

PROTEÍNAS DE UNIÓN CONDICIONALMENTE ACTIVADAS RESTRINGIDAS

I. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [0001] Esta solicitud reclama prioridad bajo 35 U.S.C. §119(e) a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 62/555,943 presentada el 8 de septiembre de 2017, la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 62/586,627 presentada el 15 de noviembre de 2017 y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 62/587,318 presentada el 16 de noviembre de 2017, todas las cuales son incorporado expresamente aquí por referencia en su totalidad.

II. REFERENCIA A UN "LISTADO DE SECUENCIAS", UN CUADRO O UN APÉNDICE DE LISTADO DE PROGRAMAS INFORMÁTICOS PRESENTADOS EN UN DISCO COMPACTO

15 [0002] La lista de secuencias contenida en el archivo llamado "118459-5005_ST25.txt" y que tiene un tamaño de 984 kilobytes, se ha enviado electrónicamente a través de EFS-Web, y los contenidos del archivo txt se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

III. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 [0003] La destrucción selectiva de una célula individual o un tipo de célula específico a menudo es deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, el objetivo principal de la terapia contra el cáncer es destruir específicamente las células tumorales, mientras se dejan las células y tejidos sanos lo más intactos y sin daños posible. Uno de estos métodos es induciendo una
25 respuesta inmune contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunes, como las células asesinas naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan las células tumorales.

[0004] El uso de anticuerpos monoclonales intactos (mAb), que proporcionan una especificidad y afinidad de unión superiores por un antígeno asociado a tumor, se ha aplicado con éxito en el área
30 del tratamiento y diagnóstico del cáncer. Sin embargo, el gran tamaño de los mAbs intactos, su pobre distribución biológica, su baja potencia y su larga persistencia en el grupo sanguíneo han limitado sus aplicaciones clínicas. Por ejemplo, los anticuerpos intactos pueden exhibir acumulación específica dentro del área del tumor. En los estudios de biodistribución, se observa

una distribución de anticuerpos no homogénea con acumulación primaria en las regiones periféricas cuando se investiga con precisión el tumor. Debido a la necrosis tumoral, la distribución de antígeno no homogénea y el aumento de la presión del tejido intersticial, no es posible llegar a las porciones centrales del tumor con construcciones de anticuerpos intactos. En contraste, los fragmentos de anticuerpos más pequeños muestran una rápida localización del tumor, penetran más profundamente en el tumor y también se eliminan relativamente rápido del torrente sanguíneo.

Sin embargo, muchos anticuerpos, incluidos scFv y otras construcciones, muestran efectos "en el tumor objetivo/desactivado", en los que la molécula es activa en las células no tumorales, causando efectos secundarios, algunos de los cuales pueden ser tóxicos. La presente invención está relacionada con nuevas construcciones que se activan selectivamente en presencia de proteasas tumorales.

IV. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] La presente invención proporciona varias composiciones de proteínas diferentes para el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona proteínas de "Formato 2" que comprenden, desde el N al C terminal: un primer dominio de unión a antígeno de dominio único (sdABD) que se une a un antígeno objetivo de tumor humano (TTA) (sdABD-TTA); b) un primer enlazador de dominio; c) un dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio pesado variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3; ii) un enlazador no escindible restringido (CNCL); y iii) un primer dominio ligero variable que comprende vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3; d) un segundo enlazador de dominio; e) un segundo sdABD-TTA; f) un enlazador escindible (CL); g) un pseudo dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio variable pseudo ligero; ii) un enlazador no escindible (NCL); y iii) un primer dominio variable pseudo pesado; h) un tercer enlazador de dominio; y i) un tercer sdABD que se une a la albúmina sérica humana; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3; dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y dicho primer dominio ligero variable y dicho primer dominio pesado pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo.

[0006] En otro aspecto, la invención proporciona proteínas de "Formato 1" que comprenden, desde el N- al C-terminal: a) un primer sdABD-TTA; b) un primer enlazador de dominio; c) un dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio pesado variable que comprende un

vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3; ii) un enlazador escindible restringido (CCL); y iii) un primer dominio ligero variable que comprende vLCDR1, vLCDR2 y vLCDR3; d) un segundo enlazador de dominio; e) un segundo sdABD-TTA; f) un enlazador escindible (CL); g) un pseudo dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio variable pseudo ligero; ii) un enlazador no escindible (NCL); y iii) un primer dominio variable pseudo pesado; h) un tercer enlazador de dominio; yi) un tercer sdABD que se une a la albúmina sérica humana; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dicho primer dominio ligero variable y dicho primer dominio pesado pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona proteínas de "Formato 4" que comprenden, de N a C terminal: a) un dominio de unión a antígeno de dominio único (sdABD) que se une a un antígeno objetivo de tumor humano (TTA) (sdABD-TTA) ; b) un primer enlazador de dominio; c) un dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio pesado variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3; ii) un enlazador no escindible restringido (CNCL); y iii) un primer dominio ligero variable que comprende vLCDR1, vLCDR2 y vLCDR3; d) un enlazador escindible (CL); e) un segundo sdABD que se une a la albúmina sérica humana; f) un enlazador de dominio; g) un pseudo dominio Fv restringido que comprende: i) un primer dominio variable pseudo ligero; ii) un enlazador no escindible (NCL); y iii) un primer dominio variable pseudo pesado; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dicho primer dominio ligero variable y dicho primer dominio pesado pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo.

[0007] En otro aspecto de las proteínas de Formato 1, Formato 2 y Formato 4 enumeradas anteriormente, dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho dominio variable pseudo ligero es N-terminal a dicho dominio pesado pseudo pesado.

[0008] En otro aspecto de las proteínas de Formato 1, Formato 2 y Formato 4 enumeradas anteriormente, dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho dominio pesado pseudo variable es N-terminal a dicho dominio ligero pseudo variable.

[0009] En otro aspecto de las proteínas de Formato 1, Formato 2 y Formato 4 enumeradas

anteriormente, dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho dominio ligero pseudo variable es N-terminal a dicho dominio pesado pseudo variable.

[0010] En otro aspecto de las proteínas de Formato 1, Formato 2 y Formato 4 enumeradas anteriormente, dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho dominio pesado pseudo variable es N-terminal a dicho dominio ligero pseudo variable.

[0011] En un aspecto adicional, la invención proporciona proteínas de Formato 1 y 2 en las que dicho primer y segundo TTA son iguales.

[0012] En otro aspecto, la invención proporciona proteínas de Formato 1 y 2 en las que dicho primer y segundo TTA son diferentes.

[0013] En un aspecto adicional, la invención proporciona proteínas de Formato 1, 2 y 4 en las que dicho primer y segundo TTA se seleccionan de EGFR, EpCAM, FOLR1 y B7H3. Estas secuencias se pueden seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.

[0014] En otro aspecto, la invención proporciona proteínas de Formato 1, 2 y 4 en las que dicho dominio de extensión de la vida media tiene la SEQ ID NO: 45.

[0015] En un aspecto adicional, la invención proporciona proteínas de Formato 1, 2 y 4 en las que dicho enlazador escindible es escindido por una proteasa humana seleccionada del grupo que consiste en MMP2, MMP9, meprina A, meprina B, catepsina S, catepsina K, catepsina L, GranzimaB, uPA, Kallekriein7, matriptasa y trombina.

[0016] En otro aspecto, la invención proporciona una proteína seleccionada del grupo que consiste en Pro186, Pro225, Pro226, Pro233, Pro311, Pro312, Pro313, Pro495, Pro246, Pro254, Pro255, Pro256, Pro420, Pro421, Pro432, Pro479, Pro480, Pro187, Pro221, Pro222, Pro223, Pro224, Pro393, Pro394, Pro395, Pro396, Pro429, Pro430 y Pro431.

[0017] En un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican una proteína de Formato 1, Formato 2 o Formato 4 como se describe en el presente documento, así como vectores de expresión y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos que codifican la proteína.

[0018] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para fabricar las proteínas de la invención y métodos para tratar pacientes que los necesitan.

[0019] En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden pares de proteínas de profármacos "Formato 3A", que comprenden: a) una primera proteína que

comprende, de N a C terminal: i) un primer sdABD-TTA; ii) un primer enlazador de dominio; iii) un pseudo dominio Fv que comprende, desde el N al C terminal: 1) una cadena pesada variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3; 2) un enlazador escindible; y 3) un primer pseudo dominio ligero variable que comprende iVLCDR1, iVLCDR2 e iVLCDR3; iv) un segundo enlazador de dominio; v) un sdABD-HSA; a) una primera segunda proteína que comprende, de N a C terminal: i) un tercer sdABD que se une a un antígeno objetivo tumoral humano; ii) un tercer enlazador de dominio; iii) un pseudo dominio Fv que comprende, desde el N a C terminal: 1) una cadena ligera variable que comprende una VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3; 2) un enlazador escindible; y 3) un primer pseudo dominio pesado variable que comprende iVHCDR1, iVHCDR2 e iVHCDR3; iv) un cuarto enlazador de dominio; v) un sdABD-HSA; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unirse a CD3 humano cuando está asociado; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo; en donde dicho primer dominio ligero variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dichos primer y tercer sdABD se seleccionan del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.

[0020] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden pares de proteínas de profármacos "Formato 3B", que comprenden a) una primera proteína que comprende, desde el N al C terminal: i) un primer sdABD-TTA; ii) un primer enlazador de dominio; iii) un segundo sdABD-TTA; iv) un segundo enlazador de dominio; iii) un pseudo dominio Fv que comprende, desde el N al C terminal: 1) una cadena pesada variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3; 2) un enlazador escindible; y 3) un primer pseudo dominio ligero variable que comprende iVLCDR1, iVLCDR2 e iVLCDR3; iv) un enlazador de tercer dominio; y v) un sdABD-HSA; a) una primera segunda proteína que comprende, de N a C terminal: i) un tercer sdABD-TTA; ii) un cuarto enlazador de dominio; iii) un cuarto sdABD-TTA; iv) un quinto enlazador de dominio; iii) un pseudo dominio Fv que comprende, desde el N a C terminal: 1) una cadena ligera variable que comprende una VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3; 2) un enlazador escindible; y 3) un primer pseudo dominio pesado variable que comprende iVHCDR1, iVHCDR2 e iVHCDR3; iv) un sexto enlazador de dominio; v) un sdABD-HSA; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unirse a CD3 humano cuando está asociado; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dicho primer dominio ligero

variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo.

[0021] En un aspecto adicional, las proteínas de Formato 3A y Formato 3B tienen sdABD-HSA que tienen SEQ IDNO:45.

- 5 [0022] En otro aspecto, las proteínas de Formato 3A y Formato 3B tienen sdABD-TTA que se une a un TTA seleccionado de EGFR, EpCAM, FOLR1 y B7H3. Los sdABD-TTA se pueden seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ IDNO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.
- 10 [0023] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden primeros ácidos nucleicos que codifican los primeros miembros proteicos del par de profármacos y segundos ácidos nucleicos que codifican los segundos miembros proteicos de los pares, y vectores de expresión y células huésped que contienen el ácidos nucleicos.

15 V. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- [0024] La figura 1 representa el tipo de "Formato 1" de activación de proteasas de la presente invención, denominado en el presente documento "construcciones restringidas y escindibles" o "construcciones cc". En esta modalidad, una construcción representativa es Pro140: hay ABD para
- 20 dos TTA (como se representa en la figura 1, ambos son iguales, aunque como se describe en el presente documento pueden ser diferentes). Tras la escisión, la construcción del profármaco se divide en tres componentes, uno que contiene un dominio α -TTA enlazado a través de un enlazador de dominio a un VH activo de α CD3, el segundo que contiene un dominio α -TTA enlazado a través de un enlazador de dominio a un VL activo de α CD3, y una pieza "sobrante" que
- 25 comprende el dominio de extensión de vida media enlazado a los VH y VL inactivos. Los dos dominios variables activos son libres de asociarse para formar un dominio de unión funcional anti-CD3. Cabe señalar que en las modalidades de "Formato 1", el componente activo resultante es trivalente: existe una unión monovalente a CD3 y una unión bivalente al TTA, lo que produce una proteína de unión biespecífica, aunque en algunos casos esta trivalencia podría ser trispecífica,
- 30 con unión monovalente a CD3, unión monovalente a un primer TTA y unión monovalente a un segundo TTA. La figura 1 también muestra un dominio de albúmina sérica antihumana (HSA) como un dominio de extensión de vida media, en muchas modalidades un sdABD como se define en el presente documento, aunque como se discute en el presente documento, esto es opcional y/o puede ser reemplazado por otros dominios de extensión de vida media; adicionalmente, el

dominio de extensión de vida media también puede ser N-terminal a la construcción o también interna. La figura 1 también tiene el VH y VL del Fv e iVH e iVL del pseudo Fv en un orden específico, por ejemplo desde el N al C terminal, VH-enlazador-VL (e iVL-enlazador-iVH) aunque, como apreciarán los expertos en la materia, estos pueden revertirse (VL-enlazador-VH e iVH-enlazador-iVL). Alternativamente, uno de estos Fvs puede estar en una orientación y el otro en la otra orientación, aunque la expresión de proteína en la orientación como se muestra aquí fue sorprendentemente más alta que las otras orientaciones.

[0025] La figura 2 representa el tipo de "Formato 2" de activación de proteasas de la presente invención, denominado en el presente documento como "construcciones restringidas, no escindibles", o "construcciones CNCL", también a veces denominadas en el presente documento como "construcciones de dimerización" como se discute aquí. Estas construcciones no se isomerizan como se discute aquí. Tras la escisión, dos construcciones de profármacos se dividen en cuatro componentes, dos dominios de extensión de vida media (en este caso, sdABD a HSA) enlazados a dos pseudo dominios (que pueden o no autoasociarse, dependiendo de la longitud de los enlazadores y las mutaciones inactivadoras), y dos radicales activos que se autoensamblan en un radical activo dimérico que contiene cuatro dominios anti-TTA (que pueden ser todos iguales o dos son iguales y los otros dos son diferentes). Cabe señalar que en las modalidades de "Formato 2", el componente activo resultante es hexavalente: hay unión bivalente a CD3 y unión cuadrivalente al TTA, lo que produce una proteína de unión biespecífica, aunque en algunos casos esta hexavalencia podría ser triespecífica, con unión bivalente a CD3, unión bivalente a un primer TTA y unión bivalente a un segundo TTA. La figura 2 también muestra un dominio de albúmina sérica antihumana (HSA) como un dominio de extensión de vida media, en muchas modalidades un sdABD como se define en el presente documento, aunque como se discute en el presente documento, esto es opcional y/o puede ser reemplazado por otros dominios de extensión de vida media; adicionalmente, el dominio de extensión de vida media también puede ser N-terminal a la construcción o también interna. La figura 2 también tiene el VH y VL del Fv e iVH e iVL del pseudo Fv en un orden específico, por ejemplo desde el N al C terminal, VH-enlazador-VL (e iVL-enlazador-iVH) aunque, como apreciarán los expertos en la materia, estos pueden revertirse (VL-enlazador-VH e iVH-enlazador-iVL). Alternativamente, uno de estos Fvs puede estar en una orientación y el otro en la otra orientación, aunque la expresión de proteína en la orientación como se muestra aquí fue sorprendentemente más alta que las otras orientaciones.

[0026] La figura 3A - figura 3B representan construcciones de tipo "Formato 3", a veces también denominadas "hemi-construcciones" o "hemi-COBRA™" como se describe aquí, ya que estas son dos cadenas de polipéptidos diferentes que juntas forman un MCE terapéutico como se

discute adicionalmente en este documento. En esta modalidad, las construcciones se entregan en pares, con el autoensamblaje intramolecular previo a la escisión que da como resultado dominios inactivos anti-CD3 Fv. Tras la escisión, se liberan los dominios variables inertes, y los dos dominios variables activos se ensamblan intermolecularmente para formar un dominio de unión activo anti-CD3. Los dos sdABD-TTA se unen al receptor correspondiente en la superficie de la célula tumoral, y la escisión se realiza mediante una proteasa. Esto permite el ensamblaje intermolecular, ya que las moléculas se mantienen físicamente en su lugar, lo que favorece el ensamblaje del dominio activo anti-CD3. Como anteriormente se mencionó para los Formatos 1 y 2, en esta modalidad, el orden de N a C terminal de los dominios variables puede invertirse o mezclarse también. Además, el sdABD (HSA) puede estar en el N o C terminal de cada hemi-construcción. Pro16 tiene el sdABD (HSA) en el C terminal y Pro17 lo tiene en el N terminal (consulte Pro19, SEQ IDNO: XX, tiene el sdABD (HSA) en el C terminal). La figura 3A muestra construcciones de Formato 3 con un solo dominio sdABD-TTA por hemi-construcción, y la figura 3B muestra construcciones de Formato 3 con dos sdABD-TTA por hemi-construcción, en un formato de "doble direccionamiento" o "hetero-direccionamiento". Tenga en cuenta que la figura 3B usa FOLR1 y EGFR como los dos TTA, pero también se pueden usar otras combinaciones como se describe aquí.

