

ANTICUERPOS QUE SE UNEN A CÉLULAS CANCEROSAS YQUE DIRIGEN RADIONUCLEIDOS A DICHAS CÉLULAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a antígenos en células objetivo y que dirigen radionucleidos a dichas células, y a sus métodos de uso.

ANTECEDENTES

Los anticuerpos monoclonales se han desarrollado para dirigir fármacos a las células cancerosas. Al conjugar un agente tóxico con un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a un tumor, existe la posibilidad de proporcionar una muerte tumoral más específica con menos daño a los tejidos circundantes.

En la radioinmunoterapia pre-dirigida (PRIT), se hace uso de un constructo de anticuerpo que tiene afinidad por el antígeno asociado a tumor por un lado y por un compuesto radiomarcado por el otro. En un primer paso, el anticuerpo se administra y se localiza en el tumor. Posteriormente, se administra el compuesto radiomarcado. Debido a que el compuesto radiomarcado es pequeño, se puede administrar rápidamente al tumor y se elimina rápidamente, lo que reduce la exposición a la radiación fuera del tumor (Goldenberg *et al* Theranostics 2012, 2 (5), 523–540). Un procedimiento similar también se puede utilizar para obtener imágenes. El pre-direccionamiento puede hacer uso de un anticuerpo o sistemas biespecíficos que utilizan avidina-biotina, aunque este último tiene la desventaja de que la avidina/estreptavidina es inmunogénica.

Los métodos de formación de imágenes o radioinmunoterapia pre-dirigida comúnmente utilizan un agente de eliminación o bloqueo, que se administra entre la etapa de administrar el anticuerpo y la etapa de administrar el compuesto radiomarcado. El propósito es eliminar el anticuerpo de la sangre y/o bloquear el sitio de unión del anticuerpo circulante para el compuesto radiomarcado (véase, por ejemplo, Karacay *et al*, Bioconj. Chem., 13 (5), 1054–1070 (2002)). El uso de un agente de eliminación o bloqueo permite administrar niveles suficientes de radiactividad para un tratamiento eficiente mientras limita la toxicidad adversa, pero el momento y la dosis deben elegirse con cuidado. Por lo tanto, el uso de una fase de eliminación es un aspecto complicado en los métodos de pre-direccionamiento.

SÍNTESIS

La presente invención proporciona conjuntos de anticuerpos útiles en métodos de pre-direccionamiento, y métodos de uso de los mismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos que comprende:

i) un primer anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo, y que además comprende un dominio V_H de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado, pero que no comprende un dominio V_L de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado; y

ii) un segundo anticuerpo que se une al antígeno expresado en la superficie de la célula objetivo, y que además comprende un dominio V_L de un sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado, pero que no comprende un dominio V_H del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado,

en donde dicho dominio V_H del primer anticuerpo y dicho dominio V_L del segundo anticuerpo son juntos capaces de formar un sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado.

Ni el primer ni el segundo anticuerpo comprenden, por sí mismos, un sitio de unión al antígeno funcional para un compuesto radiomarcado. El primer anticuerpo tiene solo un dominio V_H del sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado, y no el dominio V_L . El segundo anticuerpo tiene solo el dominio V_L , y no el dominio V_H .

Se forma un sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado cuando se asocian los dominios V_H y V_L del primer y segundo anticuerpo. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando el primer y el segundo anticuerpo están unidos a la misma célula objetivo individual o a las células adyacentes.

El primer y el segundo anticuerpo descritos en el presente documento pueden denominarse en el presente documento "anticuerpos divididos de dominio único", "anticuerpos divididos" o "semicuerpos". Los dominios V_H y V_L que juntos forman un sitio de unión a antígeno capaz de unirse al compuesto radiomarcado se dividen entre dos anticuerpos y no están presentes como parte del mismo anticuerpo.

El formato de dominio dividido significa que el compuesto radiomarcado no puede unirse ni al primer anticuerpo por sí solo ni al segundo anticuerpo por sí solo. En la sangre,

hay poca o ninguna asociación estable entre el primer y el segundo anticuerpo, y muy poca o ninguna unión estable del compuesto radiomarcado.

Un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo puede denominarse en el presente documento "antígeno objetivo" o "TA". De acuerdo con la presente invención, el primer y el segundo anticuerpo descritos anteriormente tienen un sitio de unión para el mismo antígeno objetivo. (Para evitar dudas, cuando afirmó que los anticuerpos se unen al mismo antígeno objetivo, esto significa que tienen un sitio de unión capaz de unirse al mismo antígeno objetivo e incluye la posibilidad de que los anticuerpos puedan unirse a dos moléculas de antígeno individuales que son iguales entre sí). Por ejemplo, en una forma de realización, tanto el primero como el segundo anticuerpo se unen a CEA.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden unirse (tener un sitio de unión para) el mismo epítipo del antígeno objetivo. En otras formas de realización, el primer anticuerpo puede unirse a (tener un sitio de unión para) un epítipo diferente del antígeno objetivo del segundo anticuerpo.

En algunas formas de realización, el primer y segundo anticuerpo pueden comprender el mismo sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo. Es decir, pueden comprender un sitio de unión al antígeno capaz de unirse al antígeno objetivo, que comprende una secuencia V_L y V_H , donde las secuencias V_L y V_H que forman este sitio de unión al antígeno son las mismas en el primer y en el segundo anticuerpo.

En algunas formas de realización, cada uno de los anticuerpos primero y segundo son bivalentes para el antígeno objetivo. En algunas formas de realización, son bivalentes y monoespecíficos para un epítipo. En otras formas de realización, cada uno de los anticuerpos primero y segundo son biparatópicos para el antígeno objetivo, es decir, el primer y el segundo anticuerpo tienen sitios de unión para dos epítopos diferentes del antígeno objetivo.

En algunas formas de realización, se puede preferir que el primer y/o segundo anticuerpo comprenda una región Fc. La presencia de una región Fc tiene beneficios en el contexto de radioinmunoterapia y radioimagen, por ejemplo prolongando la vida media circulante de la proteína y/o dando como resultado una absorción tumoral más alta que la que se puede observar con fragmentos más pequeños. El formato de "dominio dividido" descrito en el presente documento puede ser particularmente ventajoso en este contexto, ya

que mitiga la mayor posibilidad de asociación con el compuesto radiomarcado que de otro modo ocurriría debido a la presencia prolongada del anticuerpo circulante.

En algunas formas de realización, el dominio Fc se modifica para reducir o eliminar la función efectora.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende dos composiciones farmacéuticas separadas, cada una de las cuales comprende uno de los anticuerpos descritos en el presente documento (es decir, el primer y el segundo anticuerpo respectivamente).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polinucleótido o conjunto de polinucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos o conjuntos de anticuerpos descritos en el presente documento. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector o conjunto de vectores que comprende dicho polinucleótido o polinucleótidos, opcionalmente un vector de expresión o conjunto de vectores de expresión. En un objeto adicional, la presente invención se refiere a una célula huésped procariota o eucariota o a un conjunto de células huésped que comprende un vector o conjunto de vectores de la presente invención. Además, se proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula o células huésped para que se produzca el anticuerpo.

En algunas formas de realización, los anticuerpos como se describen en este documento encuentran uso en un método de radioinmunoterapia pre-dirigida (PRIT) o en un método de radioimagen pre-dirigida.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método de radioinmunoterapia pre-dirigida que comprende:

i) administrar a un sujeto un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo como se describe anteriormente; y

ii) posteriormente administrar a dicho sujeto un compuesto radiomarcado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un primer y un segundo anticuerpo descritos anteriormente para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo a un sujeto, y posteriormente administrar a dicho sujeto un compuesto radiomarcado. En otro aspecto, la invención proporciona un primer anticuerpo como se describe anteriormente para su uso

en un método de tratamiento que comprende administrar el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo a un sujeto, y posteriormente administrar a dicho sujeto un compuesto radiomarcado. En otro aspecto, la invención proporciona el segundo anticuerpo como se describe anteriormente para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo a un sujeto, y posteriormente administrar a dicho sujeto un compuesto radiomarcado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de radioimagen que comprende:

- i) administrar a un sujeto un primer y un segundo anticuerpo como se describe en el presente documento, en donde los anticuerpos se unen al antígeno objetivo y se localizan en la superficie de una célula que expresa el antígeno objetivo;

- ii) administrar posteriormente un compuesto radiomarcado; y opcionalmente

- iii) obtener imágenes del tejido u órgano donde se ha localizado el radionúclido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un primer y un segundo anticuerpo como se describe en el presente documento para su uso en un método de diagnóstico realizado en el cuerpo humano o animal, en donde el método comprende

- i) administrar al sujeto un primer y un segundo anticuerpo como se describe en el presente documento, en donde los anticuerpos se unen al antígeno objetivo y se localizan en la superficie de una célula que expresa el antígeno objetivo;

- ii) administrar posteriormente un compuesto radiomarcado; y opcionalmente

- iii) obtener imágenes del tejido u órgano donde se ha localizado el radionúclido.

