se calculó la cantidad promedio de anticuerpos unidos por célula (ABC) al dividir el MESF medio entre el grado de etiquetado (DOL) del anticuerpo. El número de ABC se multiplicó por la concentración de células para determinar la concentración total de anticuerpo unido. La concentración de anticuerpo libre se calculó al restar la concentración de anticuerpo unido de la concentración de tinción (dosis inicial). La concentración de anticuerpo libre se representó en función de la concentración de anticuerpo unido en GraphPad Prism 7. El gráfico resultante se ajustó a una función de unión específica de un sitio de regresión no lineal para determinar la afinidad, tal como se muestra en la FIG. 4, paneles A y B.

Ejemplo 6: Destrucción de células tumorales de próstata positivas a PSMA mediada por anticuerpos multiespecíficos a través de la redirección de linfocitos T

Ensayos que utilizan linfocitos T en reposo

[0193] Las células objetivo se sembraron a 15 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche a 37°C. Después de la incubación, se agregaron cantidades crecientes de anticuerpo multiespecífico junto con linfocitos T humanos en reposo a una relación de células objetivo a efectoras 10:1 y se incubó durante 48 o 72 horas adicionales a 37°C (48 horas para ensayos con células LNCaP, MDA-PCa-2b y PC3-PSMA y 72 horas para ensayos con células 22Rv1). La destrucción celular se midió mediante el uso del reactivo de proliferación celular WST-1 (Sigma n.º de cat.: 11644807001) o citometría de flujo. En algunos experimentos, se recogió una pequeña muestra de cada sobrenadante después de la incubación, pero antes del análisis de la viabilidad de las células objetivo y se guardó para el análisis de la producción de citocinas. Cuando se analizó la viabilidad celular con el reactivo WST-1, se añadió el stock de reactivo a cada pocillo a una dilución 1:10 y se incubó durante 90 minutos a 37°C. A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm (referencia 690 nm) y se calculó el porcentaje de lisis específica.

[0194] Si la viabilidad de las células objetivo se analizó mediante citometría de flujo, las células objetivo se marcaron antes de iniciar el ensayo con el colorante de membrana DiR (ThermoFisher D12731). Después de la incubación con linfocitos T y anticuerpo, los sobrenadantes se guardaron para el análisis de citocinas o se eliminaron. A continuación, los pocillos se lavaron una vez para recoger células tumorales muertas y linfocitos T, que se transfirieron a una placa de citometría de flujo. Las células tumorales adheridas restantes se tripsinizaron y luego se añadieron a los pocillos correspondientes en la placa de citometría de flujo. Se usó reactivo Anexina-V para teñir las células muertas y se realizó una citometría de flujo (BD FACSCelesta) para cuantificar el porcentaje de células tumorales muertas en cada muestra, controlado por tinción DiR. Se usaron pocillos que contenían células objetivo sin tratar para normalizar la destrucción celular espontánea. En algunos experimentos, se utilizó un anticuerpo de control negativo, que consistía en el mismo brazo dirigido a CD3 que en las moléculas multiespecíficas de PSMAxCD3, pero reemplazando el brazo dirigido al tumor por un VH específico para la proteína gp120 del VIH.

[0195] La FIG. 7 muestra la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA mediante el uso de linfocitos T no estimulados. Se incubaron linfocitos T humanos no estimulados con células que expresan PSMA (LNCaP) y diferentes concentraciones de anticuerpos multiespecíficos. El anticuerpo biparatópico anti-PSMAxCD3 (350123xCD3) superó al anticuerpo monoparatópico PSMAxCD3 (346181xCD3).

Ensayos que utilizan linfocitos T preactivados

[0196] Se preactivaron linfocitos T pan humanos con OKT3 e IL-2 unidas a placa durante tres días, seguido de un día adicional de incubación en IL-2 reciente. Las células objetivo se tripsinizaron, se cargaron con calceína-AM (ThermoFisher C3100MP), se mezclaron con linfocitos T activados a una relación E:T de 20:1, y se añade a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se agregaron series de dilución de diferentes anticuerpos multiespecíficos, seguido de incubación durante 4 horas a 37°C. A continuación, los sobrenadantes se transfirieron a placas negras de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 480 nm/520 nm ex/em para cuantificar la liberación de calceína. Se usaron células objetivo incubadas sin linfocitos T para normalizar la liberación espontánea de calceína de células tumorales intactas. La adición de 2% Triton-X para controlar los pocillos que contienen células objetivo permitió el cálculo de la señal de calceína correspondiente a la lisis celular máxima. mediante el uso de este valor, cada pocillo experimental se informó como porcentaje de la lisis celular máxima. El análisis de datos se realizó mediante el uso de GraphPad prism 7.

[0197] La FIG. 6 muestra la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA mediante el uso de linfocitos T preactivados. Se incubaron linfocitos T humanos preactivados con células que expresan PSMA (LNCaP) y diferentes concentraciones de anticuerpos multiespecíficos. La destrucción de las células tumorales se midió mediante la liberación de calceína y se normalizó a la liberación espontánea de células tumorales en ausencia de linfocitos T. El anticuerpo biparatópico anti-PSMAxCD3 (350123xCD3) superó al anticuerpo monoparatópico PSMAxCD3.