[0027] La figura 4 representa el tipo de construcciones de "Formato 4" que son similares a las construcciones de "Formato 2" pero que tienen un solo sdABD-TTA. La figura muestra el sdABD-TTA a EGFR, pero como apreciarán los expertos en la técnica, también se puede usar otro TTA. Tras la escisión, la construcción del profármaco se divide en dos componentes, un dominio de extensión de vida media (en este caso, sdABDs a HSA) unido a un pseudo Fv y un radical activo, que en presencia de un segundo radical activo de una molécula separada diferente, se autoensambla en un radical activo dimérico que contiene dos dominios anti-TTA. Debe observarse que en las modalidades de "Formato 4", el componente activo resultante es cuadrivalente: existe una unión bivalente a CD3 y una unión bivalente a TTA, que produce una proteína de unión biespecífica. La figura 4 también muestra un dominio de albúmina sérica antihumana (HSA) como un dominio de extensión de vida media, en muchas modalidades un sdABD ($\frac{1}{2}$) como se define en el presente documento, aunque como se discute en el presente documento, esto es opcional y/o puede ser reemplazado por otro dominios de extensión de vida media; adicionalmente, el dominio de extensión de vida media también puede ser N-terminal a la construcción o también interna. La figura 4 también tiene el VH y VL del Fv e iVH e iVL del pseudo Fv en un orden específico, por ejemplo desde el N al C terminal, VH-enlazador-VL (e iVL-enlazador-iVH) aunque, como apreciarán los expertos en la materia, estos pueden revertirse (VL-enlazador-VH e iVH-enlazador-

iVL). Alternativamente, uno de estos Fvs puede estar en una orientación y el otro en la otra orientación, aunque la expresión de proteína en la orientación como se muestra aquí fue sorprendentemente más alta que las otras orientaciones.

[0028] La figura 5A - figura 5G representan una serie de secuencias de la invención. Para dominios de unión a antígeno, las CDR están subrayadas. Como se describe más completamente en este documento, estos dominios se pueden ensamblar en una amplia variedad de configuraciones en la presente invención, incluidas las orientaciones de "Formato 1", "Formato 2", "Formato 3" y "Formato 4". Es de notar que la SEQ ID NO: 90 es escindida por MMP9 un poco más rápido que la SEQ ID NOS: 75 y 76, y la SEQ ID NO: 91 es escindida más lentamente que la SEQ ID NOS: 75 y 76.

[0029] La figura 6A - figura 6B representan una serie de sitios de escisión de proteasa adecuados. Como apreciarán los expertos en la técnica, estos sitios de escisión pueden usarse como enlazadores escindibles. En algunas modalidades, por ejemplo, cuando se requieren enlazadores escindibles más flexibles, puede haber aminoácidos adicionales (generalmente glicinas y serinas) que son uno o ambos terminales N y C a estos sitios de escisión.

[0030] La figura 7A - figura 7D representan algunos datos asociados con las estructuras "Formato 3" o "hemi-COBRA™". Esto muestra que las construcciones de Formato 3 se unen cooperativamente a CD3 después de la escisión por proteasa (en este caso, la proteasa EK, aunque se puede usar cualquiera de los sitios de escisión de proteasa descritos aquí y representados en la figura 5 y la figura 6) y crear un sitio de unión a CD3, como se muestra en un análisis FACS intercalado.

[0031] La figura 8A - figura 8D muestra que la escisión de la proteasa activa de forma cooperativa la destrucción de células T de células objetivo EGFR+ con pares complementarios hemi-COBRA™. La figura 8A y la figura 8B muestran que las construcciones aisladas, pero escindidas con diferentes concentraciones de proteasa, no afectan la viabilidad de la célula objetivo. Sin embargo, la figura 8C muestra que, en combinación, en presencia de proteasa, la viabilidad de la célula objetivo disminuye significativamente. La figura 8D muestra el mecanismo general.

[0032] La figura 9 muestra algunos controles no objetivo para usar en los ensayos para probar la eficacia de las construcciones de Formato 1.

[0033] La figura 10A - figura 10F muestran que la generación de un dominio de unión a CD3 activo depende de la unión a objetivo de ambos "brazos", por ejemplo los dominios sdABD-TTA, uno de los cuales está en cada una de las dos construcciones. El ensayo TDCC se realizó como se describe en los ejemplos.

[0034] La figura 11 muestra el esquema de pares hemi-COBRA™ adecuados. "Mep" significa un

sitio de escisión de proteasa de meprina, "His-6" es una etiqueta como se describe más detalladamente en este documento, ST14 es un sitio de escisión de proteasa de matriptasa y "Thb" es un sitio de escisión de proteasa de trombina.

[0035] La figura 12A - figura 12C muestran los datos de TDCC asociados con las construcciones de la figura 11. La figura 12A muestra que la adición de pares hemi-COBRA precortados da como resultado la eficacia en las células OvCAR8, la figura 12B muestra que la adición de los pares hemi-COBRA pre-cortados dan como resultado eficacia en las células HCT116, y la figura 12C muestra que la adición de pares hemi-COBRA pre-cortados da como resultado la eficacia en las células LoVo, todas las cuales son líneas celulares cancerosas.

[0036] La figura 13A - figura 13B muestra que el enlazador MMP9 es estable in vivo. A los ratones NSG se les administró una dosis única de bolo intravenoso de Pro40 (MMP9 escindible), Pro74 (no escindible) a través de la vena de la cola a un nivel de dosis de 0.5 mg/kg. La solución de dosis para cada compuesto se preparó en un vehículo de ácido cítrico 25 mM, L-arginina 75 mM, NaCl 75 mM y sacarosa al 4%, pH 7.0. Se recolectaron dos muestras de sangre en tiempos preseleccionados de cada animal, una hacia el comienzo del estudio, recolectada por sangrado orbital o sangrado submandibular, y otra en el punto terminal por punción cardíaca. Los puntos de tiempo para la extracción de sangre fueron 0.083, 1, 6, 24, 72 y 168 h. Se preparó plasma a partir de cada muestra de sangre individual usando tubos EDTA K2. Las concentraciones se determinaron usando un ensayo de MSD con un MAb específico para el sdABD anti-HSA y se detectaron con el dominio extracelular EGFR.

[0037] La figura 14 representa los esquemas de las construcciones hemi-COBRA™ de Formato 3A utilizadas en los experimentos representados en la figura [[14]] 15. Pro51 es el control positivo, ya que está "siempre activado", ya que forma un activo anti-CD3 Fv. Pro98 es un control negativo, ya que su sdABD está dirigido contra la lisozima del huevo de gallina, que el tumor no expresa. Pro77 y Pro53 son el par de profármacos Formato 3A, que usan sdABD contra EGFR y un sitio de escisión MMP9. Pro74 y Pro72 son un par de Formato 3A de control negativo, ya que no tienen sitios de escisión.

[0038] La figura 15 muestra que las construcciones de Formato 1 funcionan para hacer retroceder tumores in vivo, usando dos líneas celulares tumorales diferentes implantadas en ratones usando los protocolos en los ejemplos. La actividad antitumoral con las construcciones hemi-COBRA (Pro77 y Pro53) dependía de la inclusión de los sdABD anti-EGFR y los enlazadores escindibles MMP9, junto con el Fv anti-CD3 activo.

[0039] La figura 16 muestra el esquema del formato de la próxima generación, una construcción de longitud completa que tiene dos dominios pseudo Fv con sitios escindibles entre ellos, como se

describe generalmente en el documento US 2018/0134789, incorporado aquí como referencia. Sin embargo, como se muestra en las siguientes figuras, esta construcción de longitud completa de primera generación no muestra muy buena condicionalidad, ya que puede isomerizarse para formar tanto una construcción activa como inactiva.

5 [0040] La figura 17 muestra que los pares de construcciones de Formato 3A en realidad muestran una mejor condicionalidad que las construcciones de longitud completa Pro100 de primera generación.

[0041] La figura 18 representa construcciones de longitud completa de primera generación adicionales que se probaron en la figura 19.

10 [0042] La figura 19 muestra que las construcciones de primera generación muestran una alta actividad incluso en el Formato sin escindir, por ejemplo, poca condicionalidad.

[0043] La figura 20 muestra que las construcciones de longitud completa de primera generación muestran dos picos de monómero en la SEC analítica.

[0044] La figura 21 muestra el esquema de la razón de la actividad no escindida, que es que las construcciones de primera generación de longitud completa se isomerizan para formar dos conformaciones, una que está inactiva ya que no se forma un Fv anti-CD3 activo (el "scFv bivalente"), y el otro que está activo en ausencia de proteasa, un tipo de configuración de "diacuerpo de cadena única". Ver PEDS 23 (8): 667-677 (2010).

20 [0045] La figura 22 muestra los resultados de un ensayo TDCC, realizado a 37°C durante 2 días, con las construcciones de cadena única de primera generación. Los resultados muestran que las construcciones sin cortar muestran una fuerte matanza. Estos resultados llevaron a la generación de las construcciones de Formato 1.

[0046] La figura 23A - figura 23G muestran construcciones de Formato 1 usadas en la invención. Como apreciarán los expertos en la técnica y se describirán aquí, estos se representan con un radical de direccionamiento sdABD-EGFR, aunque pueden usarse sdABD para otros TTA.

[0047] La figura 24 muestra que las construcciones de Formato 1 (Pro140 en este caso) forman un isómero único que es estable a 37°C.

[0048] La figura 25 representa que las construcciones de Formato 1 tienen una unión muy baja al CD3 humano en el formato no escindido, medido por un ensayo Octet. La línea superior es Pro120, la línea central es Pro51 (el control positivo) y las líneas inferiores son Pro140 mantenidas a 4°C o 37°C durante 3 días.

[0049] La figura 26 representa de manera similar que las construcciones de Formato 1 tienen una actividad TDCC muy baja en la forma no escindida.

[0050] La figura 27 representa una construcción específico de Formato 1, Pro140, usado en

pruebas in vivo, usando sdABD-EGFR como radicales de direccionamiento y un sitio de escisión MMP9.

[0051] La figura 28A - figura 28B muestran la regresión tumoral usando una construcción de Formato 1.

- 5 [0052] La figura 29 representa que debido al sitio de escisión en el Fv restringido, se pueden generar varios fragmentos diferentes: un fragmento parcialmente escindido y el fragmento completamente escindido. Sorprendentemente, el formato parcialmente dividido es más activo que el formato completamente dividido, lo que lleva a la generación del Formato 2.

- 10 [0053] La figura 30 muestra una serie de esquemas de Formato 2, todos los cuales usan dominios de direccionamiento sdABD-EGFR, aunque como se describe en este documento y se enumera en las secuencias, se pueden usar sdABD a otros TTA. Pro51 y Pro201 son controles positivos (en una configuración "hemi" activa), y Pro214 es un control negativo de longitud completa, ya que no hay un sitio de escisión.

- 15 [0054] La figura 31 muestra la actividad de TDCC de la construcción de Formato 2 Pro187, que usa un sitio de escisión de meprina. Pro187 en el ensayo TDCC fue 1200 veces más activo cuando se agregó previamente escindido que cuando se agregó sin escindir. El Pro187 previamente escindido demostró actividad que cayó entre los controles positivos Pro51 y Pro201. El Pro187 sin escindir demostró una actividad similar a Pro214, que no contiene un enlazador escindible por proteasa.

- 20 [0055] La figura 32 muestra la actividad de TDCC de la construcción de Formato 2 Pro186, que usa n sitio de escisión MMP9. Pro186 en el ensayo de TDCC fue 18 veces más activo cuando se agregó previamente escindido que cuando se agregó sin escindir. El Pro186 previamente escindido demostró actividad que cayó entre los controles positivos Pro51 y Pro201. El Pro186 sin escindir demostró más actividad que Pro214, que no contiene un enlazador escindible por proteasa.

- 25 [0056] La figura 33 representa que la construcción Pro186 se une a células que tienen diferentes niveles de receptores EGFR, con células CHO que no expresan EGFR en la superficie celular. Pro186 satura las células que expresan diferentes niveles de EGFR a concentraciones similares de COBRA.

- 30 [0057] La figura 34 muestra los esquemas de las construcciones de Formato 2 usadas en los estudios in vivo de la figura 35, todos los cuales usan dominios de direccionamiento sdABD-EGFR.

[0058] La figura 35 muestra que el constructo de Formato 2 Pro186 es altamente eficaz en ambas concentraciones, y mejor que el constructo de Formato 1 Pro140 a la concentración más baja.

[0059] La figura 36 representa una serie de construcciones de Formato 2 basadas en Pro186 pero

con diferentes sitios de escisión de proteasa. Si bien todas estas construcciones utilizan sdABD-EGFR para ambos dominios de direccionamiento, se pueden usar otros sdABD para diferentes TTA, que pueden ser iguales o diferentes. Es decir, se pueden hacer tanto el homo-direccionamiento (ambas dirigidos a los sdABD al mismo TTA) como el hetero-direccionamiento (una sdABD a un primer TTA y la otra a un TTA diferente).

[0060] La figura 37 representa los esquemas para diferentes construcciones de Formato 2 que varían la longitud del enlazador entre los dominios Fv. Estos se muestran usando un sitio de escisión MMP9, aunque otros se pueden usar como se describe en este documento. Del mismo modo, si bien todas estas construcciones utilizan sdABD-EGFR para ambos dominios de direccionamiento, se pueden usar otros sdABD para diferentes TTA, que pueden ser iguales o diferentes.

[0061] La figura 38 muestra que la longitud del enlazador para el pseudo Fv se puede variar, por ejemplo que una construcción de Formato 2 con un enlazador corto entre el Fv activo ("activo corto") con un enlazador más largo entre el pseudo Fv ("inactivo largo") exhibe una actividad similar a un "activo corto" con un "inactivo corto". Por lo tanto, la condicionalidad de la construcción COBRA no depende de que los enlazadores scFv activos e inactivos estén restringidos; siempre y cuando uno de ellos esté restringido, el plegado de diacuerpos de cadena sencilla parece preferirse al plegado bivalente de scFv.

[0062] La figura 39 muestra que la longitud del enlazador para el Fv activo se puede variar, por ejemplo que las construcciones de Formato 2 con "activo largo" y "inactivo corto" se comportan de manera similar a una construcción "activo corto" y "inactivo corto". Por lo tanto, la condicionalidad de la construcción COBRA no depende de que los enlazadores scFv activos e inactivos estén restringidos; siempre y cuando uno de ellos esté restringido, el plegado de diacuerpos de cadena sencilla parece preferirse al plegado bivalente de scFv.

[0063] La figura 40A - figura 40C muestran los esquemas para varias construcciones diferentes. Pro188 es una construcción de Formato 1 que es similar a Pro140 excepto con un enlazador largo (16mer) en el pseudo Fv. Pro189 y Pro190 (construcciones de Formato 2) son similares a Pro186 y Pro187, excepto con un enlazador largo (16mer) en el pseudo dominio Fv. Pro191 y Pro192 (también construcciones de Formato 2) son similares a Pro189 y Pro190, excepto que tienen un sitio de escisión adicional aguas arriba del sdABD (1/2). Pro193 (Formato 4) tiene un único dominio de direccionamiento EGFR, el iVH y el iVL reorganizados para estar en orden inverso, y un sitio de escisión adicional aguas arriba del sdABD (1/2). Pro195 es una construcción de Formato 2 similar a Pro186, con dominios de direccionamiento que se unen al mismo TTA, EGFR, pero a diferentes epítomos. Pro196, Pro197 y Pro198 son construcciones de Formato 2 con dominios variables

reorganizados.

[0064] La figura 41 representa el hecho de que diferentes clones de sdABD dirigidos a FOLR1 humano muestran destrucción diferencial. Una construcción de tipo Pro22 (Pro51 con una secuencia FLAG en lugar de una NCL) que se une a FOLR1 humano se comparó con una construcción Pro22-EGFR contra varias familias de líneas celulares.

[0065] La figura 42 representa los esquemas para cuatro construcciones sdABD-FOLR1, incluido el uso del control positivo Pro201 usando sdABD-EGFR2 (con dos moléculas que se asocian intermolecularmente para formar dos Fvs activos contra CD3) y dos artículos de prueba de Formato 2, Pro311, usando el h77.2 sdABD y Pro312 usando el h59.3 sdABD, así como dos controles negativos, Pro299, usando el h77.2 sdABD y Pro303 usando el h59.3 sdABD.

[0066] La figura 43 representa los esquemas de las construcciones de Formato 2 para el diseño in vivo de FOLR/MMP9.

[0067] La figura 44 muestra la eficacia de la construcción Pro312 in vivo, y demuestra que el enlazador divisible MMP9 es necesario para la actividad antitumoral.

[0068] La figura 45 representa los esquemas de algunos Formatos que usan sdABDs para B7H3 humano (sdABD-B7H3), incluido Pro244, el control positivo (que usa sdABD-B7H3 (hF7) (con dos moléculas que se asocian intermolecularmente para formar dos Fvs activos contra CD3) y dos artículos de prueba de Formato 2, Pro225, una construcción de Formato 2 y Pro295, el control negativo que carece de un sitio de escisión.

[0069] La figura 46 muestra que Pro225 tiene una gran condicionalidad en comparación con el control, Pro295.

[0070] La figura 47 muestra que una construcción de Formato 2 de usar un enlazador de meprina, Pro373, muestra una gran condicionalidad en comparación con Pro295.

[0071] La figura 48 representa una serie de construcciones sdABD-B7H3 (usando la secuencia hF12), que muestra el control positivo Pro51 usando sdABD-EGFR, el control positivo Pro244 usando sdABD-hF12 B7H3, la construcción de prueba, Pro226 y el control negativo Pro296 sin un sitio de escisión.

[0072] La figura 49 muestra la buena condicionalidad de la construcción Pro226 en un ensayo TDCC.

[0073] La figura 50 muestra la humanización de sdABD a EpCAM humana.

[0074] La figura 51 muestra los esquemas de varios Formatos: Pro22hVIB13 y Pro205 son controles positivos, Pro199 es una construcción de Formato 2 y Pro175 es el control negativo.