El paso de formación de imágenes puede ser seguido por un paso de formar un diagnóstico y, opcionalmente, un paso de entregar ese diagnóstico al sujeto. En algunas formas de realización, el método puede comprender además determinar un tratamiento apropiado y opcionalmente administrar ese tratamiento al sujeto.

En cada uno de los métodos/ usos anteriores, la unión del primer y el segundo anticuerpo a las células objetivo iguales o adyacentes da como resultado la asociación de los dominios V_H y V_L de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado y la formación de un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado. Así, después de la administración del compuesto radiomarcado, el compuesto radiomarcado se une al sitio de unión al antígeno funcional formado por asociación de V_H y V_L .

En cualquiera de los métodos y usos descritos en este documento, el primer y segundo anticuerpo pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden.

Con frecuencia en la técnica, los métodos de PRIT o radioimagen implican un paso de eliminación. El paso de eliminación comprende administrar un agente entre la administración del anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado, en donde el agente aumenta la velocidad de eliminación del anticuerpo de la sangre y/o bloquea la unión del compuesto radiomarcado al anticuerpo.

En una forma de realización de los métodos y usos descritos en este documento, el método no comprende un paso de eliminación. Es decir, no comprende un paso de administrar un agente de eliminación o un agente de bloqueo entre la administración del primer y segundo anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado (es decir, después de la administración de los anticuerpos pero antes de la administración del compuesto radiomarcado). En otra forma de realización, no se administra ningún agente entre la administración del primer y segundo anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado, que no sea opcionalmente un agente radiosensibilizador, inmunoterapéutico y/o quimioterapéutico. En otra forma de realización, no se administra ningún agente entre la administración del primer y segundo anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en este documento pueden administrarse como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, pueden administrarse en combinación con uno o más agentes radiosensibilizadores, inmunoterapéuticos y/o quimioterapéuticos: el agente radiosensibilizador, inmunoterapéutico o quimioterapéutico y los anticuerpos pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden.

Los métodos de radioimagen y radioinmunoterapia descritos en el presente documento se pueden combinar opcionalmente como se describe más adelante en este documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende:

- i) un primer y un segundo anticuerpo como se describe en el presente documento;
- ii) un compuesto radiomarcado que se une al sitio de unión al antígeno formado por asociación del primer y el segundo anticuerpo.

Opcionalmente, el kit puede excluir (es decir, no comprende) un agente de eliminación o un agente de bloqueo como se describe en el presente documento.

Opcionalmente, el kit puede comprender además un agente radiosensibilizador, inmunoterapéutico o quimioterapéutico.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden estar presentes en la misma composición farmacéutica. En otras formas de realización, el primer y segundo anticuerpo pueden estar presentes en composiciones farmacéuticas separadas. En algunas formas de realización, el compuesto radiomarcado está presente en una composición farmacéutica separada de los anticuerpos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico de antígeno objetivo (TA)-DOTAM (TA-DOTAM BsAb) que pertenece a los ejemplos comparativos, y ejemplos de anticuerpos TA-dividido-DOTAM-VH/VL de acuerdo con la invención.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra el ensamblaje del aglutinante DOTAM VH/VL dividido en células tumorales. Los anticuerpos TA-dividido-DOTAM-VH/VL no se unirán significativamente a ^{212}Pb -DOTAM a menos que se unan al antígeno tumoral (TA) en las células objetivo, donde se ensamblan los dos dominios del aglutinante DOTAM.

La Figura 3 muestra una descripción general esquemática de un ejemplo del concepto TA-PRIT de tres pasos, que implica el uso de un agente de eliminación.

La figura 4 muestra una descripción general esquemática de un ejemplo del concepto TA-PRIT de dos pasos, en el que no se utiliza un agente de eliminación.

La Figura 5 muestra la unión de anticuerpos divididos a células MKN45 para demostrar la competencia de unión a CEA. La detección de anticuerpos se realiza utilizando anticuerpos secundarios específicos de IgG humana.

La Figura 6 muestra la unión de anticuerpos divididos a células MKN45 para demostrar la competencia de unión a DOTAM. La detección de anticuerpos se realiza utilizando Pb-DOTAM-FITC.

La Figura 7A muestra un protocolo ejemplar para PRIT de dos pasos con un CEA-dividido-DOTAM-VH/VL, realizado en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3 (h = horas, d = días, w = semanas).

La Figura 7B muestra un protocolo ejemplar para un control PRIT de tres pasos, llevado a cabo en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3 (h = horas, d = días, w = semanas).

La Figura 8 muestra la biodistribución de ^{212}Pb -DOTAM previamente dirigido en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3, 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, previamente dirigido ya sea por CEA-dividido-DOTAM-VH solo, CEA-dividido-DOTAM-VL solo, o los dos anticuerpos complementarios combinados, o utilizando PRIT estándar de tres pasos (% ID/g $\pm$ SD, n = 4).

La Figura 9 muestra la farmacocinética de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL después de la inyección IV en ratones SCID.

La Figura 10 muestra el diseño experimental del protocolo 158, que comprende CEA-PRIT en 2 (arriba) o 3 pasos (abajo) en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3. La dosis de *CEA dividido DOTAM BsAb ajustada para compensar las impurezas agujero/agujero en constructos de 2/4.

La Figura 11 muestra la biodistribución de ^{212}Pb -DOTAM pre-dirigido en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3 (6 h p.i.). La distribución es de ^{212}Pb en ratones SCID portadores de tumor, 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, previamente dirigida por CEA-DOTAM BsAb o combinaciones bi-paratópicas de anticuerpos CEA-dividido-DOTAM. El contenido radiactivo en órganos y tejidos se expresa como promedio % ID/g $\pm$ SD (n = 4).

La Figura 12 muestra el programa experimental del protocolo 160, que comprende un ciclo de CEA-PRIT de 3 pasos (superior), CEA-PRIT de 2 pasos (medio) o CEA-RIT de 1 paso en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3. Los exploradores de biodistribución (BD) se sacrificaron 24 horas después de la inyección radiactiva, mientras que los ratones en los grupos de eficacia se mantuvieron y monitorearon cuidadosamente hasta que se alcanzaron los criterios de terminación.

La Figura 13 muestra la biodistribución de ^{212}Pb -DOTAM pre-dirigido y ^{212}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3 (24 h p.i.). La distribución es de ^{212}Pb en ratones SCID portadores de tumor 24 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM pre-dirigido por CEA-DOTAM o ^{212}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM pre-incubado. El contenido radiactivo en órganos y tejidos se expresa como % promedio de ID/g $\pm$ SD (n = 3).

La Figura 14 muestra promedios de crecimiento tumoral con error estándar para grupos tratados con PRIT y control (grupos A–E) en el modelo BxPC3 ($n = 10$). Las curvas se truncaron en $n < 5$. Las líneas verticales punteadas indican la administración de ^{212}Pb –DOTAM (20 μCi) para algunos o todos los grupos, de acuerdo con el diseño del estudio.

La Figura 15 muestra curvas de crecimiento tumoral individuales para grupos tratados con PRIT y control (grupos A–E) en el modelo BxPC3 ($n = 10$). Las líneas verticales punteadas indican la administración de compuestos marcados con ^{212}Pb (20 μCi).