[0198] La FIG. 8 muestra que los anticuerpos multiespecíficos no lisan las células negativas a PSMA. Se incubaron linfocitos T humanos preactivados con células de cáncer de próstata negativas a PSMA (DU145) y diferentes concentraciones de anticuerpos multiespecíficos. Ninguno de los anticuerpos analizados produjo lisis de estas células.

[0199] La FIG. 9 muestra la unión de anticuerpos multiespecíficos de PSMAxCD3 a células positivas y negativas a PSMA. Los anticuerpos anti-PSMA x anti-CD3 multiespecíficos muestran unión a células tumorales de próstata positivas a PSMA (22Rv1), pero no a células tumorales de próstata negativas a PSMA (DU145). La molécula biparatópica (350123) mostró la unión celular más fuerte en el objetivo.

[0200] La FIG. 10 representa la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA. Los datos de la FIG. 10 demuestran que la unión a PSMA a través de dos epítopos diferentes da como resultado una mayor destrucción celular en comparación con una versión bivalente pero monoespecífica del anticuerpo.

Ejemplo 7: Un anticuerpo monoparatópico PSMAxCD3 biespecífico induce menos producción de citocinas que un anticuerpo biparatópico PSMAxCD3 multiespecífico

[0201] La producción de citocinas se analizó en ensayos de citotoxicidad tumoral con linfocitos T en reposo. El diseño de estos ensayos se detalla en otra parte. Los sobrenadantes se recogieron una vez completados los ensayos (después de 72 horas de incubación para los ensayos que utilizan células 22Rv1, 48 horas para todas las demás líneas celulares). Se utilizaron kits de ELISA para la detección de IL-2 (Biolegend 431804) e IFN γ (Biolegend 430104) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes experimentales se diluyeron antes del análisis en los ELISA de modo que los niveles de citocinas cayeran dentro de la parte lineal de la curva estándar suministrada con cada kit. En algunos casos, no se pudieron detectar citocinas en los pocillos del experimento, y los valores se informaron como menores o iguales al límite inferior de cuantificación para el ensayo.

[0202] La FIG. 12, paneles A-C, muestra la lisis mediada por linfocitos T de células positivas a PSMA y la comparación con la producción de citocinas. Los anticuerpos PSMAxCD3 multiespecíficos inducen la lisis mediada por linfocitos T de la línea celular de cáncer de próstata positiva para PSMA LNCaP. La molécula biparatópica (350123) estimuló una destrucción de células tumorales más potente en comparación con la molécula monoparatópica (346181), pero también provocó la producción de niveles más altos de las citocinas interferón gamma (IFN γ) e interleucina 2 (IL-2), como se ejemplifica en la Figura 12, panel B y panel C.

[0203] La Tabla 10 muestra la lisis mediada por linfocitos T y la producción de citocinas contra cuatro líneas de células tumorales de próstata positivas a PSMA. Los anticuerpos multiespecíficos de PSMAxCD3 se probaron en ensayos de citotoxicidad de células tumorales *in vitro* mediante el uso de linfocitos T no estimulados y una serie de dosis de anticuerpos contra un panel de cuatro líneas de células tumorales positivas a PSMA. Después de 72 horas (22Rv1) o 48 horas (MDA-PCa-2b, LNCAP, PC3-PSMA), se calculó el porcentaje de destrucción de células tumorales y se informó mediante EC50, así como el porcentaje de destrucción más alto logrado. Los sobrenadantes de estos pocillos experimentales se recogieron y analizaron mediante ELISA para las citocinas interferón-gamma (IFN γ) o interleucina-2 (IL-2). La molécula monoparatópica (3461881) indujo niveles aproximadamente equivalentes de citotoxicidad tumoral contra las cuatro líneas celulares probadas en comparación con la molécula biparatópica, pero tenía EC50 más altas para la producción de citocinas y en la mayoría de los casos estimuló niveles más bajos de producción máxima de citocinas.

[0204] Tabla 10: lisis mediada por células T y la producción de citoquinas contra cuatro líneas de células tumorales de próstata positivas a PSMA.