[0075] La figura 52 muestra la actividad TDCC de las construcciones sdABD-EpCAM, mostrando una buena condicionalidad.

[0076] La figura 53A - figura 53B muestra la actividad de TDCC de la construcción sdABD-EpCAM Pro199, mostrando una buena condicionalidad en los modelos celulares HT29 y LoVo.

[0077] La figura 54A - figura 54B muestra la actividad de TDCC de la construcción sdABD-EpCAM Pro200, mostrando una buena condicionalidad en los modelos celulares HT29 y LoVo.

5 [0078] La figura 55 muestra un esquema de Pro255, que usa dos sdABD-TTA diferentes, uno para EGFR (sdABD-EGFR) y el otro para EpCAM (sdABD-EpCAM), en comparación con Pro199, con dos sdABD de EpCAM duales. A veces se hace referencia en este documento a construcciones de "hetero-direccionamiento", en este caso, una construcción de Formato 2.

10 [0079] La figura 56 muestra que la molécula de doble objetivo Pro255 con un sitio de escisión MMP9 muestra buena condicionalidad.

[0080] La figura 57A - figura 57D muestra los resultados de experimentos en tres tipos de células diferentes. Primero, se crearon transfectantes Raji con niveles de expresión similares de EpCAM, EGFR y EpCAM + EGFR (datos no mostrados). Luego, Pro255, que se dirige tanto a EpCAM como a EGFR, se probó en ensayos TDCC utilizando cada tipo de célula. La figura 57A muestra la
15 línea Raji parental, que no expresa ninguno de los receptores. La figura 57B muestra la condicionalidad en la línea EpCAM. La figura 57C muestra la condicionalidad en la línea EGFR. La figura 57D muestra la condicionalidad en la línea EpCAM/EGFR.

[0081] La figura 58 representa los esquemas de una construcción de Formato 4, Pro258.

20 [0082] La figura 59A - figura 59B muestra que Pro258 es condicional tanto en FBS como en suero humano. La condicionalidad del enlazador MMP9 se subestima debido a la actividad MMP9 en el cultivo. Curiosamente, la actividad de Pro51 TDCC se inhibe por la unión de HSA, mientras que la actividad de Pro258 TDCC es similar a Pro51 en presencia de HSA. Finalmente, la condicionalidad Pro258 se ve algo mejorada en presencia de HSA por 6X.

[0083] La figura 60A -figura 60C muestra la escisión del sustrato MMP9 por otras MMP.

25 [0084] La figura 61A - figura 61B muestra algunas de las construcciones ejemplares y sus formatos.

[0085] La figura 62A - figura 62U muestra varias secuencias de la invención, aunque también se encuentran muchas secuencias adicionales en el listado de secuencias. Las CDR están subrayadas y en negrita, los enlazadores están doblemente subrayados (con los enlazadores escindibles en cursiva y doblemente subrayados) y las separaciones de dominios se indican con "/". Todas las etiquetas His6 son opcionales, ya que pueden usarse para reducir la
30 inmunogenicidad en humanos así como también etiquetas de purificación.

VI. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Introducción

[0086] La presente invención se dirige a métodos para reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los anticuerpos biespecíficos (incluidas las proteínas funcionales similares a los anticuerpos) que se unen a objetivos fisiológicos importantes tales como CD3 y antígenos tumorales. Muchas proteínas de unión a antígeno, como los anticuerpos, pueden tener efectos secundarios significativos fuera del objetivo y, por lo tanto, solo es necesario activar las capacidades de unión de una molécula terapéutica en la vecindad del tejido de la enfermedad, para evitar interacciones fuera del objetivo. Por consiguiente, la presente invención se dirige a proteínas multivalentes condicionalmente efectivas ("MCE") que tienen varios dominios de proteínas funcionales. En general, uno de estos dominios es un dominio de unión a antígeno (ABD) que se unirá a un antígeno tumoral objetivo (TTA), y otro es un ABD que se unirá a un antígeno de células T como el CD3 bajo ciertas condiciones. Además, las proteínas MCE también incluyen uno o más sitios de escisión de proteasas. Es decir, las moléculas terapéuticas se hacen en un Formato similar a "profármaco", en el que el dominio de unión a CD3 está inactivo hasta que se expone a un entorno tumoral. El ambiente del tumor contiene proteasas, de modo que al exponerse a la proteasa, el profármaco se escinde y se vuelve activo.

[0087] En general, esto se logra aquí mediante el uso de proteínas que incluyen un dominio pesado variable "pseudo" y un dominio ligero variable "pseudo" dirigido al antígeno de células T tal como CD3, que restringe los Fv CD3 del MCE en un formato inactivo como se discute aquí. A medida que el TTA apunta al MCE en la proximidad del tumor, el MCE queda expuesto a la proteasa. Tras la escisión, el dominio pesado variable activo y el dominio ligero activo ahora pueden emparejarse para formar uno o más ABD activos a CD3 y así reclutar células T para el tumor, dando como resultado del tratamiento.

[0088] En general, el dominio de unión a CD3 ("Fv") está en un formato restringido, en el que el enlazador entre el dominio pesado de la variable activa y el dominio ligero de la variable activa que tradicionalmente forman un Fv es demasiado corto para permitir las dos variables activas dominios para unirse entre sí; esto se conoce como "enlazador restringido"; estos pueden ser restringidos y divisibles (CCL, como se usa en el Formato 1) o restringidos y no divisibles (CNCL, como se usan en el Formato 2). Más bien, en el formato de profármaco (por ejemplo, sin escindir), el polipéptido profármaco también comprende un "dominio pseudo Fv". El pseudo dominio Fv comprende un dominio variable pesado y ligero, con regiones marco estándar, pero CDR "inertes" o "inactivos". El pseudo dominio Fv también tiene un enlazador restringido entre los dominios variable pesado inactivo y variable ligero inactivo. Dado que ni los dominios Fv ni pseudo Fv pueden

autoensamblarse debido a las restricciones estéricas, existe un ensamblaje intramolecular que empareja aVL con iVH y aVH con iVL, debido a la afinidad de las regiones marco de cada uno. Sin embargo, debido a las CDR "inertes" del pseudo dominio, los ABD resultantes no se unirán a CD3, evitando así toxicidades fuera del objetivo. Sin embargo, en presencia de proteasas que están dentro o cerca del tumor, la construcción del profármaco se escinde de tal manera que el dominio pseudo-Fv se libera de la superficie y, por lo tanto, permite que los dominios ligeros variables y pesados variables "reales" se asocien intermolecularmente (por ejemplo dos construcciones escindidas se unen), lo que desencadena la unión activa de CD3 y la eficacia tumoral resultante. Estas construcciones se denominan generalmente en el presente documento como construcciones de activación redirigidas biespecíficas convencionales, o "COBRAs™". La estabilidad del ensamblaje intramolecular se muestra mediante los experimentos de condicionalidad en el presente documento, en los que, en ausencia de proteasa, las construcciones sin escindir no tienen actividad (por ejemplo, no se forma un dominio de unión a CD3 activo).

[0089] Curiosamente, para facilitar la descripción, si bien todas estas construcciones se denominan en el presente documento "restringidas", el trabajo adicional muestra que el ensamblaje intramolecular se ve favorecido incluso si uno de los dominios Fv no está restringido, por ejemplo uno de los dominios puede tener un enlazador más largo y flexible. Es decir, como se muestra en la figura 36, figura 37 y figura 38, el ensamblaje intramolecular todavía ocurre (por ejemplo, las construcciones sin escindir están inactivas en ausencia de escisión de proteasa) si solo uno de los dominios Fv, ya sea el que tiene un VL y VH activos, o el dominio pseudo Fv, está restringido. Sin embargo, en los sistemas actuales, cuando ambos enlazadores están restringidos, la proteína tiene una mejor expresión. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la materia, cualquiera de las construcciones de Formato 1, Formato 2 o Formato 4 en el presente documento puede tener uno de estos dominios Fv con un enlazador "sin restricciones" o "flexible". Para facilitar la referencia, las construcciones se muestran con ambos dominios Fv en un Formato restringido.

[0090] Las construcciones y formatos de la invención son variaciones sobre las invenciones descritas en el documento WO2017/156178, incorporadas expresamente por referencia en su totalidad. Como se muestra en la figura 20, las construcciones anteriores tienen la capacidad de isomerizarse debido a la presencia de dos conjuntos de dominios VH y VL en un polipéptido único, formando un scFv bivalente y un diacuerpo de cadena única. Incluso después de la purificación de cada isoforma, la construcción bivalente puede alcanzar el equilibrio con la isoforma del diacuerpo. Como el diacuerpo de cadena sencilla tiene la capacidad de unirse a CD3 en ausencia de escisión de proteasa, la utilidad de la construcción disminuye.

[0091] Para resolver este problema, la presente invención proporciona cuatro tipos separados de construcciones para lograr esta activación condicional. La activación del profármaco puede ocurrir en una de cuatro formas generales, como se muestra generalmente en las figuras. En la figura 1, se muestra un mecanismo de "Formato 1". En esta modalidad, la construcción del profármaco tiene dos sitios de escisión: uno entre los dominios VH y VL del Fv restringido, liberando así los dos dominios variables para asociar, y un segundo en un sitio que libera el dominio pseudo Fv de la construcción del profármaco, dejando dos moléculas que se asocian debido al autoensamblaje innato de los dominios variables pesado y variable, cada uno con un dominio de unión a antígeno a un antígeno tumoral, permitiendo así el reclutamiento de células T al sitio del tumor.

[0092] En una modalidad alternativa, la construcción del profármaco se muestra en la figura 2, un mecanismo de "Formato 2". En esta modalidad, el enlazador de dominio entre las cadenas pesadas activas y ligeras variables activas es un enlazador restringido pero no escindible ("CNCL"). En el formato de profármaco, los VH y VL inactivos del pseudo dominio Fv restringido se asocian con el VH y VL del dominio Fv restringido, de modo que no hay enlace CD3. Sin embargo, una vez que ocurre la escisión en el entorno del tumor, dos proteínas activadas diferentes, cada una de las cuales comprende un dominio pesado y ligero variable activo, se asocian para formar dos dominios de unión anti-CD3.

[0093] Además de los formatos COBRA de "proteína de cadena única" discutidos anteriormente, donde todos los componentes están contenidos en una secuencia de aminoácidos única, también hay construcciones que se basan en dos proteínas "hemi-COBRA", que actúan en pares, como se muestra en la figura 3. En esta modalidad, cada proteína tiene un dominio variable activo y uno inerte separado por un sitio de escisión de proteasa. Cada molécula contiene un dominio de unión a TTA, de modo que cuando las moléculas se unen a la TTA y se exponen a la proteasa tumoral, los dominios inertes se separan y los dos dominios variables activos se auto-ensamblan para formar un dominio de unión anti-CD3.

[0094] Además, la invención proporciona también construcciones de "Formato 4", como se representa en la figura 4. Estos son similares a los diseños de "Formato 2", excepto que se usa un único ABD a un TTA, de modo que al escindir, dos de las moléculas pro-fármaco ahora forman una construcción biespecífica tetravalente que contiene dos dominios activos anti-CD3, como se describe más adelante.

[0095] Por consiguiente, los formatos y construcciones de la invención encuentran uso en el tratamiento de la enfermedad.

B. Definiciones

[0096] Para que la solicitud pueda entenderse más completamente, a continuación se exponen varias definiciones. Dichas definiciones están destinadas a abarcar equivalentes gramaticales.

[0097] Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos", como se usa en el presente documento, se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier análogo no natural que pueda estar presente en una posición específica y definida. En muchas modalidades, "aminoácido" significa uno de los 20 aminoácidos naturales. Por "proteína" en el presente documento se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

[0098] Por "modificación de aminoácidos" en el presente documento se entiende una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos o una alteración a un radical químicamente unido a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser una estructura alterada de carbohidratos o PEG unida a una proteína. Para mayor claridad, a menos que se indique lo contrario, la modificación de aminoácidos es siempre un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo los 20 aminoácidos que tienen codones en el ADN y el ARN. La modificación de aminoácidos preferida en el presente documento es una sustitución.

[0099] Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en el presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos parental con un aminoácido diferente. En particular, en algunas modalidades, la sustitución es por un aminoácido que no se produce naturalmente en la posición particular, o que no se produce naturalmente dentro del organismo o en ningún organismo. Para mayor claridad, una proteína que ha sido diseñada para cambiar la secuencia de codificación de ácido nucleico pero no cambiar el aminoácido inicial (por ejemplo, el intercambio de CGG (que codifica arginina) a CGA (que todavía codifica arginina) para aumentar los niveles de expresión del organismo huésped) no es una "sustitución de aminoácidos"; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular con la que comenzó, no es una sustitución de aminoácidos.

[0100] Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" como se usa en el presente documento se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptidos parental.

[0101] Por "delección de aminoácidos" o "delección" como se usa en el presente documento se entiende la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptidos parental.

[0102] Los polipéptidos de la invención se unen específicamente a CD3 y antígenos tumorales objetivo (TTA) tales como receptores de células objetivo, como se describe aquí. "Unión

específica" o "se une específicamente a" o es "específica para" un antígeno particular o un epítopo significa unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que es similar al objetivo.

[0103] La unión específica para un antígeno particular o un epítopo puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítopo de al menos alrededor de 10^{-4} M, al menos alrededor de 10^{-5} M, al menos alrededor de 10^{-6} M, al menos alrededor de 10^{-7} M, al menos alrededor de 10^{-8} M, al menos alrededor de 10^{-9} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-10} M, al menos alrededor de 10^{-11} M, al menos alrededor de 10^{-12} M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5,000, 10,000 o más veces mayor para una molécula de control en relación con el antígeno o epítopo.

[0104] Además, la unión específica para un antígeno particular o un epítopo puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene un KA o Ka para un antígeno o epítopo de al menos 20, 50, 100, 500, 1000-, 5,000-, 10,000- o más veces mayor para el epítopo en relación con un control, donde KA o Ka se refieren a una tasa de asociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo. La afinidad de unión se mide generalmente usando un ensayo Biacore u Octet como se conoce en la técnica.

[0105] Por "polipéptido original" o "polipéptido precursor" (incluyendo el principal o precursores Fc) como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho polipéptido original puede ser un polipéptido natural, o una versión variada o modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. El polipéptido original puede referirse al propio polipéptido, las composiciones que comprenden el polipéptido original o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "polipéptido Fc original" como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido Fc no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo primario" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante.

[0106] Por "posición" como se usa en el presente documento se entiende una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente o según un formato establecido, por ejemplo, el índice de la UE para la numeración de anticuerpos.

[0107] Por "antígeno objetivo", como se usa en el presente documento, se entiende la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno objetivo puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. En este documento se describe una gama de antígenos objetivo ejemplares adecuados.

5 [0108] Por "célula objetivo", como se usa en el presente documento, se entiende una célula que expresa un antígeno objetivo. Generalmente, para los fines de la invención, las células objetivo son células tumorales que expresan TTA o células T que expresan el antígeno CD3.

[0109] Por "Fv" o "dominio Fv" o "región Fv", como se usa en este documento, se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un dominio de unión a antígeno, generalmente de un anticuerpo. Los dominios Fv generalmente forman un "dominio de unión a antígeno" o "ABD" como se describe aquí, si contienen dominios VH y VL activos (aunque en algunos casos, se utiliza un Fv que contiene un enlazador restringido, de modo que no se forma un ABD activo antes de la escisión). Como se discute a continuación, los dominios Fv se pueden organizar de varias maneras en la presente invención, y pueden ser "activos" o "inactivos", como en un formato scFv, un formato Fv restringido, un pseudo formato Fv, etc. Debe entenderse que en la presente invención, en algunos casos, un dominio Fv está formado por un dominio VH y VL en una única cadena de polipéptidos, como se muestra en la figura 1 y la figura 2, pero con un enlazador restringido tal que un ABD intramolecular no puede ser formado. En estas modalidades, es después de la escisión que se forman dos ABD activos. En algunos casos, un dominio Fv está formado por un dominio VH y un dominio VL, uno de los cuales es inerte, de modo que solo después de la escisión se forma un ABD intermolecular. Como se discute a continuación, los dominios Fv se pueden organizar de varias maneras en la presente invención, y pueden ser "activos" o "inactivos", como en un Formato scFv, un Formato Fv restringido, un Formato pseudo Fv, etc. Además, como se describe aquí, los dominios Fv que contienen VH y VL pueden ser/formar ABD, y otros ABD que no contienen dominios VH y VL pueden formarse usando sdABD.

10
15
20
25

[0110] Por "dominio variable" en el presente documento se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes V κ , V λ y/o VH que forman la inmunoglobulina de cadena pesada, kappa y lambda. loci genéticos respectivamente. En algunos casos, se puede usar un único dominio variable, como un sdFv (también denominado en este documento sdABD).

30

[0111] En las modalidades que utilizan dominios variables pesado (VH) y variable ligero (VL), cada VH y VL está compuesto por tres regiones hipervariables ("regiones determinantes complementarias", "CDR") y cuatro "regiones marco", o "FR", dispuestos desde el extremo amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Por lo tanto, el

dominio VH tiene la estructura vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4 y el dominio VL tiene la estructura vIFR1-vLCDR1-vIFR2-vLCDR2-vIFR3-vLCDR3-vIFR4. Como se describe más completamente en este documento, las regiones vhFR y las regiones vIFR se autoensamblan para formar dominios Fv. En general, en los formatos de profármacos de la invención, existen "dominios Fv restringidos" en los que los dominios VH y VL no pueden autoasociarse, y "pseudo dominios Fv" para los cuales las CDR no forman dominios de unión a antígeno cuando se autoasocian.