La Figura 16 muestra la pérdida de peso corporal promedio en ratones tratados con CEA–PRIT y CEA–RIT (grupos A–E, $n = 10$) en el modelo BxPC3. Las curvas se truncaron en $n < 5$. Las líneas verticales punteadas indican la administración de compuestos marcados con ^{212}Pb para algunos o todos los grupos, de acuerdo con el diseño del estudio.

La Figura 17 muestra el diseño experimental del protocolo 175, que comprende CEA–PRIT de dos pasos en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3, con sacrificio y necropsia 24 horas después de la inyección de ^{212}Pb –DOTAM. La dosis de CEA–dividido–DOTAM–VH–AST se ajustó para compensar las impurezas ojal/ojal.

La Figura 18 muestra la distribución de ^{212}Pb en ratones SCID con tumor 24 horas después de la inyección de ^{212}Pb –DOTAM, previamente dirigida por los anticuerpos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL (protocolo 175). El contenido radiactivo en órganos y tejidos se expresa como % promedio ID/g $\pm$ SD ($n = 4$).

La Figura 19 muestra el diseño experimental del protocolo 185, que comprende CEA–PRIT de dos pasos en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3, con sacrificio y necropsia 6 horas después de la inyección ^{212}Pb –DOTAM. La dosis de CEA–dividido–DOTAM–VH–AST (CH1A1A) se ajustó para compensar las impurezas agujero/agujero.

La Figura 20 muestra la distribución de ^{212}Pb en ratones SCID con tumor 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb –DOTAM, previamente dirigida por los anticuerpos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL (protocolo 185). El contenido radiactivo en órganos y tejidos se expresa como % promedio ID/g $\pm$ SD ($n = 5$).

La Figura 21 muestra la distribución de pares CEA–dividido–DOTAM–VH/VL (anticuerpos VH y VL combinados) en dos tumores SC BxPC3 seleccionados 7 días después de la inyección. A y B muestran secciones de un tumor del ratón A3, inyectado con CEA–dividido–DOTAM–VH/VL dirigido a T84.66, donde A muestra la expresión de

CEA, y B muestra la distribución de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL correspondiente. C y D muestran secciones tumorales del ratón C5, inyectado con CEA-dividido-DOTAM-VH/VL dirigido a CH1A1A: C muestra la expresión de CEA y D la distribución correspondiente de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL.

La Figura 22 muestra el diseño experimental del protocolo 189, que comprende CEA-PRIT de dos pasos en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3, con sacrificio y necropsia 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM. La dosis de CEA-dividido-DOTAM-VH-AST (CH1A1A) se ajustó para compensar las impurezas ojal/ojal.

La Figura 23 muestra la distribución de ^{212}Pb en ratones SCID con tumor 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, pre-dirigida por pares bi-paratópicos de anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL (T84.66 y CH1A1A), en comparación con el positivo control (solo CH1A1A). El contenido radiactivo en órganos y tejidos se expresa como % de ID/g $\pm$ SD promedio.

La figura 24 muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) determinada por FACS para anticuerpos SPLIT. La unión de Pb-DOTA-FITC determinada por FACS solo se puede mostrar para una co-incubación de ambos anticuerpos SPLIT con Pb-DOTA-FITC. Los anticuerpos SPLIT únicos no dieron lugar a una señal significativa.

La figura 25 A-C muestra formatos ejemplares de anticuerpos como se describe en el presente documento.

La Figura 26 muestra los resultados del ejemplo 11, experimento 1, que evalúa la unión de los anticuerpos individuales TA-dividido-DOTAM-VH y TA-dividido-DOTAM-VL a DOTAM biotinilado capturado en un chip.

La Figura 27 muestra los resultados del ejemplo 11, experimento 2, que evalúa la unión de DOTAM a los anticuerpos individuales TA-dividido-DOTAM-VH y TA-dividido-DOTAM-VL capturados en un chip.

La Figura 28 muestra los resultados del ejemplo 11, experimento 3, que evalúa la unión de DOTAM a los anticuerpos TA-dividido-DOTAM-VH/VL (pares de anticuerpos), capturados en un chip.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Un "marco humano aceptor" para los fines de este documento es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender su misma secuencia de aminoácidos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos aspectos, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos aspectos, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o la secuencia marco de consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en este documento. A continuación se describen métodos ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), en comparación con un anticuerpo principal que no posee tales alteraciones, tales alteraciones que resultan en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno

El término "un anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a dicho antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento de dicho antígeno. En un aspecto, el grado de unión del anticuerpo a una proteína no antigénica no relacionada es menor de aproximadamente el

10% de la unión del anticuerpo al antígeno medido, por ejemplo, por resonancia de plasmón superficial (SPR). En ciertos aspectos, un anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo cuando el anticuerpo tiene una K_D de $1\mu\text{M}$ o menos. En ciertos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de dicho antígeno que se conserva entre dicho antígeno de diferentes especies.

Los términos "un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado" o "un sitio de unión a antígeno funcional para un compuesto radiomarcado" se refieren a un sitio de unión a antígeno que comprende VH y un dominio VL, capaz de unirse al compuesto radiomarcado con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para asociar el compuesto radiomarcado con el anticuerpo. En un aspecto, el grado de unión del sitio de unión al antígeno a un compuesto no relacionado, no antigénico es menor de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo al compuesto radiomarcado según se mide, por ejemplo, por resonancia de plasmón superficial (SPR). En ciertos aspectos, un sitio de unión a antígeno que se une a un compuesto radiomarcado tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Se puede preferir que tenga una K_D de 100pM , 50pM , 20pM , 10pM , 5pM , 1pM o menos, por ejemplo, $0,9\text{pM}$ o menos, $0,8\text{pM}$ o menos, $0,7\text{pM}$ o menos, $0,6\text{pM}$ o menos o $0,5\text{pM}$ o menos. Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unir el compuesto radiomarcado con una K_d de aproximadamente 1pM – 1nM , por ejemplo, aproximadamente 1 – 10 pM , 1 – 100pM , 5 – 50 pM , 100 – 500 pM o 500pM – 1 nM . Se dice que un sitio de unión a antígeno se "une específicamente" a un compuesto radiomarcado cuando el sitio de unión a antígeno tiene una K_D de $1\mu\text{M}$ o menos.

El término "anticuerpo" en el presente documento se utiliza en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab cruzado, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv y scFab); anticuerpos de dominio único (dAbs); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126–1136 (2005). El término "fragmento Fab" se refiere así a un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio CL, y un fragmento de cadena pesada que comprende un dominio VH y un dominio CH1. Los "fragmentos Fab'" se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de residuos en el extremo carboxi del dominio CH1, que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Para la discusión de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una vida media *in vivo* incrementada, véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.869.046. El término "fragmento Fab cruzado" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab cruzado" se refiere a un fragmento Fab, en el que se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera. Un fragmento Fab cruzado comprende una cadena polipeptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada 1 (CH1), y una cadena polipeptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL). Los brazos Fab asimétricos también se pueden diseñar mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos con o sin carga en las interfaces de dominio para dirigir el emparejamiento Fab correcto. Véase, por ejemplo, el documento WO 2016/172485.

Un "fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" es una proteína de fusión de los dominios variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de un anticuerpo, conectadas por un ligador peptídico. En particular, el ligador es un polipéptido corto de 10 a 25 aminoácidos y generalmente es rico en glicina para flexibilidad, así como serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el extremo N del VH con el extremo C de VL, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del ligador. Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal*

Antibodies, vol. 113, ediciones de Rosenberg y Moore (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269–315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes estadounidenses números 5.571.894 y 5.587.458.

El término "agente de bloqueo" se refiere a un agente que bloquea la unión de una molécula efectora, en particular el compuesto radiomarcado, a un sitio de unión funcional para esa molécula efectora. Generalmente dicho agente de bloqueo se une al sitio de unión funcional para la molécula efectora, por ejemplo, se une específicamente a dicho sitio de unión funcional.

El término "agente de eliminación" se refiere a un agente que aumenta la velocidad de eliminación de un anticuerpo de la circulación del sujeto. Generalmente, el agente de eliminación se une al anticuerpo, por ejemplo, se une específicamente al anticuerpo.

El término "etapa de eliminación" o "fase de eliminación" como se utiliza en el presente documento abarca el uso de un agente bloqueante o un agente de eliminación. Algunos agentes pueden funcionar tanto como un agente de eliminación como de bloqueo.