Línea celular	Anticuerpo	Unión celular EC50 (nM)	Citotoxicidad máxima (% lisis)	Mata EC50 (nM)	IFN γ máx. (pg/mL)	EC50 IFN γ (nM)	IL-2 máx. (pg/ml)	EC50 IL-2 (nM)
22Rv1	346181xCD3	58	45	52,8	21 150	173,8	≤LLOQ	NA
	350123xCD3	3	53	0,42	73 031	380,2	≤LLOQ	NA
MDA-PCa-2b	346181xCD3	28	26	23,6	14 309	116,5	524	38,5
	350123xCD3	2	29	0,41	12 026	0,90	1111	1,11
LNCAP	346181xCD3	17	79	14,6	32 237	63,0	183	575
	350123xCD3	2	75	0,84	60 397	3,29	1057	3,73
PC3-PSMA	346181xCD3	30	42	3,7	7340	10,1	1569	4,1
	350123xCD3	6	51	0,40	10 136	1,01	3480	1,1

Ejemplo 8: Los anticuerpos multiespecíficos PSMAxCD3 inducen la proliferación de linfocitos T

[0205] Se sembraron células tumorales positivas a PSMA a razón de 25,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche a 37°C. Se marcaron linfocitos T pan humanos aislados de PBMC en reposo (Miltenyi 130-096-535) con el tinte de rastreo de linaje CFSE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFisher C34554). A continuación, se añadieron 100 000 linfocitos T pan marcados a los pocillos que contenían las células tumorales, seguido de una serie de diluciones de anticuerpos y se incubaron a 37°C, CO₂ al 8%. Después de 5 días de incubación, las células se mezclaron suavemente y se transfirieron a una placa de citometría de flujo. Las células se sedimentaron y se eliminó el sobrenadante, seguido de tinción con anti-CD8 conjugado con APC (Biolegend 301049) y anti-CD4 conjugado con PE (Biolegend 317410) durante 20 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de citometría de flujo para su análisis (BD FACSCelesta). Las células se activaron en la dispersión frontal y lateral y en la expresión de CD4 o CD8. El porcentaje de linfocitos T que habían proliferado, como lo indica la tinción positiva para CD4 o CD8 y la señal de CFSE baja o negativa, se calculó para toda la población de linfocitos T, así como para los subconjuntos CD4 y CD8. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante el uso de FlowJo y se trazaron en GraphPad Prism 7.

[0206] La FIG. 11, paneles A-D, muestra que los anticuerpos multiespecíficos de PSMAxCD3 estimularon la proliferación de linfocitos T en presencia de células tumorales positivas a PSMA, y que los anticuerpos biespecíficos de PSMA monoparatópicos activan preferentemente los linfocitos T CD3.

Se incubaron anticuerpos multiespecíficos junto con células tumorales que expresan PSMA y linfocitos T marcados con el tinte de rastreo de linaje CFSE. Después de 5 días de incubación, la proliferación de linfocitos T y la composición de los linfocitos T proliferados (CD8+ versus CD4+) fueron analizados por citometría de flujo. Los paneles A y B muestran la proliferación total de linfocitos T, mientras que los paneles C y D indican la relación de linfocitos T CD8+ a CD4+ en los pocillos proliferados. Una línea horizontal discontinua indica que la relación CD8:CD4 de linfocitos T no estimulados y es aproximadamente 1:2 (valor actual = 0,64). El anticuerpo biespecífico PSMAxCD3 monoparatópico (346181) activa preferentemente los linfocitos T CD8 (relación CD8:CD4 después de la expansión de alrededor de 2:1) mientras que el anticuerpo multiespecífico PSMAxCD3 biparatópico (350123) activa menos preferentemente los linfocitos T CD8+ (relación CD8:CD4 de alrededor de 1:1).

Ejemplo 9: Un anticuerpo multiespecífico provoca la supresión del crecimiento del tumor de próstata en un modelo de xenoinjerto

[0207] Se implantaron ratones CIEA-NOG inmunodeficientes machos de 5-6 semanas de edad (Taconic) con 10 millones de células 22Rv1 por vía subcutánea en sus flancos inferiores derechos, seguido de la adición de 10 millones de PBMC humanas mediante inyección en la vena de la cola un día después de la implantación del tumor. Los animales recibieron tratamiento con 100 µg de anticuerpo multiespecífico o vehículo por inyección en la vena de la cola empezando un día después de la implantación del tumor en los días 1, 5, 9 y 13. El volumen del tumor se cuantificó mediante el uso de calibradores y se registró durante 25 días.

[0208] La FIG. 13 muestra los resultados del modelo de xenoinjerto de tumor 22Rv1. La molécula biparatópica PSMAxCD3 (350123) mostró inhibición del crecimiento tumoral 22Rv1 en un modelo de xenoinjerto tumoral. Se probaron tres ratones para cada grupo de tratamiento, y el cambio en el volumen del tumor para cada animal se representó en milímetros cúbicos. Los animales recibieron PBMC el día 1 después de la implantación del tumor y se trataron con anticuerpos los días 1, 5, 9 y 13. Dos de los tres animales tratados con anticuerpos multiespecíficos mostraron un retraso en la progresión del tumor.

[0209] Si bien en la presente se mostraron y se describieron modalidades preferidas de la invención, será evidente para los expertos en la técnica que dichas modalidades se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas variaciones, cambios y sustituciones sin alejarse del espíritu de la invención. Se comprenderá que es posible emplear diversas alternativas a las modalidades de la invención que se describieron en la presente a la hora de poner en práctica la invención. Se pretende que las reivindicaciones que siguen a

continuación definan el alcance de la invención, y que estas comprendan los métodos y estructuras dentro del alcance de las reivindicaciones y sus equivalentes.