[0112] Las regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno y generalmente abarcan residuos de aminoácidos de aproximadamente los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; "L" denota cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en el región variable de la cadena ligera y alrededor de aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" denota cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en el región variable de la cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Las CDR específicas de la invención se describen a continuación.

[0113] Como apreciarán los expertos en la técnica, la numeración y colocación exactas de los CDR pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la descripción de una secuencia variable pesada y/o variable ligera incluye la descripción de las CDR asociadas (inherentes). Por consiguiente, la descripción de cada región pesada variable es una descripción de los vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la descripción de cada región ligera variable es una descripción de los vLCDR (por ejemplo, vLCDR1, vLCDR2 y vLCDR3).

[0114] Una comparación útil de la numeración de CDR es la siguiente, ver Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol 27 (1): 55-77 (2003):

CUADRO 1

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vLCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
vLCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vLCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

[0115] En toda la presente especificación, el sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la región variable de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la región variable de la cadena pesada) y el sistema de numeración de la UE para las regiones Fc (por ejemplo, Kabat et al., supra (1991)).

[0116] La presente invención proporciona un gran número de diferentes conjuntos de CDR. En este caso, un "conjunto completo de CDR" en el contexto del componente anti-CD3 comprende las tres CDR ligeras variables y tres pesadas variables, por ejemplo un vICDR1, vICDR2, vICDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Como apreciarán los expertos en la técnica, cada conjunto de CDR, las CDR VH y VL, pueden unirse a antígenos, tanto individualmente como en conjunto. Por ejemplo, en dominios Fv restringidos, los vhCDR pueden unirse, por ejemplo, a CD3 y los vICDR pueden unirse a CD3, pero en el formato restringido no pueden unirse a CD3.

[0117] En el contexto de un dominio único ABD ("sdABD") tal como se usa generalmente en este documento para unirse a antígenos tumorales objetivo (TTA), un conjunto de CDR es solo tres CDR; a veces se hace referencia a ellos en la técnica como dominios "VHH".

[0118] Estas CDR pueden ser parte de un dominio ligero variable o pesado variable más grande, respetuosamente. Además, como se describe más completamente en este documento, los dominios variables pesado y variable pueden estar en cadenas de polipéptidos separadas o en una cadena de polipéptidos única en el caso de secuencias scFv, dependiendo del formato y configuración de los restos en el presente documento.

[0119] Las CDR contribuyen a la formación de los sitios de unión al antígeno, o más específicamente, de unión al epítipo. "Epítipo" se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en las regiones variables conocidas como paratopo. Los epítopos son agrupaciones de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo.

[0120] El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también llamado componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están efectivamente bloqueados por el péptido de unión a antígeno específico; en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión al antígeno específico.

[0121] Los epítomos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítomo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítomo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Los epítomos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

[0122] Un epítomo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítomo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, por ejemplo "clasificación". Como se describe a continuación, la invención no solo incluye los dominios y anticuerpos de unión al antígeno enumerados aquí, sino también aquellos que compiten por la unión con los epítomos unidos por los dominios de unión al antígeno enumerados.

[0123] Los dominios variables pesados y variables ligeros de la invención pueden ser "activos" o "inactivos".

[0124] Como se usa en este documento, "VH inactivo" ("iVH") y "VL inactivo" ("iVL") se refieren a componentes de un dominio pseudo Fv, que, cuando se combinan con sus socios VL o VH afines, respectivamente, forman un par VH/VL resultante que no se une específicamente al antígeno al que se unirían el VH "activo" o el VL "activo" si se uniera a un VL o VH análogo, que no estaba "inactivo". Los dominios ejemplares de "VH inactivo" y "VL inactivo" se forman por mutación de una secuencia de VH o VL de tipo salvaje como se describe más detalladamente a continuación. Las mutaciones ejemplares están dentro de CDR1, CDR2 o CDR3 de VH o VL. Una mutación ejemplar incluye colocar un enlazador de dominio dentro de CDR2, formando así un dominio "VH inactivo" o "VL inactivo". Por el contrario, un "VH activo" o "VL activo" es uno que, al emparejarse con su compañero afín "activo", es decir, VL o VH, respectivamente, es capaz de unirse específicamente a su antígeno objetivo. Por lo tanto, debe entenderse que un pseudo Fv puede ser un par VH/iVL, un par iVH/VL o un par iVH/iVL.

[0125] En contraste, como se usa en el presente documento, el término "activo" se refiere a un dominio de unión a CD-3 que es capaz de unirse específicamente a CD-3. Este término se usa en dos contextos: (a) cuando se refiere a un solo miembro de un par de unión a Fv (es decir, VH o VL), que es de una secuencia capaz de emparejarse con su compañero afín y unirse específicamente a CD-3; y (b) el par de cognados (es decir, VH y VL) de una secuencia capaz de unirse específicamente a CD-3. Un par VH, VL o VH/VL ejemplar "activo" es una secuencia tipo salvaje o principal.

[0126] "CD-x" se refiere a un grupo de proteínas de diferenciación (CD). En modalidades ejemplares, CD-x se selecciona de aquellas proteínas CD que tienen un papel en el reclutamiento o activación de células T en un sujeto al que se le ha administrado una construcción de polipéptido de la invención. En una modalidad ejemplar, CD-x es CD3, cuya secuencia se muestra en la figura 5.

[0127] El término "dominio de unión" caracteriza, en relación con la presente invención, un dominio que (específicamente) se une/interactúa con/reconoce un epítipo objetivo dado o un sitio objetivo dado en las moléculas objetivo (antígenos), por ejemplo: EGFR y CD-3, respectivamente. La estructura y función del dominio de unión al antígeno objetivo (que reconoce EGFR), y preferiblemente también la estructura y/o función del dominio de unión a CD-3 (que reconoce CD3), se basa en la estructura y/o función de un anticuerpo, por ejemplo de una molécula de inmunoglobulina completa o completa, incluidos los sdABD. De acuerdo con la invención, el dominio de unión al antígeno objetivo generalmente se caracteriza por la presencia de tres CDR que se unen al antígeno tumoral objetivo (generalmente conocidos en la técnica como dominios pesados variables, aunque no hay CDR de cadena ligera correspondientes). Alternativamente, los ABD a TTA pueden incluir tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH). El dominio de unión a CD-3 preferiblemente también comprende al menos los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permite la unión a la objetivo. Más preferiblemente, el dominio de unión a CD-3 comprende al menos tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH). Se prevé que, en modalidades ejemplares, el dominio de unión al antígeno y/o CD-3 objetivo se produzca u obtenga por medio de métodos de cribado de biblioteca o presentación de fagos.

[0128] Por "dominio" como se usa en el presente documento se entiende una secuencia de proteína con una función, como se describe en el presente documento. Los dominios de la invención incluyen dominios de unión a antígeno objetivo tumoral (dominios TTA), dominios pesados variables, dominios ligeros variables, dominios enlazadores y dominios de extensión de vida media.

[0129] Por "enlazador de dominio" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos que se une a dos dominios como se describe en el presente documento. Los enlazadores de dominio pueden ser enlazadores escindibles, enlazadores escindidos restringidos, enlazadores no escindibles, enlazadores no escindidos restringidos, enlazadores scFv, etc.

[0130] Por "enlazador escindible" ("CL") en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos que puede escindirse mediante una proteasa, preferiblemente una proteasa humana

en un tejido de enfermedad como se describe en el presente documento. Los enlazadores escindibles generalmente tienen al menos 3 aminoácidos de longitud, con 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos que se usan en la invención, dependiendo de la flexibilidad requerida. Una serie de secuencias enlazadoras escindibles se encuentran en la figura 6 y la figura

5 5.

[0131] Por "enlazador no escindible" ("NCL") en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos que no puede ser escindida por una proteasa humana en condiciones fisiológicas normales.

[0132] Por "enlazador escindido restringido" ("CCL") en el presente documento se entiende un polipéptido corto que contiene un sitio de escisión de proteasa (como se define en el presente documento) que une dos dominios como se describe aquí de tal manera que los dos dominios no pueden interactuar significativamente con entre sí hasta después de residir en diferentes cadenas de polipéptidos, por ejemplo después de la escisión. Cuando el CCL se une a un dominio VH y VL como se define aquí, el VH y el VL no pueden autoensamblarse para formar un Fv funcional antes de la escisión debido a restricciones estéricas de una manera intramolecular (aunque pueden ensamblarse en dominios pseudo Fv de forma intermolecular). Tras la escisión por la proteasa relevante, el VH y el VL pueden ensamblarse para formar un dominio de unión al antígeno activo de forma intermolecular. En general, los CCL tienen menos de 10 aminoácidos de longitud, con 9, 8, 7, 6, 5 y 4 aminoácidos que se usan en la invención. En general, los sitios de escisión de proteasas generalmente tienen al menos 4+ aminoácidos de longitud para conferir suficiente especificidad, como se muestra en la figura 6.

[0133] Por "enlazador no escindible restringido" ("CNCL") en el presente documento se entiende un polipéptido corto que se une a dos dominios como se describe aquí de tal manera que los dos dominios no pueden interactuar significativamente entre sí, y eso no es significativamente escindido por proteasas humanas en condiciones fisiológicas.

[0134] Por "dominio Fv restringido" en el presente documento se entiende un dominio Fv que comprende un dominio pesado variable activo y un dominio ligero variable activo, unido covalentemente con un enlazador restringido como se describe aquí, de tal manera que la variable pesada y ligera activa los dominios no pueden interactuar intramolecularmente para formar un Fv activo que se unirá a un antígeno como el CD3. Por lo tanto, un dominio Fv restringido es uno que es similar a un scFv pero no puede unirse a un antígeno debido a la presencia de un enlazador restringido (aunque pueden ensamblarse intermolecularmente con dominios variables inertes para formar pseudo dominios Fv).

[0135] Por "pseudo dominio Fv" en el presente documento se entiende un dominio que comprende

un dominio pesado variable pseudo o inactivo o un dominio ligero variable pseudo o inactivo, o ambos, unidos usando un enlazador de dominio (que puede ser escindible, restringido, no escindible, no restringido, etc.). Los dominios iVH e iVL de un pseudo dominio Fv no se unen a un antígeno humano cuando están asociados entre sí (iVH/iVL) o cuando están asociados con un VH o VL activo; así, los dominios iVH/iVL, iVH/VL e iVL/VH Fv no se unen apreciablemente a una proteína humana, de modo que estos dominios son inertes en el cuerpo humano.

[0136] Por "cadena simple Fv" o "scFv" en el presente documento se entiende un dominio pesado variable (VH) unido covalentemente a un dominio ligero variable (VL), generalmente usando un enlazador de dominio como se describe aquí, para formar un dominio scFv o scFv . Un dominio scFv puede estar en cualquier orientación desde el N al C terminal (VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH).

[0137] Por "dominio único Fv", "sdFv" o "sdABD" en el presente documento significa un dominio de unión a antígeno que solo tiene tres CDR, generalmente basados en tecnología de anticuerpos contra camélidos. Ver: Protein Engineering 9 (7): 1129-35 (1994); Rev Mol Biotech 74: 277-302 (2001); Ann Rev Biochem 82: 775-97 (2013). Como se describe en este documento, hay dos tipos generales de sdABD utilizados aquí: sdABD que se unen a TTA y se anotan como tales (sdABD-TTA para el término genérico, o sdABD-EGFR para uno que se une a EGFR, sdABD-FOLR1 para uno que se une a FOLR1, etc.) y sdABD que se unen a HSA ("sdABD-HSA" o "sdABD (1/2)").

[0138] Por "sitio de escisión de proteasa" se refiere a la secuencia de aminoácidos reconocida y escindida por una proteasa. Los sitios de escisión de proteasa adecuados se describen a continuación y se muestran en la figura 5 y la figura 6.

[0139] Como se usa en el presente documento, "dominio de escisión de proteasa" se refiere a la secuencia peptídica que incorpora el "sitio de escisión de proteasa" y cualquier enlazador entre sitios de escisión de proteasa individuales y entre el sitio o sitios de escisión de proteasa y los otros componentes funcionales de las construcciones de la invención (por ejemplo, V_H, V_L, iVH, iVL, dominio(s) de unión al antígeno objetivo, dominio de extensión de vida media, etc.). Como se describe en este documento, un dominio de escisión de proteasa también puede incluir aminoácidos adicionales si es necesario, por ejemplo para conferir flexibilidad.

[0140] El término "COBRA™" y "activación redireccionada biespecífica condicional" se refiere a una proteína condicionalmente efectiva biespecífica que tiene varios dominios proteicos funcionales. En algunas modalidades, uno de los dominios funcionales es un dominio de unión a antígeno (ABD) que se une a un antígeno tumoral objetivo (TTA). En ciertas modalidades, otro dominio es un ABD que se une a un antígeno de células T bajo ciertas condiciones. El antígeno de células T incluye, pero no se limita a CD3. El término "hemi-COBRA™" se refiere a una proteína

condicionalmente efectiva que puede unirse a un antígeno de células T cuando una cadena pesada variable de un hemi-COBRA puede asociarse a una cadena ligera variable de otro hemi-COBRA™ (un hemi-COBRA™ complementario) debido al autoensamblaje innato cuando se concentra en la superficie de una célula que expresa el objetivo.

5

VII. Proteínas de fusión de la invención

[0141] Las proteínas de fusión de la invención tienen varios componentes diferentes, generalmente denominados en este documento como dominios, que están unidos entre sí de diversas maneras. Algunos de los dominios son dominios de unión, que se unen a un antígeno objetivo (por ejemplo, un TTA o CD3, por ejemplo). Como se unen a más de un antígeno, en el presente documento se denominan "multiespecíficos"; por ejemplo, una construcción de profármaco de la invención puede unirse a un TTA y CD3, y por lo tanto son "biespecíficos". Una proteína también puede tener especificidades más altas; por ejemplo, si el primer α TTA se une al EGFR, el segundo a EpCAM y hay un dominio de unión anti-CD3, esta sería una molécula "triespecífica". De manera similar, la adición de un dominio de unión anti-HSA a esta construcción sería "tetraspecífica", como se muestra en la figura 3B.

[0142] Como apreciarán los expertos en la técnica, las proteínas de la invención pueden tener diferentes valencias, así como ser multiespecíficas. Es decir, las proteínas de la invención pueden unirse a un objetivo con más de un sitio de unión; por ejemplo, Pro140 es bivalente para EGFR.

[0143] Las proteínas de la invención pueden incluir dominios de unión al antígeno CD3 dispuestos en una variedad de formas como se describe aquí, dominios de unión al antígeno objetivo tumoral, dominios de extensión de vida media, enlazadores, etc.

A. Dominios de unión a antígeno CD3

[0144] La especificidad de la respuesta de las células T está mediada por el reconocimiento del antígeno (mostrado en el contexto de un complejo de histocompatibilidad principal, MHC) por el complejo receptor de células T. Como parte del complejo receptor de células T, CD3 es un complejo de proteínas que incluye una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta), dos cadenas CD3 ϵ (epsilon) y dos cadenas CD3 ζ (zeta), que están presentes en la célula superficie. Las moléculas CD3 se asocian con las cadenas α (alfa) y β (beta) del receptor de células T (TCR) para comprender el complejo TCR. La agrupación de CD3 en las células T, como por los dominios Fv que se unen a CD3 conduce a la activación de las células T de forma similar al compromiso del receptor de las células T, pero independiente de su especificidad clonal típica.

[0145] Sin embargo, como es conocido en la técnica, la activación de CD3 puede causar una serie

de efectos secundarios tóxicos y, en consecuencia, la presente invención está dirigida a proporcionar una unión activa de CD3 de los polipéptidos de la invención solo en presencia de células tumorales, donde se encuentran proteasas específicas, que luego escinden los polipéptidos profármacos de la invención para proporcionar un dominio de unión a CD3 activo. Por lo tanto, en la presente invención, la unión de un dominio Fv anti-CD-3 a CD-3 está regulada por un dominio de escisión de proteasa que restringe la unión del dominio Fv CD-3 a CD-3 solo en el microambiente de una célula enferma o tejido con niveles elevados de proteasas, por ejemplo en un microambiente tumoral como se describe en el presente documento.

[0146] Por consiguiente, la presente invención proporciona dos conjuntos de dominios VH y VL, un conjunto activo (VH y VL) y un conjunto inactivo (iVH e iVL) con los cuatro presentes en la construcción del profármaco. La construcción está formateado de manera que el conjunto VH y VL no puede autoasociarse, sino que se asocia con un compañero inactivo, por ejemplo iVH y VL e iVL y VH como se muestra aquí.

1. Dominios activos pesados y variables ligeros anti-CD3 activos

[0147] Hay una serie de conjuntos de CDR activos adecuados, y/o dominios VH y VL, que se conocen en la técnica que encuentran uso en la presente invención. Por ejemplo, los dominios CDR y/o VH y VL se derivan de anticuerpos anti-CD-3 conocidos, como, por ejemplo, muromonab-CD-3 (OKT3), otelixizumab (TRX4), teplizumab (MGA031), visilizumab (Nuvion), SP34 o I2C, TR-66 o X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 y WT-31.

[0148] En una modalidad, las secuencias VH y VL que forman un dominio Fv activo que se une al CD3 humano se muestran en la figura 5. Como se muestra en el presente documento, estas VH activas ("aVH") y VL activas ("aVL") los dominios se pueden usar en diferentes configuraciones y Formatos 1, 2, 3 y 4.