El término "epítipo" denota el sitio en un antígeno, proteico o no proteico, al que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden formarse a partir de tramos de aminoácidos contiguos (epítipo lineal) o comprender aminoácidos no contiguos (epítipo conformacional), por ejemplo, que se aproximan espacialmente debido al plegamiento del antígeno, es decir, por el plegamiento terciario de un antígeno proteico. Los epítipos lineales todavía están típicamente unidos por un anticuerpo después de la exposición del antígeno proteico a los agentes desnaturizantes, mientras que los epítipos conformacionales generalmente se destruyen tras el tratamiento con agentes desnaturizantes. Un epítipo comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 u 8–10 aminoácidos en una conformación espacial única.

El rastreo de anticuerpos que se unen a un epítipo particular (es decir, aquellos que se unen al mismo epítipo) se puede hacer utilizando métodos de rutina en la técnica, tales como, por ejemplo, sin limitación, rastreo de alanina, transferencias de péptidos (véase Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443–463), análisis de escisión de péptidos, escisión de epítipos, extracción de epítipos, modificación química de antígenos (véase Prot. Sci. 9 (2000) 487–496) y bloqueo cruzado (véase "Antibodies", Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., Nueva York).

El perfil de anticuerpos basado en estructura de antígeno (ASAP), también conocido como perfil asistido por modificación (MAP), permite unir una multitud de anticuerpos

monoclonales que se unen específicamente a un antígeno basado en el perfil de unión de cada uno de los anticuerpos de la multitud a superficies de antígeno modificadas químicamente o enzimáticamente (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0101920). Los anticuerpos en cada contenedor se unen al mismo epítipo, que puede ser un epítipo único, ya sea claramente diferente o parcialmente superpuesto con el epítipo representado por otro contenedor.

También se puede utilizar la unión competitiva para determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo o compite por la unión con un anticuerpo de referencia. Por ejemplo, un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más, y por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más. También, por ejemplo, para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia, se permite que el anticuerpo de referencia se una al antígeno en condiciones de saturación. Después de eliminar el exceso del anticuerpo de referencia, se evalúa la capacidad de un anticuerpo en cuestión para unirse al antígeno. Si el anticuerpo en cuestión es capaz de unirse al antígeno después de la unión por saturación del anticuerpo de referencia, se puede concluir que el anticuerpo en cuestión se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia. Pero, si el anticuerpo en cuestión no puede unirse al antígeno después de la unión de saturación del anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo en cuestión puede unirse al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo de referencia. Para confirmar si el anticuerpo en cuestión se une al mismo epítipo o simplemente se ve obstaculizado por la unión por razones estéricas, se puede utilizar la experimentación de rutina (por ejemplo, análisis de mutación y unión de péptidos utilizando ELISA, RIA, resonancia de plasmones de superficie, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica). Este ensayo debe llevarse a cabo en dos configuraciones, es decir, siendo ambos anticuerpos el anticuerpo saturante. Si, en ambas configuraciones, solo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse al antígeno, entonces se puede concluir que el anticuerpo en cuestión y el anticuerpo de referencia compiten por la unión al antígeno.

En algunos aspectos, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo o a un epítipo superpuesto si un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50%, a al menos 75%, al menos 90% o incluso 99% o más,

medido en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 50 (1990) 1495–1502).

En algunos aspectos, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo también reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen "epítipos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reduce o elimina la unión del otro.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. En ciertos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₁. En ciertos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₁ con la mutación P329G, L234A y L235A para reducir la función efectora de la región Fc. En otros aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₂. En ciertos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₄ con la mutación S228P en la región bisagra para mejorar la estabilidad del anticuerpo IgG₄. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); Unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

Una "cantidad efectiva" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "Fab en tándem" se refiere a un anticuerpo que comprende dos fragmentos Fab conectados a través de un ligador/enlace peptídico. En algunas formas de realización, un Fab en tándem puede comprender un fragmento Fab y un fragmento Fab cruzado, conectado por un ligador/enlace peptídico.

El término "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En un aspecto, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células huésped pueden sufrir una escisión postraduccional de uno o más, particularmente uno o dos, aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa. Este puede ser el caso donde los dos aminoácidos C-terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice de EU). Por lo tanto, la lisina C-terminal (Lys447), o la glicina C-terminal (Gly446) y la lisina (Lys447), de la región Fc pueden o no estar presentes. En un aspecto, una cadena pesada que incluye una región Fc como se especifica en este documento, comprendida en un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprende un dipéptido de glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice de EU). En un aspecto, una cadena pesada que incluye una región Fc como se especifica en el presente documento, comprendida en un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprende un residuo de glicina C-terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice de EU). A menos que se especifique lo contrario en este documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también llamado índice de EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El FR de un dominio variable generalmente consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las

secuencias CDR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2- CDR-H2(CDR-L2)-FR3- CDR-H3(CDR-L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de las mismas sin tener en cuenta el número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula principal, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la rastreada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de inmunoglobulina humana VL o VH es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un aspecto, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En un aspecto, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de CDR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanos.

En ciertos aspectos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sufrido humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y que determinan la especificidad de unión a antígeno, por ejemplo, "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR").

En general, los anticuerpos comprenden seis CDR: tres en el (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), y tres en VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las CDR ejemplares en este documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987));

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24–34 (L1), 50–56 (L2), 89–97 (L3), 31–35b (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); y

(c) contactos de antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c–36 (L1), 46–55 (L2), 89–96 (L3), 30–35b (H1), 47–58 (H2) y 93–101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732–745 (1996)).

A menos que se indique lo contrario, las CDR se determinan de acuerdo con Kabat et al., *supra*. Un experto en la materia comprenderá que las designaciones de CDR también se pueden determinar de acuerdo con Chothia, *supra*, McCallum, *supra* o cualquier otro sistema de nomenclatura científicamente aceptado. En lugar de lo anterior, la secuencia de CDR-H1 como se describe en el presente documento puede extenderse desde Kabat26 a Kabat35, por ejemplo, para el dominio variable de unión a Pb-DOTAM.

En un aspecto, los residuos de CDR comprenden los identificados en las tablas de secuencia o en otra parte de la memoria descriptiva.

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR/CDR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., supra.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluye pero no se limita a un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos como los monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas) En ciertos aspectos, el individuo o sujeto es un ser humano.

Las moléculas como se describen en este documento pueden estar "aisladas". Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos, un anticuerpo se purifica a más del 95% o 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

El término "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye cualquier compuesto y/o sustancia que comprende un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto de una base, específicamente una base de purina o pirimidina (es decir, citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) o uracilo (U)), un azúcar (es decir, desoxirribosa o ribosa), y un grupo fosfato. A menudo, la molécula de ácido nucleico se describe mediante la secuencia de bases, por lo que dichas bases representan la estructura primaria (estructura lineal) de una molécula de ácido nucleico. La secuencia de bases se representa típicamente de 5' a 3'. En el presente documento, el término molécula de ácido nucleico abarca ácido desoxirribonucleico (ADN) que incluye, por ejemplo, ADN complementario (ADNc) y ADN genómico, ácido ribonucleico (ARN), en particular ARN mensajero (ARNm), formas sintéticas de ADN o ARN y polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular. Además, el término molécula de ácido nucleico incluye tanto hebras sentido como antisentido, así como formas monocatenarias y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede contener nucleótidos naturales o no

naturales. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen bases de nucleótidos modificadas con azúcares derivados o enlaces de estructura de fosfato o residuos químicamente modificados. Las moléculas de ácido nucleico también abarcan moléculas de ADN y ARN que son adecuadas como un vector para la expresión directa de un anticuerpo de la invención *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, en un huésped o paciente. Dichos vectores de ADN (por ejemplo, ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm) pueden no modificarse o modificarse. Por ejemplo, el ARNm puede modificarse químicamente para mejorar la estabilidad del vector de ARN y/o la expresión de la molécula codificada de modo que el ARNm pueda inyectarse en un sujeto para generar el anticuerpo *in vivo* (véase, por ejemplo, Stadler et al, Nature Medicine 2017, publicado en línea el 12 de junio de 2017, doi:10.1038/nm.4356 o EP 2 101 823 B1).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo (o fragmentos de los mismos), que incluyen dicha o dichas moléculas de ácido nucleico en un solo vector o vectores separados, y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones que ocurren naturalmente o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, tales variantes generalmente están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de

anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, que incluyen pero no se limitan al método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación de fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todo o parte de loci de inmunoglobulina humana, tales métodos y otros métodos ejemplares para hacer anticuerpos monoclonales que se describen en este documento.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una composición farmacéutica.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también llamado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios pesados constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio ligero variable o región variable de la cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL).

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia para los propósitos de la alineación. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están

dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente como software BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) o el paquete del programa FASTA. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Alternativamente, los valores de porcentaje de identidad se pueden generar utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE. UU., Washington DC, 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de los EE. UU. Y se describe en el documento WO 2001/007611.

A menos que se indique lo contrario, para los propósitos de este documento, los valores de identidad de secuencia de aminoácidos porcentuales se generan utilizando el programa ggsearch del paquete FASTA versión 36.3.8c o posterior con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete del programa FASTA fue escrito por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; y Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36 y está disponible públicamente en www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml o www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta. Alternativamente, se puede utilizar un servidor público accesible en fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, utilizando el programa ggsearch (proteína global: proteína) y las opciones predeterminadas (BLOSUM50; abierto: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar una alineación global, en lugar de local se llevan a cabo. El porcentaje de identidad de aminoácidos se proporciona en el encabezado de alineación de salida.

El término "composición farmacéutica" o "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto que se administraría la composición farmacéutica.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición o formulación farmacéutica, que no sea un ingrediente activo, que no sea

tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un buffer, excipiente, estabilizador o conservante.

Una referencia a un antígeno objetivo como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier antígeno objetivo nativo de cualquier fuente de vertebrados, incluidos mamíferos como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca el antígeno objetivo de "longitud completa", no procesado, así como cualquier forma de antígeno objetivo que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales del antígeno objetivo, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Por ejemplo, el antígeno objetivo CEA puede tener la secuencia de aminoácidos de CEA humano, en particular la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5 (CEACAM5), que se muestra en el número de acceso UniProt (www.uniprot.org) P06731 (versión 119), o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004354.2. Otro ejemplo de un antígeno objetivo es la proteína de activación de fibroblastos (FAP). La secuencia de aminoácidos de la FAP humana se muestra en el número de acceso UniProt (www.uniprot.org). Q12884 (versión 149), o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. Otro ejemplo de un antígeno objetivo es GPRC5D (véase UniProt no. Q9NZD1 (versión 115); NCBI RefSeq no. NP_061124.1 para la secuencia humana).

Los términos "anticuerpo dividido", "anticuerpos divididos", "anticuerpos divididos de un solo dominio" o "PRIT SPLIT", como se menciona en el presente documento, significan que el dominio VH y VL que juntos forman un sitio de unión a antígeno capaz de unirse al compuesto radiomarcado se dividen entre dos anticuerpos, y no están presentes como parte del mismo anticuerpo (antes del ensamblaje *in vivo*). "PRIT SPLIT dirigido por CEA" se refiere a un anticuerpo dividido dirigido a CEA. El término "SPLIT PRIT" también se puede usar indistintamente con el término "TA-dividido-DOTAM-VH/VL" (por ejemplo, donde "TA" o antígeno objetivo es CEA, FAP o GPRC5D). El término "PRIT SPLIT dirigido por CEA" se puede utilizar indistintamente con el término "CEA-dividido-DOTAM-VH/VL".

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural de una enfermedad en el individuo que se está tratando, y puede realizarse para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recurrencia

de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos aspectos, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retrasar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para rastrear una genoteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880–887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624–628 (1991).

El término "vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unida. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión".

Los términos "Pb" o "plomo" como se utilizan en el presente documento incluyen iones de los mismos, por ejemplo, Pb (II). Las referencias a otros metales también incluyen iones de los mismos. Por lo tanto, el lector experto entiende que, por ejemplo, los términos plomo, Pb, ²¹²Pb o ²⁰³Pb están destinados a abarcar formas iónicas del elemento, en particular, Pb (II).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en un conjunto de anticuerpos que comprenden un primer y un segundo anticuerpo, en donde cada anticuerpo puede unirse a un antígeno en una célula objetivo, pero en donde un sitio de unión a antígeno funcional para un agente efector se forma solo cuando el primer y el segundo anticuerpo están asociados entre sí. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para métodos de inmunoterapia pre-dirigida y/o para formación de imágenes pre-dirigida. En aspectos preferidos, los métodos eliminan una etapa de administrar un agente de eliminación o agente de bloqueo.

A. Antígenos objetivo

El antígeno expresado en la superficie de la célula objetivo también se denomina en el presente documento el "antígeno objetivo".

En la medida en que la invención se refiere a métodos de tratamiento y a productos para su uso, es aplicable a cualquier afección que sea tratable por actividad citotóxica dirigida a las células del paciente, por ejemplo, células enfermas. Por lo tanto, la célula objetivo es cualquier célula contra la cual se desea dirigir la citotoxicidad, por ejemplo, cualquier célula enferma. El tratamiento es de modo preferente de un tumor o cáncer. Sin embargo, la aplicabilidad de la invención no se limita a tumores y cánceres. Por ejemplo, el tratamiento también puede ser de una infección viral (al dirigirse a las células infectadas) o una enfermedad autoinmune dirigida por células T (al dirigirse a las células T). Las inmunotoxinas dirigidas contra antígenos virales expresados en la superficie de las células infectadas se han investigado para detectar una variedad de infecciones virales tales como el VIH, la rabia y EBV. Cai and Berger 2011 Antiviral Research 90(3):143–50 utilizaron una inmunotoxina que contiene PE38 para la destrucción dirigida de células infectadas con el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi. Además, Resimmune® (A–dmDT390–bisFv (UCHT1)) mata selectivamente las células T malignas humanas y agota transitoriamente las células T normales y se considera que tiene potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunes conducidas por las células T, como la esclerosis múltiple y la enfermedad injerto contra huésped, así como cánceres de sangre de células T para los que se está sometiendo a ensayos clínicos. Del mismo modo, los métodos de la invención pueden ser aplicables a cualquier tipo de célula para la cual sea deseable la radioimagen, que incluye, pero no se limita a células cancerosas o tumorales.

Por lo tanto, los antígenos objetivo adecuados pueden incluir antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos.

Los antígenos suelen ser antígenos normales de la superficie celular que se sobreexpresan o se expresan en momentos anormales. Idealmente, el antígeno objetivo se expresa solo en células enfermas (como las células tumorales), sin embargo, esto rara vez se observa en la práctica. Como resultado, los antígenos objetivo generalmente se seleccionan en función de la expresión diferencial entre tejido enfermo y sano.

El marcador de la superficie celular o el antígeno objetivo puede ser, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor.

El término "antígeno asociado a tumor" o "antígeno específico de tumor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, péptido, lípido, carbohidrato, etc.) única o predominantemente expresada o sobreexpresada por células tumorales y/o células cancerosas, o por otras células del estroma del tumor, como los fibroblastos asociados al cáncer, de modo que el antígeno se asocie con el tumor o tumores y/o cáncer. El antígeno asociado al tumor puede expresarse adicionalmente por células normales, no tumorales o no cancerosas. Sin embargo, en tales casos, la expresión del antígeno asociado al tumor por células normales, no tumorales o no cancerosas no es tan robusta como la expresión de las células tumorales o cancerosas. A este respecto, las células tumorales o cancerosas pueden sobreexpresar el antígeno o expresar el antígeno a un nivel significativamente más alto, en comparación con la expresión del antígeno por células normales, no tumorales o no cancerosas. Además, el antígeno asociado al tumor puede expresarse adicionalmente por células de un estado diferente de desarrollo o maduración. Por ejemplo, el antígeno asociado al tumor puede expresarse adicionalmente por células de la etapa embrionaria o fetal, células que normalmente no se encuentran en un huésped adulto. Alternativamente, el antígeno asociado al tumor puede expresarse adicionalmente por células madre o células precursoras, células que normalmente no se encuentran en un huésped adulto.