2. Dominios pesados variables y ligeros variables anti-CD3 inactivos

[0149] Los dominios inactivos iVH e iVL contienen regiones marco (FR) "regulares" que permiten la asociación, de modo que un dominio variable inactivo se asociará con un dominio variable activo, haciendo que el par esté inactivo, por ejemplo incapaz de enlazar CD3.

[0150] Como apreciarán los expertos en la técnica, hay una serie de dominios variables "inactivos" que encuentran uso en la invención. Básicamente, se puede usar cualquier dominio variable con regiones marco humanas que permita el autoensamblaje con otro dominio variable, sin importar

qué aminoácidos estén en la ubicación de CDR en la región variable. Para mayor claridad, se dice que los dominios inactivos incluyen CDR, aunque técnicamente los dominios variables inactivos no confieren capacidades de unión.

[0151] Como se apreciará en la técnica, en general es sencillo generar dominios VH o VL inactivos, y se puede hacer de varias maneras. En algunas modalidades, la generación de dominios variables inactivos se realiza generalmente alterando una o más de las CDR de un Fv activo, incluida la modalidad de cambios en una o más de las tres CDR de un dominio variable activo. Esto se puede hacer haciendo una o más sustituciones de aminoácidos en residuos funcionalmente importantes en una o más CDR, reemplazando algunos o todos los residuos de CDR con secuencias aleatorias, reemplazando una o más CDR con secuencias de etiqueta o indicador, y/o intercambiando CDR y/o regiones variables con las de un anticuerpo irrelevante (uno dirigido a la proteína de un organismo diferente, por ejemplo).

[0152] En algunos casos, solo una de las CDR en una región variable puede alterarse para hacerla inactiva, aunque otras modalidades incluyen alteraciones en una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR.

[0153] En algunos casos, los dominios inactivos pueden diseñarse para promover la unión selectiva en el Formato de profármaco, para fomentar la formación de dominios intramoleculares iVH-VL y VH-iVL antes de la escisión (por ejemplo, sobre la formación de pares intermoleculares). Véase, por ejemplo, Igawa et al., Protein Eng. Des. Selection 23 (8): 667-677 (2010), incorporada expresamente por referencia en su totalidad y específicamente para las sustituciones de aminoácidos de residuos de la interfaz.

[0154] En ciertas modalidades, el dominio de unión a CD-3 de las construcciones de polipéptidos descritas en el presente documento no solo presenta potentes afinidades de unión a CD-3 con CD-3 humano, sino que también muestra una excelente reactividad cruzada con las respectivas proteínas CD-3 de mono cynomolgus. En algunos casos, el dominio de unión a CD-3 de las construcciones de polipéptidos es reactivo cruzado con CD-3 del mono cynomolgus. En ciertos casos, las relaciones KD humano: cinomolgo para CD-3 están entre 5 y 0.2.

[0155] En algunas modalidades, el dominio de unión a CD-3 de la proteína de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una a CD-3, incluidos, entre otros, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a CD-3 se derive de la misma especie en la que finalmente se utilizará la proteína de unión a antígeno. Por ejemplo, para uso en humanos, puede ser beneficioso para el CD-3 dominio de unión de la proteína de unión a antígeno que comprende residuos humanos o humanizados del dominio de

unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0156] Por lo tanto, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión humanizado o humano. En una modalidad, el dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano comprende una o más (por ejemplo, las tres) región determinante complementaria de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC CDR2) y cadena ligera región determinante complementaria 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano descrito en este documento, y/o una o más (por ejemplo, las tres) región determinante complementaria de cadena pesada 1 (HC CDR1), determinación complementaria de cadena pesada región 2 (HC CDR2) y región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano que comprende uno o más , por ejemplo, los tres, LC CDR y uno o más, por ejemplo, los tres, HC CDR.

[0157] En algunas modalidades, el dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano comprende una región variable de cadena ligera humanizada o humana específica para CD-3 donde la región variable de cadena ligera específica para CD-3 comprende CDR de cadena ligera humana o no humana en una región de marco de cadena ligera humana. En ciertos casos, la región del marco de la cadena ligera es un marco de la cadena ligera λ (lambda). En otros casos, la región del marco de la cadena ligera es un marco de la cadena ligera κ (kappa).

[0158] En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 son humanizados o completamente humanos. En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 activados tienen una unión a KD de 1000 nM o menos a CD-3 en células que expresan CD-3. En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 activados tienen una unión a KD de 100 nM o menos a CD-3 en células que expresan CD-3. En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 activados tienen una unión a KD de 10 nM o menos a CD-3 en células que expresan CD-3. En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 tienen reactividad cruzada con cynomolgus CD-3. En algunas modalidades, uno o más dominios de unión a CD-3 comprenden una secuencia de aminoácidos proporcionada en este documento.

[0159] En algunas modalidades, el dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano comprende una región variable de cadena pesada humanizada o humana específica para CD-3 donde la región variable de cadena pesada específica para CD-3 comprende CDR de cadena pesada humana o no humana en una región de marco de cadena pesada humana.

[0160] En una modalidad, el dominio de unión anti-CD-3 es un Fv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos proporcionada aquí. En una modalidad, el dominio de unión anti-CD-3 comprende: una región variable de la cadena ligera que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada aquí, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos proporcionada aquí; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una secuencia pesada región variable de cadena proporcionada aquí, o una secuencia con una identidad del 95-99% a una secuencia de aminoácidos proporcionada aquí. En una modalidad, el dominio de unión anti-CD-3 humanizado o humano es un scFv, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, se une a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, a través de un enlazador scFv. La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador scFv-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador scFv-región variable de la cadena ligera.

[0161] En algunas modalidades, el dominio de unión a CD-3 de una proteína de unión a antígeno tiene una afinidad por CD-3 en células que expresan CD-3 con un KD de 1000 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0.5 nM o menos. En algunas modalidades, el dominio de unión a CD-3 de una proteína de unión a antígeno tiene una afinidad a CD-3ε con una KD de 1000 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0.5 nM o menos. En modalidades adicionales, el dominio de unión a CD-3 de una proteína de unión a antígeno tiene baja afinidad por CD-3, es decir, aproximadamente 100 nM o más.

[0162] La afinidad para unirse a CD-3 puede determinarse, por ejemplo, por la capacidad de la propia proteína de unión a antígeno o su dominio de unión a CD-3 para unirse a CD-3 recubierto en una placa de ensayo; exhibido en una superficie celular microbiana; en solución; etc., como se conoce en la técnica, generalmente usando ensayos Biacore u Octet. La actividad de unión de la propia proteína de unión al antígeno o su dominio de unión a CD-3 de la presente descripción a CD-3 puede analizarse inmovilizando el ligando (por ejemplo, CD-3) o la proteína de unión a antígeno en sí o su unión a CD-3 dominio, a una cuenta, sustrato, célula, etc. Los agentes se pueden agregar en un regulador de pH apropiado y los compañeros de unión se incuban durante un período de tiempo a una temperatura dada. Después de los lavados para eliminar el material no

unido, la proteína unida se puede liberar con, por ejemplo, SDS, reguladores de pH con un pH alto y similares, y analizarse, por ejemplo, mediante Resonancia de Plasmon de Superficie (SPR).

[0163] En muchas modalidades, los dominios de unión activos e inertes preferidos son los mostrados en la figura 5.

5

B. Dominios de unión a antígeno a antígenos objetivo tumorales

[0164] Además de los dominios de extensión CD3 y de vida media descritos, las construcciones de polipéptidos descritas en el presente documento también comprenden dominios objetivo que se unen a uno o más antígenos objetivo o una o más regiones en un solo antígeno objetivo. Se contempla en el presente documento que una construcción de polipéptidos de la invención se escinde, por ejemplo, en un microambiente específico de enfermedad o en la sangre de un sujeto en el dominio de escisión de proteasa y que cada dominio de unión a antígeno objetivo se unirá a un antígeno objetivo en un célula objetivo, activando así el dominio de unión a CD3 para unir una célula T. En general, los dominios de unión de TTA pueden unirse a sus objetivos antes de la escisión de la proteasa, por lo que pueden "esperar" en la célula objetivo para activarse como atacantes de células T. Al menos un antígeno objetivo participa y/o está asociado con una enfermedad, trastorno o afección. Los antígenos objetivo ejemplares incluyen aquellos asociados con una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, un trastorno inmunológico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, una enfermedad viral, una reacción alérgica, una reacción parasitaria, una enfermedad de injerto contra huésped o una enfermedad de huésped contra injerto. En algunas modalidades, un antígeno objetivo es un antígeno tumoral expresado en una célula tumoral. Alternativamente, en algunas modalidades, un antígeno objetivo está asociado con un patógeno tal como un virus o una bacteria. Al menos un antígeno objetivo también puede dirigirse contra tejido sano.

[0165] En algunas modalidades, un antígeno objetivo es una molécula de superficie celular tal como una proteína, lípido o polisacárido. En algunas modalidades, un antígeno objetivo es una célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula infectada por bacterias, un glóbulo rojo dañado, una célula de placa arterial o una célula de tejido fibrótico.

[0166] Las modalidades preferidas de la invención utilizan sdABD como dominios de direccionamiento. Estos se prefieren a los ABD scFv, ya que la adición de otros dominios VH y VL en una construcción de la invención puede complicar la formación de pseudo dominios Fv.

[0167] En algunas modalidades, las construcciones de profármacos de la invención utilizan un único dominio de unión a TTA, tal como se representa generalmente en la figura 3A, como pares de sdABD-TTA, y la figura 4, como una configuración de "Formato 4". La figura 4 muestra el uso

30

de un único ABD anti-EGFR, aunque pueden usarse otros dominios de unión a TTA.

[0168] En algunas modalidades, particularmente en las construcciones de Formato 1 y Formato 2, las construcciones de profármacos de la invención utilizan dos ABD de TTA, de nuevo preferiblemente en el formato sdABD-TTA. Cuando se utilizan dominios de doble direccionamiento, pueden unirse al mismo epítipo del mismo TTA. Por ejemplo, como se discute en el presente documento, muchas de las construcciones en el presente documento utilizan dos dominios de direccionamiento idénticos. En algunas modalidades, se pueden usar dos dominios de direccionamiento que se unen a diferentes epítipos del mismo TTA, por ejemplo, como se muestra en la figura 5, los dos sdABD de EGFR se unen a diferentes epítipos en EGFR humano. En algunas modalidades, los dos dominios de orientación se unen a diferentes TTA, véase, por ejemplo, la figura 54.

[0169] Las construcciones de polipéptidos contempladas en el presente documento incluyen al menos un dominio de unión a antígeno, en el que el dominio de unión a antígeno se une a al menos un antígeno objetivo. En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno objetivo se unen específicamente a una molécula de superficie celular. En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno objetivo se unen específicamente a un antígeno tumoral. En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno objetivo se unen específica e independientemente a un antígeno objetivo tumoral ("TTA") seleccionado de al menos uno de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, LyPD3, B7H3, CEA y FOLR1.

[0170] De uso particular en la presente invención son los sdABDs para EGFR humano como se muestra en la figura 5.

[0171] Modalidades adicionales de uso en la invención son sdABDs para FOLR1 humano como se muestra en la figura 5.

[0172] Otras modalidades de uso en la invención son sdABDs para B7H3 humano como se muestra en la figura 5.

[0173] Modalidades adicionales de uso en la invención son sdABDs para EpCAM humano como se muestra en la figura 5.

[0174] En algunas modalidades, la proteína antes de la escisión del dominio de escisión de proteasa es inferior a aproximadamente 100 kDa. En algunas modalidades, la proteína después de la escisión del dominio de escisión de proteasa es de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 kDa. En algunas modalidades, la proteína antes de la escisión de la proteasa tiene un tamaño que está por encima del umbral renal para el aclaramiento de primer paso. En algunas modalidades, la proteína antes de la escisión de la proteasa tiene un tiempo medio de eliminación de al menos alrededor de 50 horas. En algunas modalidades, la proteína antes de la escisión de la proteasa

tiene un tiempo medio de eliminación de al menos alrededor de 100 horas. En algunas modalidades, la proteína ha aumentado la penetración en el tejido en comparación con una IgG para el mismo antígeno objetivo. En algunas modalidades, la proteína tiene una distribución tisular incrementada en comparación con una IgG con el mismo antígeno objetivo.

5

C. Dominios de extensión de la vida media

[0175] Las proteínas MCE de la invención (de nuevo, también referidas aquí como proteínas o construcciones "COBRA™") incluyen opcionalmente dominios de extensión de vida media. Se contempla que dichos dominios incluyan, entre otros, dominios de unión a HSA, dominios Fc, moléculas pequeñas y otros dominios de extensión de vida media conocidos en la técnica.

[0176] La albúmina sérica humana (HSA) (masa molecular ~67 kDa) es la proteína más abundante en plasma, presente a aproximadamente 50 mg/ml (600 uM), y tiene una vida media de alrededor de 20 días en humanos. HSA sirve para mantener el pH plasmático, contribuye a la presión sanguínea coloidal, funciona como portador de muchos metabolitos y ácidos grasos, y sirve como una proteína principal de transporte de drogas en plasma.

[0177] La asociación no covalente con la albúmina extiende el tiempo medio de eliminación de proteínas de corta duración. Por ejemplo, una fusión recombinante de un dominio de unión de albúmina a un fragmento Fab dio como resultado una eliminación reducida in vivo de 25 y 58 veces y una extensión de la vida media de 26 y 37 veces cuando se administra por vía intravenosa a ratones y conejos, respectivamente. en comparación con la administración del fragmento Fab solo. En otro ejemplo, cuando la insulina se acila con ácidos grasos para promover la asociación con la albúmina, se observa un efecto prolongado cuando se inyecta por vía subcutánea en conejos o cerdos. Juntos, estos estudios demuestran un vínculo entre la unión a la albúmina y la acción prolongada.

[0178] En un aspecto, las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento comprenden un dominio de extensión de vida media, por ejemplo, un dominio que se une específicamente a HSA. En otras modalidades, el dominio de unión a HSA es un péptido. En modalidades adicionales, el dominio de unión de HSA es una molécula pequeña. Se contempla que el dominio de unión a HSA de una proteína de unión a antígeno es bastante pequeño y no más de 25 kD, no más de 20 kD, no más de 15 kD o no más de 10 kD en algunas modalidades. En ciertos casos, el dominio de unión de HSA es de 5 kD o menos si es un péptido o una molécula pequeña.

[0179] En muchas modalidades, el dominio de extensión de vida media es un dominio de unión a antígeno de dominio único de un anticuerpo de dominio único que se une a HSA. En general, este

dominio se denomina en el presente documento "sdABD" a HSA humano (sdABD-HSA), o alternativamente "sdABD ($\frac{1}{2}$)", para distinguir estos dominios de unión de los sdABD a los TTA. Un sdABD particularmente útil ($\frac{1}{2}$) se muestra en la figura 5.

[0180] El dominio de extensión de vida media de una proteína de unión a antígeno proporciona una farmacodinámica y farmacocinética alteradas de la proteína de unión a antígeno misma. Como anteriormente, el dominio de extensión de vida media extiende el tiempo de eliminación medio. El dominio de extensión de la vida media también altera las propiedades farmacodinámicas, incluida la alteración de la distribución del tejido, la penetración y la difusión de la proteína de unión al antígeno. En algunas modalidades, el dominio de extensión de vida media proporciona un direccionamiento mejorado de tejido (incluyendo tumor), penetración de tejido, distribución de tejido, difusión dentro del tejido y eficacia mejorada en comparación con una proteína sin un dominio de unión de extensión de vida media. En una modalidad, los métodos terapéuticos utilizan de manera efectiva y eficiente una cantidad reducida de la proteína de unión al antígeno, dando como resultado efectos secundarios reducidos, tales como citotoxicidad celular no tumoral reducida.

[0181] Además, las características del dominio de extensión de vida media, por ejemplo, un dominio de unión a HSA, incluyen la afinidad de unión del dominio de unión a HSA por HSA. La afinidad de dicho dominio de unión a HSA se puede seleccionar para dirigir un tiempo medio de eliminación específico en una construcción de polipéptido particular. Por lo tanto, en algunas modalidades, el dominio de unión de HSA tiene una alta afinidad de unión. En otras modalidades, el dominio de unión de HSA tiene una afinidad de unión media. En otras modalidades más, el dominio de unión de HSA tiene una afinidad de unión baja o marginal. Las afinidades de unión ejemplares incluyen concentraciones de KD a 10 nM o menos (alto), entre 10 nM y 100 nM (medio) y mayor que 100 nM (bajo). Como anteriormente, las afinidades de unión a HSA se determinan mediante métodos conocidos, tales como la resonancia de plasmón superficial (SPR).

D. Sitios de escisión de proteasa

[0182] Las composiciones de proteínas de la invención, y particularmente las construcciones de profármacos, incluyen uno o más sitios de escisión de proteasas, generalmente residentes en enlazadores escindibles, como se describe en el presente documento.

[0183] Como se describe en el presente documento, las construcciones de profármacos de la invención incluyen al menos un sitio de escisión de proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es escindida por al menos una proteasa. En algunos casos, las proteínas MCE descritas en este documento comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, o más sitios de escisión de proteasas que son escindidos por al menos una proteasa. Como se analiza más detalladamente en este documento, cuando se usa más de un sitio de escisión de proteasa en una construcción de profármaco, pueden ser los mismos (por ejemplo, múltiples sitios que son escindidos por una sola proteasa) o diferentes (dos o más sitios de escisión son escindidos por al menos dos proteasas diferentes). Como apreciarán los expertos en la técnica, las construcciones que contienen tres o más sitios de escisión de proteasa pueden utilizar uno, dos, tres, etc.; por ejemplo algunas construcciones pueden utilizar tres sitios para dos proteasas diferentes, etc.