El antígeno asociado a tumor puede ser un antígeno expresado por cualquier célula de cualquier cáncer o tumor, incluidos los cánceres y tumores descritos en este documento. El antígeno asociado a tumor puede ser un antígeno asociado a tumor de un solo tipo de cáncer o tumor, de modo que el antígeno asociado a tumor esté asociado o sea característico de un solo tipo de cáncer o tumor. Alternativamente, el antígeno asociado a tumor puede ser un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, puede ser característico) de

más de un tipo de cáncer o tumor. Por ejemplo, el antígeno asociado al tumor puede ser expresado por células de cáncer de mama y de próstata y no expresado en absoluto por células normales, no tumorales o no cancerosas.

Los ejemplos de antígenos asociados a tumores a los que se pueden unir los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, mucina 1 (MUC1; mucina epitelial asociada a tumor), antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PSCA, EpCAM, Trop2 (trofoblasto-2, también conocido como EGP-1), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSFR), CD56, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu) (también conocido como erbB-2), CDS, CD7, proteína relacionada con la tirosinasa (TRP) I y TRP2. En otra forma de realización, el antígeno tumoral puede seleccionarse del grupo que consiste en un grupo de diferenciación (CD) 19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33 (lectina 3 similar a Ig que se une al ácido siálico, antígeno de superficie celular mielóide), CD79b, CD123 (receptor alfa de interleucina 3), receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina, Lewis Y, Glypican-3, FAP (proteína de activación de fibroblastos alfa), GPRC5D (Receptor acoplado a proteína G Clase C Grupo 5 Miembro D), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), CA9 = CAIX (anhidrasa carbónica IX), L1 CAM (molécula de adhesión de células neurales L 1), endosialina, HER3 (conformación activada del miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico 3), complejo Alkl/BMP9 (anaplásico linfoma quinasa 1/proteína morfogenética ósea 9), TPBG = 5T4 (glucoproteína trofoblasto), ROR1 (antígeno de superficie similar al receptor de tirosina quinasa), HER1 (conformación activada del receptor del factor de crecimiento epidérmico) y CLL1 (familia de dominios de lectina tipo C 12, miembro A). La mesotelina se expresa en, por ejemplo, cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino y cáncer de páncreas. CD22 se expresa en, por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño (SLL) y leucemia linfática aguda (ALL). CD25 se expresa en, por ejemplo, leucemias y linfomas, incluida la leucemia de células pilosas y el linfoma de Hodgkin. El antígeno Lewis Y se expresa en, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas. CD33 se expresa en, por ejemplo,

leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielomonocítica crónica (CML) y trastornos mieloproliferativos.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra el receptor de transferrina (por ejemplo, HB21 y sus variantes), anticuerpos contra CD22 (por ejemplo, RFB4 y sus variantes), anticuerpos contra CD25 (por ejemplo, anti-Tac y sus variantes), anticuerpos contra la mesotelina (por ejemplo, SS 1, MORAb-009, SS, HN1, HN2, MN, MB y sus variantes) y anticuerpos contra el antígeno Lewis Y (por ejemplo, B3 y sus variantes). A este respecto, el resto de direccionamiento (agente de unión a células) puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en B3, RFB4, SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, HB21 y MORAb-009, y sus porciones de unión a antígeno. Ejemplos adicionales de restos de direccionamiento adecuados para su uso en las moléculas quiméricas de la invención se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses 5.242.824 (receptor anti-transferrina); 5.846.535 (anti-CD25); 5.889.157 (anti-Lewis Y); 5.981.726 (anti-Lewis Y); 5.990.296 (anti-Lewis Y); 7.081.518 (antimesotelina); 7.355.012 (anti-CD22 y anti-CD25); 7.368.110 (antimesotelina); 7.470.775 (anti-CD30); 7.521.054 (anti-CD25); y 7.541.034 (anti-CD22); Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2007/0189962 (anti-CD22); Frankel et al., Clin. Cancer Res., 6: 326-334 (2000), y Kreitman et al., AAPS Journal, 8(3): E532-E551 (2006), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

Se han generado anticuerpos adicionales contra antígenos específicos relacionados con tumores específicos que incluyen: Cripto, CD30, CD19, CD33, Glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD22 (Siglec2), CD33 (Siglec3), CD79, CD138, PSCA, PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), BCMA, CD20, CD70, E-selectina, EphB2, Melanotransferina, Muc16 y TMEFF2. Cualquiera de estos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede ser útil en la presente invención, es decir, puede incorporarse en los anticuerpos descritos en este documento.

En algunas formas de realización de la presente invención, puede preferirse que el antígeno asociado a tumor sea antígeno carcinoembrionario (CEA).

El CEA es ventajoso en el contexto de la presente invención porque se internaliza con relativa lentitud y, por lo tanto, un alto porcentaje del anticuerpo permanecerá disponible en la superficie de la célula después del tratamiento inicial, para unirse al radionúclido. También se pueden preferir otros objetivos de baja internalización/antígenos

asociados a tumores. Otros ejemplos de antígeno asociado a tumor incluyen CD20 o HER2. En incluso formas de realización adicionales, el objetivo puede ser EGP-1 (glicoproteína epitelial-1, también conocida como trofoblasto-2), antígeno específico de colon-p (CSAp) o una mucina pancreática MUC1. Véase por ejemplo Goldenberg et al 2012 (Theranostics 2 (5)), que se incorpora en el presente documento como referencia. Esta referencia también describe anticuerpos como la unión de Mu-9 a CSAp (véase también Sharkey et al Cancer Res. 2003; 63: 354-63), la unión de hPAM4 a MUC1 (véase también Gold et al Cancer Res. 2008; 68: 4819-26), la unión de valtuzumab a CD20 (véase también Sharkey et al Cancer Res. 2008; 68: 5282-90) y hRS7 que se une a EGP-1 (véase también Cubas et al Biochim Biophys Acta 2009; 1796: 309-14). Cualquiera de estos o porciones de unión a antígeno de los mismos puede ser útil en la presente invención, es decir, puede incorporarse en los anticuerpos descritos en el presente documento. Un ejemplo de un anticuerpo que se ha producido contra CEA es T84.66 (como se muestra en NCBI Acc. No: CAA36980 para la cadena pesada y CAA36979 para la cadena ligera, o como se muestra en la SEC. ID. NO 317 y 318 del documento WO2016/075278) y sus versiones humanizadas y quiméricas, tales como T84.66-LCHA como se describe en WO2016/075278 A1 y/o WO2017/055389. Otro ejemplo es CH1A1a, un anticuerpo anti-CEA como se describe en WO2012/117002 y WO2014/131712, y CEA hMN-14 (véase también US 6 676 924 y US 5 874 540). Otro anticuerpo anti-CEA es A5B7 como se describe en M.J. Banfield et al, Proteins 1997, 29 (2), 161-171. Los anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo murino A5B7 se han descrito en los documentos WO 92/01059 y WO 2007/071422. Véase también la solicitud co-pendiente PCT/EP2020/067582. Un ejemplo de una versión humanizada de A5B7 es A5H1EL1 (G54A). Un anticuerpo ejemplar adicional contra CEA es MFE23 y sus versiones humanizadas descritas en el documento US7626011 y/o la solicitud co-pendiente PCT/EP2020/067582. Incluso otro ejemplo de un anticuerpo contra CEA es 28A9. Cualquiera de estos o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser útil para formar un resto de unión a CEA en la presente invención.

La FAP (proteína alfa de activación de fibroblastos) o GPRC5D (Receptor acoplado a la proteína G Clase C Grupo 5 Miembro D) también pueden preferirse en algunas formas de realización. La FAP es un objetivo establecido para las imágenes y la terapia, debido a su amplia expresión en el microambiente de varios tipos de tumores, por ejemplo cáncer de páncreas, mama y pulmón (Lindner, T., Loktev, A., Giesel, F. et al.

Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. EJNMMI radiopharm. chem. 4, 16 (2019)). SPLIT PRIT utilizando anticuerpos FAP-dividido-DOTAM-VH/VL, por lo tanto, generaría una acumulación específica de ^{212}Pb -DOTAM en fibroblastos activados asociados al cáncer. En consecuencia, se esperaría que la radiación alfa emitida afecte negativamente la supresión inmune de los tumores malignos que expresan FAP, además de un efecto limitado directo de destrucción del tumor en las células tumorales adyacentes. El miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a proteína G (GPC5D) se sobreexpresa en células de plasma de mieloma múltiple (Atamaniuk J, Gleiss A, Porpaczy E, Kainz B, Grunt TW, Raderer M, et al. Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. Eur J Clin Invest. 2012;42:953–60.), con modelos SC (subcutáneos) *in vivo* establecidos que reflejan la expresión encontrada en pacientes con mieloma múltiple, por ejemplo OPM-2 y NCI-H929 (Kodama T, Kochi Y, Nakai W, Mizuno H, Baba T, Habu K, et al. Anti-GPRC5D/CD3 bispecific T-cell-redirecting antibody for the treatment of multiple myeloma. Mol Cancer Ther. (2019) 18:1555–64). Por lo tanto, se espera que SPLIT PRIT utilice los anticuerpos GPRC5D-dividido-DOTAM-VH/VL para generar una acumulación específica de tumor de ^{212}Pb -DOTAM seguida de muerte celular inducida por radiación.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden unirse específicamente al antígeno objetivo (por ejemplo, cualquiera de los antígenos objetivo tratados en el presente documento). En algunas formas de realización, pueden unirse con una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-7} M o menos, por ejemplo, de 10^{-7} a 10^{-13} , 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo antígeno objetivo, que puede denominarse "antígeno A" (es decir, tienen especificidad de unión para el mismo antígeno objetivo). Cada uno puede tener especificidad de unión para el mismo epítipo en el antígeno A. Alternativamente, el primer anticuerpo puede unirse a un primer epítipo en el antígeno A y el segundo anticuerpo puede unirse a un segundo epítipo diferente en el antígeno A. Por ejemplo, en una forma de realización, uno de los anticuerpos puede unirse al epítipo T84.66 de CEA y el otro puede unirse al epítipo A5B7 de CEA.

En algunas formas de realización, uno o ambos del primer y/o segundo anticuerpo pueden ser biparatópicos para el antígeno A, es decir, cada uno de los anticuerpos

individuales puede unirse a dos epítomos diferentes del antígeno A. El primer anticuerpo puede comprender un primer y un segundo sitio de unión, que se une a un primer y un segundo epítomos de antígeno A, respectivamente, en donde el primer y el segundo epítomos son diferentes entre sí. Alternativa o adicionalmente, el segundo anticuerpo puede comprender un primer y un segundo sitio de unión, que se unen a un primer y un segundo epítomos del antígeno A, en donde el primer y el segundo epítomos son diferentes entre sí. En algunas formas de realización, uno o ambos epítomos unidos por el primer anticuerpo pueden ser diferentes de uno o ambos epítomos unidos por el segundo anticuerpo. En otras formas de realización, los dos epítomos unidos por el primer anticuerpo pueden ser los mismos que los dos epítomos unidos por el segundo anticuerpo.

B. Compuestos radiomarcados

De acuerdo con la presente invención, la asociación del primer y segundo anticuerpo forma un sitio de unión funcional para una molécula efectora. Las moléculas efectoras de acuerdo con la presente invención son compuestos radiomarcados que comprenden un radioisótopo, por ejemplo, son un hapteno radiomarcado.

En algunas formas de realización, la molécula efectora puede comprender un radioisótopo quelado.

En algunas formas de realización, el sitio de unión funcional para la molécula efectora puede unirse a un quelato que comprende el quelante y el radioisótopo. En otras formas de realización, el anticuerpo puede unirse a un resto que se conjuga con el radioisótopo quelado, por ejemplo, histamina-succinil-glicina (HSG), digoxigenina, biotina o cafeína.

El quelante puede ser, por ejemplo, una molécula multidentada tal como un ácido aminopolicarboxílico o un ácido aminopolitiocarboxílico, o una sal o su variante funcional. El quelante puede ser, por ejemplo, bidentado o tridentado o tetradentado. Los ejemplos de quelantes metálicos adecuados incluyen moléculas que comprenden EDTA (ácido etilendiaminotetraacético o una forma de sal como CaNa_2EDTA), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), NOTA (ácido 2,2',2''-(1,4,7-triazanonano-1,4,7-triil)triacético), IDA (ácido imminodiacético), MIDA (ácido (metilimino)diacético), TTHA (ácido 3,6,9,12-tetrakis (carboximetil)-3,6,9,12-tetraazatetradecanodioico), TETA (Ácido 2,2',2'',2'''-(1,4, 8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetrail)tetraacético), DOTAM (1,4,7,10-Tetrakis

(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano), HEHA (Ácido 1,4,7,10,13,16-hexaazaciclohexadecano-1,4,7,10,13,16-hexaacético, disponible de Macrocyclics, Inc., Plano, Texas), NTA (ácido nitrilotriacético) EDDHA (etilendiamina-N,N'-bis (ácido 2-hidroxifenilacético), BAL (2,3-dimercaptopropanol), DMSA (ácido 2,3-dimercaptosuccínico), DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico), D-penicilamina (B-dimetilcisteína), MAG₃ (mercaptoacetiltriglicina), Hynic (ácido 6-hidrazinopridina-3-carboxílico), p-isotiocianatobencil-desferrioxamina (por ejemplo, marcado con zirconio para la formación de imágenes) y sales o variantes funcionales/derivados de los mismos capaces de quelar el metal. En algunas formas de realización, puede preferirse que el quelante sea DOTA o DOTAM o una sal o variante/derivado funcional del mismo capaz de quelar el metal. Por lo tanto, el quelante puede ser o puede comprender DOTA o DOTAM con un radioisótopo quelado al mismo.

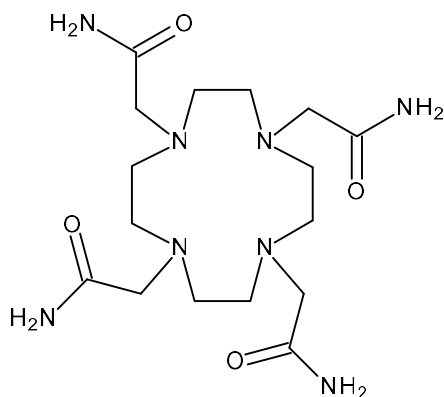
La molécula efectora puede comprender o consistir en variantes funcionales o derivados de los quelantes anteriores, junto con el radionúclido. Las variantes/derivados adecuados tienen una estructura que difiere en un cierto grado limitado y retiene la capacidad de funcionar como un quelante (es decir, retiene suficiente actividad para ser utilizada para uno o más de los propósitos descritos en el presente documento). Las variantes/derivados funcionales también pueden incluir un quelante como se describe anteriormente conjugado con uno o más restos o sustituyentes adicionales, que incluyen una molécula pequeña, un polipéptido o un carbohidrato. Esta unión puede ocurrir a través de uno de los carbonos constituyentes, por ejemplo, en una porción de la estructura del quelante. Un sustituyente adecuado puede ser, por ejemplo, un grupo de hidrocarburo tal como alquilo, alqueno, arilo o alquino; un grupo hidroxilo; un grupo de alcohol; un átomo de halógeno; un grupo nitrilo; un grupo ciano; un grupo sulfonilo; un grupo tiol; un grupo amina; un grupo oxo; un grupo carboxilo; un grupo tiocarboxilo; un grupo carbonilo; un grupo amida; un grupo éster; o un heterociclo que incluye grupos heteroarilo. El sustituyente puede ser, por ejemplo, uno de los definidos para el grupo "R¹" a continuación. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, un tinte (como Alexa 647 o Alexa 488), biotina o un resto de biotina, o un resto fenilo o bencilo. Un polipéptido puede ser, por ejemplo, un oligopéptido, por ejemplo, un oligopéptido de dos o tres aminoácidos. Los carbohidratos ejemplares incluyen dextrano, polímeros o copolímeros lineales o ramificados (por ejemplo, polialqueno, poli(etileno-lisina), polimetacrilato, poliaminoácidos, poli u oligosacáridos, dendrímeros). Los derivados también pueden

incluir multímeros de los compuestos quelantes en los que los compuestos como se exponen anteriormente están unidos a través de un resto ligador. Los derivados también pueden incluir fragmentos funcionales de los compuestos anteriores, que retienen la capacidad de quelar el ion metálico.