[0184] La secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la proteasa dependerá de la proteasa a la que se dirige. Como se sabe en la técnica, hay una serie de proteasas humanas que se encuentran en el cuerpo y pueden asociarse con estados de enfermedad.

[0185] Se sabe que las proteasas son secretadas por algunas células y tejidos enfermos, por ejemplo, células tumorales o cancerosas, creando un microambiente rico en proteasas o un microambiente rico en proteasas. En algunos casos, la sangre de un sujeto es rica en proteasas.

En algunos casos, las células que rodean el tumor secretan proteasas al microambiente tumoral. Las células que rodean las proteasas secretoras de tumores incluyen, entre otras, las células estromales tumorales, miofibroblastos, células sanguíneas, mastocitos, células B, células NK, células T reguladoras, macrófagos, linfocitos T citotóxicos, células dendríticas, células madre mesenquimales, células polimorfonucleares y otras células. En algunos casos, las proteasas están presentes en la sangre de un sujeto, por ejemplo, proteasas que se dirigen a secuencias de aminoácidos que se encuentran en péptidos microbianos. Esta característica permite que la terapéutica dirigida, como las proteínas de unión al antígeno, tenga una especificidad adicional porque las células T no se unirán a la proteína de unión al antígeno, excepto en el microambiente rico en proteasas de las células o tejidos objetivo.

[0186] Las proteasas son proteínas que escinden proteínas, en algunos casos, de una manera específica de secuencia. Las proteasas incluyen, pero no se limitan a, serina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, treonina proteasas, ácido glutámico proteasas, metaloproteasas, asparagina péptido liasa, proteasas séricas, catepsinas (por ejemplo, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina K, catepsina L, catepsina S), calicreínas, hK1, hK10, hK15, KLK7, granzima B, plasmina, collagenasa, collagenasa tipo IV, estromelisina, factor XA, proteasa similar a la quimotripsina, proteasa similar a la tripsina, proteasa similar a la elastasa, proteasa similar a la subtilisina, actinidaína, bromelina, calpaína, caspasas (por ejemplo, caspasa-3), Mir1-CP, papaína, proteasa de VIH-1, proteasa de HSV, proteasa de CMV, quimosina, renina, pepsina, matriptasa, legumaína, plasmepsina, nepenthesina, metaloexopeptidasas, metaloendopeptidas

metaloproteasas de matriz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP11, MMP14, meprina, activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), enteroquinasa, antígeno prostático específico (PSA, hK3), enzima convertidora de interleucina-1 β , trombina, FAP (FAP- α), dipeptidil peptidasa y dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26).

- 5 [0187] Algunas proteasas y secuencias de escisión de proteasas adecuadas se muestran en la figura 5 y la figura 6.

E. Enlazadores

- 10 [0188] Como se discute en el presente documento, los diferentes dominios de la invención generalmente están unidos entre sí usando enlazadores de aminoácidos, que también pueden conferir funcionalidad, incluyendo flexibilidad o inflexibilidad (por ejemplo, restricción estérica) así como la capacidad de escindirse usando una proteasa in situ. Estos enlazadores se pueden clasificar de varias maneras.

- 15 [0189] La invención proporciona "enlazadores de dominio", que se usan para unir dos o más dominios (por ejemplo, un VH y un VL, un dominio de unión al antígeno tumoral objetivo (TTABD, a veces también denominado en el presente documento como " α TTA" (para "anti-TTA") a un VH o VL, un dominio de extensión de vida media a otro componente, etc. Los enlazadores de dominio pueden ser no divisibles (NCL), divisibles ("CL"), restringidos y divisibles (CCL) y limitados y no escindible (CNCL), por ejemplo.

20

1. Enlazadores no escindibles

- [0190] En algunas modalidades, el enlazador de dominio no es escindible. Generalmente, estos pueden ser uno de dos tipos: no escindibles y flexibles, permitiendo que los componentes "aguas arriba" y "aguas abajo" del enlazador en las construcciones se autoensamblen intramolecularmente de ciertas maneras; o no escindible y restringido, donde los dos componentes separados por el enlazador no pueden autoensamblarse intramolecularmente. Cabe señalar, sin embargo, que en el último caso, mientras que los dominios de dos componentes que están separados por el enlazador restringido no escindible no se autoensamblan intramolecularmente, otros componentes intramoleculares se autoensamblarán para formar los pseudo dominios Fv.

30

(i) Enlazadores no escindibles pero flexibles

[0191] En esta modalidad, el enlazador se usa para unir dominios para preservar la funcionalidad de los dominios, generalmente a través de dominios más largos y flexibles que no son escindidos por proteasas in situ en un paciente. Los ejemplos de enlazadores internos no escindibles

adecuados para unir los dominios en los polipéptidos de la invención incluyen, pero no se limitan a (GS)_n, (GGS)_n, (GGGS)_n, (GGSG)_n, (GGSGG)_n, o (GGGGS)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, la longitud del enlazador puede ser de alrededor de 15 aminoácidos.

5

(ii) Enlazadores no separables y restringidos

[0192] En algunos casos, los enlazadores no contienen un sitio de escisión y también son demasiado cortos para permitir que los dominios de proteínas separados por el enlazador se autoensamblen intramolecularmente, y son "enlazadores no escindidos restringidos" o "CNCL".

10 Por ejemplo, en Pro186, un VH activo y un VL activo están separados por 8 aminoácidos (un "8mer") que no permite que el VH y el VL se autoensamblen en un dominio de unión al antígeno activo. En algunas modalidades, el enlazador sigue siendo flexible; por ejemplo, (GGGS)_n donde n=2. En otras modalidades, aunque generalmente menos preferidas, pueden usarse enlazadores más rígidos, tales como los que incluyen prolina o aminoácidos voluminosos.

15

2. Enlazadores escindibles

[0193] Todas las construcciones de profármacos en el presente documento incluyen al menos un enlazador escindible. Por lo tanto, en una modalidad, el enlazador de dominio es escindible (CL), a veces denominado en el presente documento "dominio de escisión de proteasa" ("PCD"). En esta
20 modalidad, el CL contiene un sitio de escisión de proteasa, como se describe aquí y como se representa en la figura 5 y la figura 6. En algunos casos, el CL contiene solo el sitio de escisión de proteasa. Opcionalmente, dependiendo de la longitud del sitio de reconocimiento de escisión, puede haber unos pocos aminoácidos de enlace adicionales en uno o ambos N-terminal o C-terminal del CL; por ejemplo, puede haber de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en uno o ambos N-
25 terminal y C-terminal del sitio de escisión. Por lo tanto, los enlazadores escindibles también pueden ser restringidos (por ejemplo, 8mers) o flexibles.

[0194] De particular interés en la presente invención son los enlazadores escindibles MMP9 y los enlazadores escindibles Meprin, particularmente los enlazadores escindidos restringidos por MMP9 y los enlazadores escindidos restringidos por Meprin.

30

VIII. Dominios de la invención

[0195] La presente invención proporciona varios formatos diferentes para los polipéptidos profármacos de la invención. La presente invención proporciona dominios Fv restringidos y pseudodominios Fv restringidos. Además, la presente invención proporciona proteínas

multivalentes condicionalmente efectivas ("MCE") que contienen dos dominios Fv pero son construcciones no isomerizantes. Como se describe aquí, estos pueden ser Formatos escindibles no isomerizantes o Formatos no escindibles no isomerizantes, aunque cada construcción contiene al menos un dominio de escisión de proteasa.

5 [0196] Es importante destacar que, si bien ambos dominios (dominios Fv y pseudodominios Fv) se denominan en este documento "restringidos", lo que significa que, como se discutió anteriormente y se muestra en la figura 36, figura 37 y figura 38, solo uno de estos debe estar restringido, aunque en general, cuando ambos enlazadores están restringidos, la proteína tiene una mejor expresión.

10 [0197] Los expertos en la materia apreciarán que para los Formatos 1, 2 y 4, hay cuatro posibilidades para el orden N-C-terminal de los dominios restringidos y pseudo Fv de la invención (que no muestran los enlazadores): aVH-aVL e iVL-iVH, aVH-aVL e iVH-iVL, aVL-aVH e iVL-iVH, aVL-aVH e iVH-iVL. Los cuatro han sido probados y los cuatro tienen actividad, aunque el primer orden, aVH-aVL e iVL-iVH, muestra una mejor expresión que los otros tres. Por lo tanto, aunque la descripción en este documento generalmente se muestra en este formato aVH-aVL e iVL-iVH, toda
15 la descripción en este documento incluye también las otras órdenes para estos dominios.

[0198] Tenga en cuenta que, en general, el orden de N a C-terminal para las construcciones de longitud completa de la invención se basa en la orientación aVH-aVL e iVL-iVH.

[0199] Además, se sabe en la técnica que puede haber inmunogenicidad en humanos que se origina a partir de las secuencias C-terminales de ciertos ABD. En consecuencia, en general,
20 particularmente cuando el C-terminal de las construcciones termina en un sdABD (por ejemplo, los dominios sdABD-HSA de muchas de las construcciones, se puede usar una etiqueta de histidina (His6 o His10). las secuencias en este documento se generaron usando etiquetas His6 C-terminales por razones de purificación, pero estas secuencias también se pueden usar para reducir la inmunogenicidad en humanos, como lo demuestran Holland et al., DOI 10.1007/s10875-013-9915-0 y WO2013/024059.
25

A. Dominios restringidos de Fv

[0200] La presente invención proporciona dominios Fv restringidos, que comprenden un VH activo y un dominio VL activo que están unidos covalentemente usando un enlazador restringido (que,
30 como se describe aquí, puede ser escindible (Formatos 1 y 3) o no escindible (Formatos 2 y 4)). El enlazador restringido evita la asociación intramolecular entre aVH y aVL en ausencia de escisión. Por lo tanto, un dominio general de Fv restringido comprende un conjunto de seis CDR contenidos dentro de dominios variables, en donde el vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 del VH se unen al CD-3 humano y el vLCDR1, vCDR2 y vLCDR3 del VL se unen al CD-3 humano, pero en el Formato de

profármaco (por ejemplo, sin escindir), el VH y el VL no pueden asociarse estéricamente para formar un dominio de unión activo, prefiriendo en cambio emparejarse intramolecularmente con el pseudo Fv.

[0201] Los dominios Fv restringidos pueden comprender VH activo y VL activo (aVH y aVL) o VH y VL inactivo (iVH e iVL, en cuyo caso es un pseudo dominio Fv restringido) o combinaciones de los mismos como se describe en el presente documento.

[0202] Como apreciarán los expertos en la materia, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido puede ser (N- a C-terminal) VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH.

[0203] Como se describe en el presente documento, para construcciones de Formato 1, los dominios Fv restringidos pueden comprender un VH y un VL enlazado usando un enlazador escindible, en casos como los mostrados en la figura 5 y la figura 6. En esta modalidad, el dominio Fv restringido tiene la estructura (N a C-terminal) vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-CCL-vIFR1-vICDR1-vIFR2-vICDR2-vIFR3-vICDR3-vIFR4. En general, el dominio Fv restringido contiene dominios VH y VL activos (por ejemplo, puede unirse a CD3 cuando está asociado) y, por lo tanto, tiene la estructura (N- a C-terminal) vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-CCL -vIFR1-avICDR1-vIFR2-avICDR2-vIFR3-avICDR3-vIFR4.

[0204] Como se describe en el presente documento, para construcciones de Formato 2, los dominios Fv restringidos pueden comprender un VH y un VL unidos usando un enlazador no escindible. En esta modalidad, el dominio Fv restringido tiene la estructura (N-a C-terminal) vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-CNCL-vIFR1-vICDR1-vIFR2-vICDR2-vIFR3-vIFR4. En general, el dominio Fv restringido contiene dominios VH y VL activos (por ejemplo, puede unirse a CD3 cuando está asociado) y, por lo tanto, tiene la estructura (N a C-terminal) vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-CNCL-vIFR1-avICDR1-vIFR2-avICDR2-vIFR3-avICDR3-vIFR4.

[0205] De uso particular en la presente invención son dominios Fv no escindidos restringidos que tienen un aVH que tiene SEQ ID NO: 61, un aVL que tiene SEQ ID NO: 49, y un enlazador de dominio que tiene SEQ ID NO: 74.

B. Pseudo dominios Fv restringidos

[0206] La presente invención proporciona dominios pseudo Fv restringidos, que comprenden dominios inactivos o pseudo iVH e iVL que están unidos covalentemente usando un enlazador restringido (que, como se describe aquí, puede ser escindible o no escindible). El enlazador restringido evita la asociación intramolecular entre el iVH y el iVL en ausencia de escisión. Por lo tanto, un dominio pseudo Fv restringido general comprende un iVH y un iVL con regiones marco

que permiten la asociación (cuando está en un formato no restringido) del iVH e iVL, aunque el pseudo dominio Fv resultante no se une a una proteína humana. Los dominios iVH pueden ensamblarse con dominios aVL, y los dominios iVL pueden ensamblarse con dominios aVH, aunque las estructuras resultantes no se unen a CD3.

- 5 [0207] Los pseudo dominios Fv restringidos comprenden VH y VL inactivos (iVH e iVL).
 [0208] Como apreciarán los expertos en la materia, el orden de VH y VL en un pseudo dominio Fv restringido puede ser (N- a C-terminal) VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH.
 [0209] Como se describe en el presente documento, los pseudo dominios Fv restringidos pueden comprender un iVH y un iVL enlazado usando un enlazador no escindible, como se muestra en los
 10 Formatos 1, 2 y 4, o con enlazadores escindibles, como se muestra en el Formato 3.
 [0210] En general, el dominio Fv restringido contiene dominios VH y VL inertes (por ejemplo, capaz de unirse a CD3 cuando está asociado) y, por lo tanto, tiene la estructura (N-a C-terminal) vhFR1-ivICDR1-vhFR2-ivICDR2-vhFR3-ivICDR3- vhFR4-CNCL-vIFR1-ivhCDR1-vIFR2-ivhCDR2-vIFR3-ivhCDR3-vIFR4.
 15 [0211] De uso particular en la presente invención son dominios pseudo Fv restringidos no escindibles que tienen un iVH que tiene SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 69, un iVL que tiene SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 57, y un enlazador de dominio que tiene SEQ ID NO: 74.

IX. Formatos de la invención

- 20 Como se discute en el presente documento, los constructos profármacos de la invención pueden adoptar varios formatos diferentes, incluidos los formatos escindibles con dominios de unión a TTA duales, formatos no escindibles con dominios de unión a TTA duales (cualquiera de los cuales puede tener los mismos dominios de unión a TTA o diferentes dominios de enlace) y formatos no escindibles con un solo dominio de direccionamiento.

25

A. Formatos escindibles con doble direccionamiento

- [0212] La invención proporciona Formatos escindibles no isomerizantes del tipo "Formato 1" en la figura 1. En esta modalidad, el dominio Fv restringido comprende dominios VH y VL que están unidos usando enlazadores escindibles restringidos y el pseudo dominio Fv restringido usa
 30 enlazadores restringidos no escindibles. Para facilitar la discusión, se hace referencia a ambos como "restringidos", pero como se discutió anteriormente y se muestra en la figura 36, figura 37 y figura 38, solo uno de estos debe restringirse, aunque generalmente, cuando ambos enlazadores están restringidos, la proteína tiene mejor expresión.
 [0213] Todas las construcciones en el Formato 1 (así como los otros formatos) también tienen un

enlazador escindible (CL) que es escindido por una proteasa tumoral humana.

[0214] La invención proporciona proteínas de profármacos, que comprenden, desde N- hasta C-terminal, (sdABD-TTA1)-dominio enlazador-dominio Fv restringido-enlazador-(sdABD-TTA2)-pseudo dominio Fv restringido-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

5 [0215] Como se apreciará por los expertos en la técnica, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido o en un pseudo dominio Fv restringido puede ser (N- a C-terminal) VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH.

[0216] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-
10 TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0217] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVH- CCL-iVL-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0218] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVL-CCL-aVH-enlazador de dominio-(sdABD-
15 TTA2)-CL-iVL- CCL-iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0219] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVL-CCL-aVH-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVH- CCL-iVL-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

20 [0220] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-NCL-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH e iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5.

[0221] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-
25 sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de orientación se unen al mismo TTA, que puede ser EGFR, EpCAM, FOLR1 o B7H3, cuyas secuencias son representado en la figura 5.

[0222] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-
30 sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a diferentes TTA.

[0223] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-
sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la

figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EGFR y EpCAM, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0224] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EGFR y FOLR1, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0225] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de orientación se unen a EGFR y B7H3, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0226] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EpCAM y FOLR1, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0227] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EpCAM y B7H3, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0228] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a B7H3 y FOLR1, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0229] En algunas modalidades, la construcción de profármaco comprende sdABD (TTA1)-dominio enlazador-aVH-CCL-aVL-dominio enlazador-sdABD (TTA2)-CL-iVL-CNCL-iVH-dominio enlazador-sdABD ($\frac{1}{2}$). En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de orientación se unen al mismo TTA, que puede ser EGFR, FOLR1, B7H3 o EpCAM, cuyas secuencias son representada en la figura 5, y el CCL y CL se seleccionan de un enlazador que es cortado por MMP9 o meprin, y el sdABD ($\frac{1}{2}$) tiene SEQ ID NO: 45.

[0230] En el Formato 1, un enlazador de dominio preferido es SEQ ID NO: 74 (que también sirve como un enlazador restringido no escindible restringido preferido).

[0231] En el Formato 1, las construcciones preferidas son Pro140 y Pro140b.

5 B. Formatos no escindibles

[0232] Como se muestra en la figura 2, la invención proporciona Formatos no isomerizantes no escindibles. En esta modalidad, se entiende que lo "no escindible" se aplica únicamente al enlace del dominio Fv restringido, ya que existe el sitio de escisión activante en la construcción del profármaco. En esta modalidad, el dominio Fv restringido comprende dominios VH y VL que están
10 enlazados usando enlazadores no escindibles restringidos y el pseudo dominio Fv restringido usa enlazadores no escindidos restringidos.

[0233] Como apreciarán los expertos en la técnica, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido o en un pseudo dominio Fv restringido puede ser VH-enlazador-VL o VL (N- a C-terminal)-enlazador-VH.

15 [0234] La invención proporciona proteínas de profármacos, que comprenden, desde el N- a C-terminal, sdABD(TTA1)-enlazador de dominio-dominio Fv restringido-enlazador de dominio-sdABD(TTA2)-enlazador escindible-pseudo dominio Fv restringido-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0235] Como apreciarán los expertos en la técnica, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido o en un pseudo dominio Fv restringido puede ser VH-enlazador-VL o VL (N- a C-terminal)-enlazador-VH.

[0236] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- a C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL- CNCL-iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

25 [0237] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-dominio enlazador-(sdABD-TTA2)-CL-iVH- CNCL-iVL-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0238] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVL-CNCL-aVH-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL- CNCL-iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

30 [0239] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVL-CNCL-aVH-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVH- CNCL-iVL-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

[0240] En algunas modalidades, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal:

(sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de orientación se unen al mismo TTA, que puede ser EGFR, EpCAM, FOLR1 o B7H3, cuyas secuencias son representado en la figura 5.

[0241] En algunas modalidades, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a diferentes TTA.

[0242] En algunas modalidades, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-dominio enlazador-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EGFR y EpCAM, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0243] En algunas modalidades, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EGFR y FOLR1, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0244] En algunas modalidades, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EGFR y B7H3, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0245] En algunas modalidades, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-dominio enlazador-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EpCAM y FOLR1, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0246] En algunas modalidades, la proteína profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-dominio enlazador-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-

CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a EpCAM y B7H3, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0247] En algunas modalidades, la proteína profármaco comprende, desde N- hasta C-terminal:

5 (sdABD-TTA1)-dominio enlazador-aVH-CNCL-aVL-dominio enlazador-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de direccionamiento se unen a FOLR1 y B7H3, y los sdABD-TTA tienen las secuencias en la figura 5.

[0248] En algunas modalidades, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal:

10 (sdABD-TTA1)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-enlazador de dominio-(sdABD-TTA2)-CL-iVL-CNCL- iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA. En esta modalidad, los aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, los dos dominios de orientación se unen al mismo TTA, que puede ser EGFR, FOLR1, B7H3 o EpCAM, cuyas secuencias son representada en la figura 5, y el CCL y CL se seleccionan de un enlazador que es
15 cortado por MMP9 o meprin, y el sdABD ($\frac{1}{2}$) tiene SEQ ID NO: 45.

[0249] En el Formato 2, un enlazador de dominio preferido es SEQ ID NO: 74 (que también sirve como un enlazador restringido no escindible preferido).

[0250] En el Formato 2, las modalidades de uso particular incluyen, pero no se limitan a, Pro186, Pro225, Pro226, Pro233, Pro311, Pro312, Pro313, Pro495, Pro246, Pro254, Pro255, Pro256,
20 Pro420, Pro421, Pro432, Pro479, Pro480, Pro187, Pro221, Pro222, Pro223, Pro224, Pro393, Pro394, Pro395, Pro396, Pro429, Pro430 y Pro431.

C. Construcciones individuales de TTA

[0251] Como se muestra en la figura 4, las construcciones de "Formato 4" también se incluyen en
25 las composiciones de la invención, que son similares a las construcciones de Formato 2 pero sin un segundo TTA ABD. En esta modalidad, se entiende que lo "no escindible" se aplica únicamente al enlace del dominio Fv restringido, ya que existe el sitio de escisión activante en la construcción del profármaco. En esta modalidad, el dominio Fv restringido comprende dominios VH y VL que están enlazados usando enlazadores no escindibles restringidos y el pseudo dominio Fv
30 restringido usa enlazadores no escindidos restringidos.

[0252] Como se apreciará por los expertos en la técnica, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido o en un pseudo dominio Fv restringido puede ser (VN-C-terminal) VH-enlazador-VL o VL -enlazador-VH.

[0253] La invención proporciona proteínas de profármacos, que comprenden, desde N- hasta C-

terminal, sdABD(TTA)-enlazador de dominio-dominio Fv restringido-enlazador escindible- sdABD-HSA-pseudo dominio Fv restringido. (Tenga en cuenta que para todas las construcciones para este formato, el sdABD-HSA generalmente no tiene una etiqueta His6, aunque puede incluirse).

[0254] Como apreciarán los expertos en la técnica, el orden de VH y VL en un dominio Fv restringido o en un pseudo dominio Fv restringido puede ser VH-enlazador-VL o VL (N- a C-terminal)-enlazador-VH.

[0255] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína de profármaco comprende, desde el N- a C-terminal: (sdABD-TTA)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-enlazador de dominio-iVL- CNCL-iVH.

[0256] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-enlazador de dominio-iVH- CNCL-iVL.

[0257] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína de profármaco comprende, desde el N- al C-terminal: (sdABD-TTA)-enlazador de dominio-aVL-CNCL-aVH-CL-(sdABD-HSA)-enlazador de dominio-iVH- CNCL-iVL.

[0258] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína de profármaco comprende, desde el N- a C-terminal: (sdABD-TTA)-enlazador de dominio-aVL-CNCL-aVH-CL-(sdABD-HSA)-enlazador de dominio-iVL- CNCL-iVH.

[0259] Por lo tanto, en una modalidad, la proteína profármaco comprende, desde el N- a C-terminal: (sdABD-TTA)-enlazador de dominio-aVH-CNCL-aVL-CL-(sdABD-HSA)-enlazador de dominio-iVL-CNCL-iVH. En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL tienen las secuencias que se muestran en la figura 5. En esta modalidad, el dominio de direccionamiento se une a un TTA que puede ser EGFR, EpCAM, FOLR1 o B7H3, cuyas secuencias se representan en la figura 5.

[0260] En el Formato 4, un enlazador de dominio preferido es SEQ ID NO: 74 (que también sirve como un enlazador restringido no escindible restringido preferido).

[0261] En el Formato 4, un sdABD-HSA preferido es el de SEQ ID NO: 45.

D. Dos composiciones proteicas

[0262] En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden dos moléculas diferentes, a veces denominadas "hemi-COBRAs™", o "hemi-construcciones", que en ausencia de escisión, se asocian intramolecularmente para formar pseudo-Fvs. En presencia de la proteasa, los sitios de escisión se escinden, liberando los dominios variables inertes, y el par de proteínas forma un dominio de unión a antígeno activo a CD3, como se representa generalmente en la figura 3.

[0263] Lo importante en el diseño de las hemi-construcciones es que el dominio variable activo y el sdABD-TTA permanecen juntos después de la escisión, de modo que las dos porciones escindidas se mantienen juntas por el receptor de antígeno tumoral en la superficie del tumor y luego puede formar un dominio de unión activo anti-CD3.

- 5 [0264] Hay dos construcciones generales de Formato 3 diferentes, aquellas en las que cada miembro del par tiene un único sdABD-TTA (figura 3A) y aquellas con dos diferentes sdABD-TTA, cada una con un TTA diferente (figura 3B).

1. Construcciones Hemi-COBRA™ con dominios de unión a TTA únicos (Formato

10 3A)

[0265] En algunas modalidades, el primer hemi-COBRA™ tiene, desde N- hasta C-terminal, sdABD (TTA1)- enlazador de dominio -aVH-CL-iVL-enlazador de dominio- sdABD ($\frac{1}{2}$) y el segundo tiene sdABD ($\frac{1}{2}$)-enlazador de dominio -iVH-CL-aVL- enlazador de dominio -sdABD (TTA2). En esta modalidad, aVH, aVL, iVH, iVL y sdABD ($\frac{1}{2}$) tienen las secuencias que se muestran en la figura 5, y sdABD-TTAa se unen a EGFR humano, EpCAM, FOLR1 y/o B7H3, y tienen una secuencia representada en la figura 5.

2. Construcciones Hemi-COBRA™ con ABD TTA duales

[0266] En algunas modalidades, las construcciones de profármaco emparejadas pueden tener dos dominios de unión a sdABD-TTA por construcción, como se muestra en la figura 3B. En estas modalidades, el primer miembro del par comprende, desde el N- al C-terminal, sdABD-TTA1-enlazador de dominio-sdABD-TTA2-enlazador de dominio-aVH-CL-iVL-enlazador de dominio-sdABD (HAS), y el segundo miembro comprende, desde el N al C terminal, sdABD-TTA1-enlazador de dominio-sdABD-TTA2-aVL-CL-iVH-enlazador de dominio-sdABD-HSA.

25 [0267] Los dos sdABD-TTA en cada miembro del par son diferentes, pero generalmente ambos miembros (hemi-COBRA™) tienen los mismos dos sdABD-TTA, por ejemplo ambos tienen EGFR y FOLR1 o EGFR y B7H3, etc.

[0268] Los dos sdABD-TTA se seleccionan en algunas modalidades de las que se muestran en la figura 5.

30

X. Métodos para hacer las composiciones de la invención

[0269] Las composiciones de profármacos de la invención se preparan como generalmente apreciarán los expertos en la técnica y se describen a continuación.

[0270] La invención proporciona composiciones de ácido nucleico que codifican las composiciones

de profármacos de la invención. Como apreciarán los expertos en la técnica, las composiciones de ácido nucleico dependerán del formato del(de los) polipéptido(s) de profármacos. Así, por ejemplo, cuando el formato requiere dos secuencias de aminoácidos, como las construcciones del "Formato 3", se pueden incorporar dos secuencias de ácido nucleico en uno o más vectores de expresión para la expresión. De manera similar, las construcciones de profármacos que son un polipéptido único (Formatos 1, 2 y 4), necesitan un único ácido nucleico en un solo vector de expresión para la producción.

[0271] Como se sabe en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la invención pueden incorporarse en vectores de expresión como se conoce en la técnica, y dependiendo de las células huésped utilizadas para producir las composiciones de profármacos de la invención. En general, los ácidos nucleicos están operativamente unidos a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores seleccionables, sitios de unión a ribosomas, inductores, etc.). Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos o integradores.

[0272] Los ácidos nucleicos y/o vectores de expresión de la invención se transforman luego en cualquier número de tipos diferentes de células huésped como es bien conocido en la técnica, incluyendo células de mamífero, bacterianas, de levadura, de insectos y/o fúngicas, con mamíferos. células (por ejemplo, células CHO, células 293), encontrando uso en muchas modalidades.

[0273] Las composiciones de profármacos de la invención se preparan cultivando células huésped que comprenden los vectores de expresión como es bien conocido en la técnica. Una vez producidos, se realizan los pasos tradicionales de purificación de anticuerpos, que incluyen un paso de cromatografía de afinidad de proteína A y/o un paso de cromatografía de intercambio iónico.

XI. Formulación y administración de las composiciones de profármacos de la invención

[0274] Las formulaciones de las composiciones de profármacos usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando los profármacos (proteínas individuales en el caso de los Formatos 1, 2 y 4 y dos proteínas en el caso del Formato 3) que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (como se describe generalmente en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

[0275] Las composiciones de profármacos de la invención se administran a un sujeto, de acuerdo

con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo.

[0276] Las composiciones de profármacos de la invención son útiles en el tratamiento del cáncer.

5 XII. EJEMPLOS

A. Ejemplo 1: Construcción y purificación de pro construcción

[0277] Transfecciones

10 [0278] Cada proteína (por ejemplo, proteínas individuales para los Formatos 1, 2 y 4) o pares de construcciones (Formato 3) se expresaron a partir de un vector de expresión separado (derivado pcdna3.4). Se mezclaron y transfectaron cantidades iguales de ADN plasmídico que codificaba el par de construcciones de hemi-cobra o de cadena única a células Expi293 siguiendo el protocolo de transfección de la fabricación. Los medios acondicionados se cosecharon 5 días después de la transfección por centrifugación (6000 rpm x 25") y filtración (filtro de 0.2 μ M). La expresión de proteínas fue confirmada por SDS-PAGE. Las construcciones se purificaron y la composición de regulador de pH final fue: citrato 25 mM, arginina 75 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 4%, pH 7. Las preparaciones finales se almacenaron a -80°C.

20 [0279] Activación de MMP9

[0280] La MMP9 humana recombinante (rh) se activó de acuerdo con el siguiente protocolo. La MMP-9 humana recombinante (R&D # 911-MP-010) está a 0.44 mg/ml (4.7 μ M). El acetato de p-aminofenilmercurio (APMA) (Sigma) se prepara a la concentración madre de 100 mM en DMSO. El regulador de pH de ensayo es Tris 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 al 0.05%.

25 [0281] Diluir rhMMP9 con regulador de pH de ensayo a ~100 μ g/ml (25 μ l hMMP9 + 75 μ l regulador de pH de ensayo)

[0282] Agregue acetato de p-aminofenilmercúrico (APMA) de solución madre 100 mM en DMSO a una concentración final de 1 mM (1 μ l a 100 μ l)

[0283] Incubar a 37°C durante 24 horas

30 [0284] Diluir MMP9 a 10 ng/ μ l (agregar 900 μ l de regulador de pH de ensayo a 100 μ l de solución activada)

[0285] La concentración de rhMMP9 activado es ~100 nM.

[0286] Escisión de construcciones para ensayos TDCC

[0287] Para escindir las construcciones, se suministraron 100 μ l de la muestra de proteína a una

concentración de 1 mg/ml (10.5 μ M) en el regulador de pH de formulación (ácido cítrico 25 mM, L-arginina 75 mM, NaCl 75 mM, sacarosa al 4%) con CaCl_2 hasta 10 mM. Se añadió rhMMP9 activado a la concentración 20-35 nM. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante la noche (16-20 h). La integridad de la escisión se verificó utilizando SDS PAGE (10-20% TG, regulador de pH de ejecuciónTG, 200v, 1hr). Las muestras fueron típicamente escindidas en un 98%.

B. Ejemplo 2: Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC)

[0288] Las células HT-29 transducidas con luciferasa de luciérnaga se cultivaron hasta aproximadamente 80% de confluencia y se separaron con Versene (EDTA 0,48 mM en PBS - Ca - Mg). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio TDCC (FBS inactivado por calor al 5% en RPMI 1640 con HEPES, GlutaMax, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y β -mercaptoetanol). Las células Pan-T humanas purificadas se descongelaron, se centrifugaron y se resuspendieron en medio TDCC.

[0289] Se añadió un co-cultivo de células HT-29_Luc y células T a placas de cultivo celular de 384 pocillos. Luego se agregaron COBRA diluidos en serie al co-cultivo y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Finalmente, se añadió a las placas un volumen igual de reactivo de ensayo de luciferasa SteadyGlo y se incubó durante 20 minutos. Las placas se leyeron en Perkin Elmer Envision con un tiempo de exposición de 0.1s/pozo. La luminiscencia total se registró y los datos se analizaron en GraphPad Prism 7.

C. Ejemplo 3: Diseño de protocolo general del modelo de eficacia de transferencia de células T adoptivo *in vivo*

[0290] Estos protocolos se usaron en muchos de los experimentos de las figuras. Se implantaron células tumorales subcutáneas (SC) en el flanco derecho de ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (The Jackson Laboratory, Cat. No. 005557) y se les permitió crecer hasta un tumor establecido con un volumen medio de alrededor de 200 mm^3 . En paralelo, se cultivaron células T humanas en medios de células T (X-VIVO 15 [Lonza, Cat. No. 04-418Q], suero humano al 5%, penicilina/estreptomicina al 1%, 2-mercaptoetanol 0.01 mM) en un G-Rex100M matraz permeable a los gases (Wilson Wolf Cat. No. 81100S) con MACSiBeads del kit de activación/expansión de células T (Miltenyi Cat. No. 130-091-441) durante aproximadamente 10 días y suplementado con proteína recombinante de IL-2 humana. El crecimiento del tumor en ratones y la activación/expansión de células T humanas se coordinaron de manera que el día 0 del estudio los ratones se aleatorizaron en grupos (N = 6) en función del tamaño del tumor; cada uno

se inyectó por vía intravenosa (IV) con 2.5×10^6 células T humanas cultivadas y se les administró la primera dosis de COBRA o moléculas de control. Los ratones se dosificaron cada 3 días durante 7 dosis (días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) y luego se siguieron durante 2-3 semanas adicionales hasta que los tumores alcanzaron un volumen $>2000 \text{ mm}^3$ o se terminó el estudio. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3 días.

D. Ejemplo 4: Actividad *in vivo* con EGFR/MMP9 Hemi-COBRA Par Pro77 y Pro53

[0291] Se implantaron 5×10^6 células LoVo o 5×10^6 células HT29 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (The Jackson Laboratory, Cat. No. 005557) y se dejaron crecer hasta que se establecieron los tumores. En paralelo, se cultivaron células T humanas en medios de células T (X-VIVO 15 [Lonza, Cat. No. 04-418Q], suero humano al 5%, penicilina/estreptomicina al 1%, 2-mercaptoetanol 0.01 mM) en un G-Rex100M matraz permeable a los gases (Wilson Wolf Cat. No. 81100S) con MACSiBeads del kit de activación/expansión de células T (Miltenyi Cat. No. 130-091-441) durante 10 días y suplementado con proteína recombinante de IL-2 humana. El crecimiento del tumor en ratones y la activación/expansión de células T humanas se coordinaron de manera que el día 0 del estudio los ratones se aleatorizaron en grupos (N = 6) en función del tamaño del tumor; cada uno se inyectó por vía intravenosa (IV) con 2.5×10^6 células T humanas cultivadas y se les administró la primera dosis de COBRA o moléculas de control. Los ratones se dosificaron cada 3 días durante 7 dosis (días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) y luego se siguieron hasta que los tumores alcanzan $> 2000 \text{ mm}^3$ en volumen o se terminó el estudio. Los grupos recibieron 0.2 mg/kg (mpk) del anticuerpo biespecífico Pro51 de control positivo anti-EGFR x CD3 (bsAb), 0.5 mpk de la lisozima anti-huevo de gallina de control negativo (HEL) x CD3 bsAb Pro98, 0.5 mpk cada uno de los MMP9 enlazador escindible que contiene el par hemi-COBRA anti-EGFR Pro77 y Pro53, o 0,5 mpk cada uno de los enlazadores no escindibles (NCL) que contiene el par hemi-COBRA anti-EGFR Pro74 y Pro72. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3 días.

E. Ejemplo 5: Actividad *in vivo* con EGFR/MMP9 COBRA Pro140

[0292] Se implantaron 5×10^6 células LoVo o 5×10^6 células HT29 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (The Jackson Laboratory, Cat. No. 005557) y se dejaron crecer hasta que se establecieron los tumores. En paralelo, las células T humanas se cultivan en medio de células T (X-VIVO 15 [Lonza, No de cat. 04-418Q], suero humano al 5%, penicilina/estreptomicina al 1%, 2-mercaptoetanol 0.01 mM) en un G-Rex100M matraz permeable a los gases (Wilson Wolf Cat. No. 81100S) con MACSiBeads del kit de

activación/expansión de células T (Miltenyi Cat. No. 130-091-441) durante 10 días y suplementado con proteína recombinante de IL-2 humana. El crecimiento del tumor en ratones y la activación/expansión de células T humanas se coordinaron de manera que el día 0 del estudio los ratones se aleatorizaron en grupos (N = 6) en función del tamaño del tumor; cada uno se inyectó por vía intravenosa (IV) con 2.5×10^6 células T humanas cultivadas y se les administró la primera dosis de COBRA o moléculas de control. Los ratones se dosificaron cada 3 días durante 7 dosis (días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) y luego se siguieron hasta que los tumores alcanzan $>2000 \text{ mm}^3$ en volumen o se terminó el estudio. Los grupos recibieron 0.2 mpk del anticuerpo biespecífico Pro51 de control positivo anti-EGFR x CD3 (bsAb), 0.5 mpk de la lisozima anti-huevo de gallina de control negativo (HEL) x CD3 bsAb Pro98, o 0.5 mpk del enlazador escindible MMP9 que contiene anti EGFR COBRA Pro140. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3 días.

F. Ejemplo 6: Actividad *in vivo* con EGFR/MMP9 COBRA Pro186

[0293] Se implantaron 5×10^6 células HT29 por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (The Jackson Laboratory, Cat. No. 005557) y se les permitió crecer hasta que se establecieron los tumores. En paralelo, las células T humanas se cultivan en medios de células T (X-VIVO 15 [Lonza, No. de cat. 04-418Q], suero humano al 5%, penicilina/estreptomicina al 1%, 2-mercaptoetanol 0.01 mM) en un G-Rex100M matraz permeable a los gases (Wilson Wolf Cat. No. 81100S) con MACSiBeads del kit de activación/expansión de células T (Miltenyi Cat. No. 130-091-441) durante 10 días y suplementado con proteína recombinante de IL-2 humana. El crecimiento del tumor en ratones y la activación/expansión de células T humanas se coordinaron de manera que el día 0 del estudio los ratones se aleatorizaron en grupos (N = 6) en función del tamaño del tumor; cada uno se inyectó por vía intravenosa (IV) con 2.5×10^6 células T humanas cultivadas y se les administró la primera dosis de COBRA o moléculas de control. Los ratones se dosificaron cada 3 días durante 7 dosis (días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) y luego se siguieron hasta que los tumores alcanzan $>2000 \text{ mm}^3$ en volumen o se terminó el estudio. Los grupos recibieron 0,1 mg/kg (mpk) del anticuerpo biespecífico Pro51 de control positivo anti-EGFR x CD3 (bsAb), 0.3 mpk del enlazador de control no escindible (NCL) que contiene COBRA Pro214 anti-EGFR, 0,1 o 0.3 mpk del enlazador divisible MMP9 que contiene anti-EGFR COBRA Pro140, o 0.1 o 0.3 mpk del enlazador divisible MMP9 que contiene anti-EGFR COBRA Pro186. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3 días.

G. Ejemplo: humanización exitosa de secuencias anti-EGFR

[0294] Los resultados se muestran a continuación.

Molécula	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis(1/s)
Pro22 (EGFR parental)	2.58E-09M/2.6 nM	2.05E+05	5.27E-04
Pro90 (hEGFR1)	2.00E-09M/2.0 nM	2.21E+05	4.40E-04
Pro48 (EGFR2)	2.89E-09M/2.9 nM	6.09E+05	1.76E-03
Pro137 (hEGFR2)	4.36E-09M/4.4. nM	5.85E+05	2.55E-03
Pro51 (hEGFR2)	3.27E-09M/3.2 nM	6.45E+05	2.11E-03
Pro201 (hEGFR2 con 2 sitios de unión)	2.25E-12M/2.3 pM	1.55E+06	3.48E-06

[0295] Estos resultados muestran que la humanización de los dominios de unión de EGFR fue exitosa y que existe una fuerte afección por el EGFR objetivo cuando hay dos sitios de unión en la molécula.

[0296] Ejemplo: humanización exitosa de sdABD de EpCAM

[0297] Los resultados se muestran a continuación.

Clon	Afinidad de union humana (nM)	Afinidad de union Cyno (nM)	Reactividad cruzada Cyno/Humana
VIB-13	2.3	11.6	5
hVIB-13	2.8	12.7	4.5
VIB-23	4.2	46.7	11.1
hVIB-23	4.1	58.8	12.6

[0298] Estos resultados muestran que la humanización de los dominios de unión de EpCAM fue exitosa.

XIII. REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende, de N- a C-terminal:

- a) un primer dominio de unión a antígeno de dominio único (sdABD) que se une a un antígeno objetivo de tumor humano (TTA) (sdABD-TTA);
 - b) un primer enlazador de dominio;
 - c) un dominio Fv restringido que comprende:
 - i) un primer dominio pesado variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3;
 - ii) un enlazador no escindible restringido (CNCL); y
 - iii) un primer dominio ligero variable que comprende vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3;
 - d) un segundo enlazador de dominio;
 - e) un segundo sdABD-TTA;
 - f) un enlazador escindible (CL);
 - g) un pseudo dominio Fv restringido que comprende:
 - i) un primer pseudo dominio variable ligero;
 - ii) un enlazador no escindible (NCL); y
 - iii) un primer pseudo dominio variable pesado;
 - h) un tercer enlazador de dominio; y
 - i) un tercer sdABD que se une a la albúmina sérica humana;
- en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dicho primer dominio ligero variable y dicho primer dominio pesado pseudo variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo.

2. Una proteína que comprende, de N- a C-terminal:

- a) un primer sdABD-TTA;
- b) un primer enlazador de dominio;
- c) un dominio Fv restringido que comprende:
 - i) un primer dominio pesado variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3;
 - ii) un enlazador escindible restringido (CCL); y
 - iii) un primer dominio ligero variable que comprende vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3;

- d) un segundo enlazador de dominio;
- e) un segundo sdABD-TTA;
- f) un enlazador escindible (CL);
- g) un dominio pseudo Fv restringido que comprende:

5

- i) un primer pseudo dominio variable pesado;
- ii) un enlazador no escindible (NCL); y
- iii) un primer pseudo dominio variable ligero;
- h) un tercer enlazador de dominio; y

- i) un tercer sdABD que se une a la albúmina sérica humana;

10

en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3; en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y en el que dicho primer dominio ligero variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intramolecularmente para

15

formar un Fv inactivo.

3. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho pseudo dominio variable ligero es N-terminal a dicho pseudo dominio pesado variable.

20

4. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho pseudo dominio pesado variable es N-terminal a dicho pseudo dominio ligero variable.

25

5. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho pseudo dominio variable ligero es N-terminal a dicho pseudo dominio pesado variable.

30

6. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho pseudo dominio pesado variable es N-terminal a dicho pseudo dominio ligero variable.

7. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque dicho primer y segundo TTA es el mismo.

8. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6,

caracterizada porque dicho primer y segundo TTA son diferentes.

9. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 caracterizada porque dicho primer y segundo TTA se seleccionan de EGFR, EpCAM, FOLR1 y B7H3.

5 10. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 caracterizada porque dichos primer y segundo sdABD-TTA se seleccionan del grupo que consiste en la SEQ IDNO: 1, SEQ IDNO: 5, SEQ IDNO: 9, SEQ ID NO: 13 , SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.

10 11. La proteína de conformidad con las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque dicho dominio de extensión de vida media tiene la SEQ ID NO: 45.

12. La proteína de conformidad con las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque dicho enlazador escindible se escinde por una proteasa humana seleccionada del grupo que consiste en MMP2, MMP9, Meprin A, Meprin B, cathepsina S, cathepsina K, cathepsina L, GranzimaB, uPA, Kallikrein7, matriptasa y trombina.

15 13. La proteína de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en Pro186, Pro225, Pro226, Pro233, Pro311, Pro312, Pro313, Pro495, Pro246, Pro254, Pro255, Pro256, Pro420, Pro421, Pro432, Pro479, Pro480, Pro187, Pro221, Pro222, Pro223, Pro224, Pro393, Pro394, Pro395, Pro396, Pro429, Pro430 y Pro431.

20 14. Un ácido nucleico que codifica una proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14.

16. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 15.

25 17. Un método para preparar una proteína que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 en condiciones en las que dicha proteína se expresa y recupera dicha proteína.

18. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 a un paciente.

30 19. Una composición que comprende:

a) una primera proteína que comprende, de N- a C-terminal:

i) un primer sdABD-TTA;

ii) un primer enlazador de dominio;

iii) un pseudo dominio Fv que comprende, de N- a C-terminal:

1) una cadena pesada variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3;
 2) un enlazador escindible; y
 3) un primer pseudo dominio ligero variable que comprende iVLCDR1, iVLCDR2 e iVLCDR3;

5

iv) un segundo enlazador de dominio;
 v) un primer sdABD que se une a la albúmina sérica humana;
 a) una segunda proteína que comprende, de N- a C-terminal:
 i) un tercer sdABD que se une a un antígeno objetivo tumoral humano;
 ii) un tercer enlazador de dominio;

10

iii) un pseudo dominio Fv que comprende, de N- a C-terminal:

1) una cadena ligera variable que comprende un VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3;
 2) un enlazador escindible; y
 3) un primer pseudo dominio pesado variable que comprende iVHCDR1, iVHCDR2 e iVHCDR3;

15

iv) un cuarto enlazador de dominio;
 v) un cuarto sdABD que se une a la albúmina sérica humana;
 donde

dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unirse a CD3 humano cuando está asociado;

20

dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo;

dicho primer dominio ligero variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo;

en donde dicho primer y tercer sdABD se seleccionan del grupo que consiste en

25

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.

20. La proteína de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque dicho primer y segundo TTA son iguales.

30

21. La proteína de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque dicho primer y segundo TTA son diferentes.

22. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizada porque dichos sdABD tercero y cuarto tienen la SEQ ID NO: 45.

23. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22.

24. Una composición de vector de expresión que comprende:

a) un primer vector de expresión que comprende el primer ácido nucleico de la reivindicación 23; y

b) un segundo vector de expresión que comprende el segundo ácido nucleico de la reivindicación 23.

25. Una célula huésped que comprende la composición del vector de expresión de la reivindicación 24.

26. Un método para preparar una composición que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 25 en condiciones en las que dichas proteínas se expresan y recuperan dichas proteínas.

27. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 a un paciente.

28. Una composición que comprende:

a) una primera proteína que comprende, de N- a C-terminal:

i) un primer sdABD-TTA;

ii) un primer enlazador de dominio;

iii) un segundo sdABD-TTA;

iv) un segundo enlazador de dominio;

v) un pseudo dominio Fv que comprende, de N- a C-terminal:

1) una cadena pesada variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3;

2) un enlazador escindible; y

3) un primer pseudo dominio ligero variable que comprende iVLCDR1, iVLCDR2 e iVLCDR3;

iv) un enlazador de tercer dominio; y

v) un sdABD-HSA;

a) una segunda proteína que comprende, de N- a C-terminal:

i) un tercer sdABD-TTA;

ii) un cuarto enlazador de dominio;

iii) un cuarto sdABD-TTA;

iv) un quinto enlazador de dominio;

v) un pseudo dominio Fv que comprende, de N a C terminal:

- 1) una cadena ligera variable que comprende un VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3;
- 2) un enlazador escindible; y
- 3) un primer dominio pesado pseudo variable que comprende iVHCDR1, iVHCDR2 e iVHCDR3;

- 5 iv) un enlazador de sexto dominio;
- v) un sdABD-HSA;
- donde

dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unirse a CD3 humano cuando está asociado;

- 10 dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo;

dicho primer dominio ligero variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intermolecularmente para formar un Fv inactivo.

29. La composición de conformidad con la reivindicación 28, caracterizada porque
- 15 dichos sdABD-HSA tienen la SEQ ID NO: 45.

30. Una composición de ácido nucleico que comprende:

- a) un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29; y
- b) un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína de acuerdo con
- 20 cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, respectivamente.

31. Una composición de vector de expresión que comprende:

- a) un primer vector de expresión que comprende el primer ácido nucleico de la reivindicación 30; y
- b) un segundo vector de expresión que comprende el segundo ácido nucleico de la
- 25 reivindicación 30.

32. Una célula huésped que comprende la composición del vector de expresión de la reivindicación 31.

33. Un método para preparar una composición que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 32 en condiciones en las que dichas proteínas se expresan y recuperan dichas proteínas.
- 30

34. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29 a un paciente.

35. Una proteína que comprende, de N- a C-terminal:

- a) un dominio de unión a antígeno de dominio único (sdABD) que se une a un

antígeno objetivo de tumor humano (TTA) (sdABD-TTA);

b) un primer enlazador de dominio;

c) un dominio Fv restringido que comprende:

i) un primer dominio pesado variable que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y

5 vhCDR3;

ii) un enlazador no escindible restringido (CNCL); y

iii) un primer dominio ligero variable que comprende vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3;

d) un enlazador escindible (CL);

e) un segundo sdABD que se une a la albúmina sérica humana;

10 f) un enlazador de dominio;

g) un dominio pseudo Fv restringido que comprende:

i) un primer pseudo dominio variable ligero;

ii) un enlazador no escindible (NCL); y

iii) un primer pseudo dominio variable pesado;

15 en donde dicho primer dominio pesado variable y dicho primer dominio ligero variable son capaces de unir CD3 humano pero dicho dominio Fv restringido no se une a CD3;

dicho primer dominio pesado variable y dicho primer pseudo dominio ligero variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo; y

20 dicho primer dominio ligero variable y dicho primer pseudo dominio pesado variable se asocian intramolecularmente para formar un Fv inactivo.

36. La proteína de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho pseudo dominio variable ligero es N-terminal a dicho pseudo dominio pesado variable.

25 37. La proteína de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque dicho primer dominio pesado variable es N-terminal a dicho primer dominio ligero variable y dicho pseudo dominio pesado variable es N-terminal a dicho pseudo dominio ligero variable.

38. La proteína de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho pseudo dominio variable ligero es N-terminal a dicho pseudo dominio pesado variable.

30 39. La proteína de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque dicho primer dominio ligero variable es N-terminal a dicho primer dominio pesado variable y dicho pseudo dominio pesado variable es N-terminal a dicho pseudo dominio ligero variable.

40. La proteína de conformidad con las reivindicaciones 35 a 39, caracterizada porque dicho TTA se selecciona de EGFR, EpCAM, FOLR1 y B7H3.

41. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, caracterizada porque dicho sdABD-TTA se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41.

5 42. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, caracterizada porque dicho dominio de extensión de vida media tiene la SEQ ID NO: 45.

 43. La proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42, caracterizada porque dicho enlazador escindible es escindido por una proteasa humana seleccionada del grupo que consiste en MMP2, MMP9, Meprin A, Meprin B, catepsina S, catepsina
10 K, catepsina L, GranzimaB, uPA , Kallekrien7, matriptasa y trombina.

 44. La proteína de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque comprende Pro258, Pro356, Pro359, Pro388 y Pro364.

 45. Un ácido nucleico que codifica una proteína de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44.

15 46. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 45.

 47. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación
46.

 48. Un método para fabricar una proteína que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 47 en condiciones en las que dicha proteína se expresa y recupera dicha
20 proteína.

 49. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44 a un paciente.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se refiere a construcciones de activación redirigidas biespecíficas convencionales, o COBRA, que se administran en un formato profármaco activo. Tras la
5 exposición a las proteasas tumorales, las construcciones se escinden y activan, de modo que pueden unirse tanto a los antígenos objetivo tumorales (TTA) como a CD3, reclutando así las células T que expresan CD3 al tumor, lo que da como resultado el tratamiento.