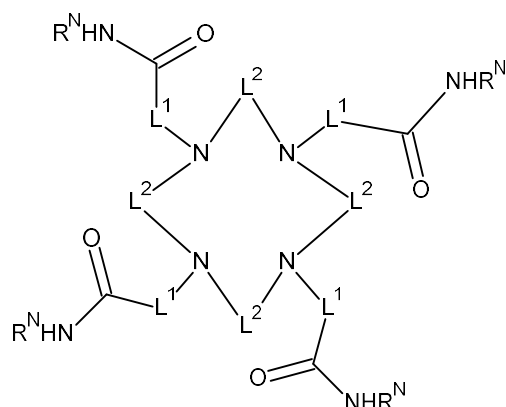
Los ejemplos particulares de derivados incluyen bencil-EDTA e hidroxietil-tiourido-bencil EDTA, DOTA-benceno (por ejemplo, (ácido tetraacético de S-2- (4-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano), DOTA-biotina, y DOTA-TyrLys-DOTA.

En algunas formas de realización de la presente invención, el sitio de unión funcional formado por asociación del primer y segundo anticuerpo se une a un quelato metálico que comprende DOTAM y un metal, por ejemplo, plomo (Pb). Como se mencionó anteriormente, "DOTAM" tiene el nombre químico:

1,4,7,10-Tetrakis(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano,
que es un compuesto de la siguiente fórmula:



La presente invención puede en ciertos aspectos y formas de realización también hacer uso de variantes funcionales o derivados de DOTAM que incorporan un ión metálico. Las variantes/derivados de DOTAM adecuados tienen una estructura que difiere en cierta medida de la estructura de DOTAM y conservan la capacidad de función (es decir, conserva suficiente actividad para ser utilizada para uno o más de los propósitos descritos en este documento). En tales aspectos y formas de realización, el DOTAM o variante funcional/derivado de DOTAM puede ser una de las variantes activas descritas en el documento WO 2010/099536. Las variantes funcionales/derivados adecuados pueden ser un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; donde

R^N es H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} - alquilo C_{1-4} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} y heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} ; en donde alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^w seleccionados independientemente; y en donde dicho cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} -alquilo C_{1-4} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} y heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^x seleccionados independientemente;

L^1 es independientemente alquilenilo C_{1-6} , alquenilenilo C_{1-6} o alquinilenilo C_{1-6} , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos R^1 seleccionados independientemente;

L^2 es alquilenilo de cadena lineal C_{2-4} , que está opcionalmente sustituido con un grupo R^1 seleccionado independientemente; y que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos seleccionados independientemente de alquilo C_{1-4} y/o haloalquilo C_{1-4} ;

R^1 se selecciona independientemente entre D^1 - D^2 - D^3 , halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , haloalcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} , alquilsulfinilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , amino, alquilamino C_{1-6} , di-alquilamino C_{1-6} , alquilcarbonilo C_{1-4} , carboxi, alcocarbonilo C_{1-6} , alquilcarbonilamino C_{1-6} , di-alquilcarbonilamino C_{1-6} , alcocarbonilamino C_{1-6} , alcocarbonilo C_{1-6} (alquil C_{1-6}) amino, carbamilo, alquilcarbamilo C_{1-6} y di-alquilcarbamilo C_{1-6} ;

cada D^1 se selecciona independientemente de arilo C_{6-10} -alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-9} -alquilo C_{1-4} , cicloalquil C_{3-10} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquil C_{2-9} -alquilo C_{1-4} , alquileno C_{1-8} , alquenileno C_{1-8} , y alquinileno C_{1-8} ; en donde dicho alquileno C_{1-8} , alquenileno C_{1-8} y alquinileno C_{1-8} están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^4 seleccionados independientemente; y en donde dicho arilo C_{6-10} -alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-9} -alquilo C_{1-4} , cicloalquil C_{3-10} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquil C_{2-9} -alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^5 seleccionados independientemente;

cada D^2 está independientemente ausente o es un alquileno de cadena lineal C_{1-20} , en donde de 1 a 6 grupos metileno no adyacentes de dicho alquileno de cadena lineal C_{1-20} se reemplazan cada uno opcionalmente por un resto $-D^4-$ seleccionado independientemente, siempre que al menos una unidad de metileno en dicho alquileno de cadena lineal C_{1-20} no se reemplaza opcionalmente por un resto $-D^4-$; en donde dicho alquileno de cadena lineal C_{1-20} está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , di-alquilamino C_{1-4} , alquilcarbonilo C_{1-4} , carboxi, alcoxicarbonilo C_{1-4} , alquilcarbonilamino C_{1-4} , di-alquilcarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilo C_{1-4} (alquil C_{1-4})amino, carbamilo, alquilcarbamilo C_{1-4} y di-alquilcarbamilo C_{1-4} ;

cada D^3 se selecciona independientemente de H, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-14} , cicloalquilo C_{3-14} alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-14} , heterocicloalquilo C_{2-14} -alquilo C_{1-4} , arilo C_{6-14} , arilo C_{6-14} -alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-13} , heteroarilo C_{1-13} -alquilo C_{1-4} ; en donde dicho alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^6 seleccionados independientemente; y en donde dicho cicloalquilo C_{3-14} , cicloalquilo C_{3-14} alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-14} , heterocicloalquilo C_{2-14} alquilo C_{1-4} , arilo C_{6-14} , arilo C_{6-14} alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-13} , heteroarilo C_{1-13} , alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos R^7 seleccionados independientemente;

cada D^4 se selecciona independientemente de $-O-$, $-S-$, $-NR^aC(=O)-$, $-NR^aC(=S)-$, $-NR^bC(=O)NR^c-$, $-NR^bC(=S)NR^c-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-S(=O)NR^a-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR^a-$, $-OC(=S)NR^a-$, $-NR^a-$, $-NR^bS(=O)NR^c-$, y $NR^bS(=O)_2NR^O-$;

cada R^4 y R^6 se seleccionan independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilsulfinilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , di-alquilamino C_{1-4} , alquilcarbonilo C_{1-4} , carboxi, alcoxicarbonilo C_{1-4} , alquilcarbonilamino C_{1-4} , di-alquilcarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilo C_{1-4} -(alquil C_{1-4})amino, carbamilo, alquilcarbamilo C_{1-4} , y di-alquilcarbamilo C_{1-4} ;

cada R^5 se selecciona independientemente de halógeno, ciano, cianato, isotiocianato, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{2-4} , alquinilo C_{2-4} , alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilsulfinilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , di-alquilamino C_{1-4} , alquilcarbonilo C_{1-4} , carboxi, alcoxicarbonilo C_{1-4} , alquilcarbonilamino C_{1-4} , di-alquilcarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilamino C_{1-4} , alcoxicarbonilo C_{1-4} -(alquilo C_{1-4})amino, carbamilo, alquilcarbamilo C_{1-4} , y di-alquilcarbamilo C_{1-4} ;

cada R^7 se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} -alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} , $-OR^O$, $-SR^O$, $-S(=O)R^P$, $-S(=O)_2R^P$, $-S(=O)NR^SR^t$, $-C(=O)R^P$, $-C(=O)OR^P$, $-C(=O)NR^SR^t$, $-OC(=O)R^P$, $-OC(=O)NR^SR^t$, $-NR^SR^t$, $-NR^qC(=O)R^r$, $-NR^qC(=O)OR^r$, $-NR^qC(=O)NR^r$, $-NR^qS(=O)_2R^r$, y $-NR^PS(=O)_2NR^SR^t$; en donde dichos alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R' seleccionados independientemente; y en donde dichos cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} -alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R'' seleccionados independientemente;

cada R^a , R^b , y R^c se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} -alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} ; en donde dichos alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R^w seleccionados independientemente; y en donde dichos cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} -alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} -alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} -alquilo C_{1-4} están

cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R^x seleccionados independientemente;

cada R^o , R^p , R^q , R^r , R^s y R^t se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} – alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} – alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo – alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} – alquilo C_{1-4} ; en donde dichos alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R^y seleccionados independientemente; y en donde dichos cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquilo C_{3-7} – alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-7} , heterocicloalquilo C_{2-7} – alquilo C_{1-4} , fenilo, fenilo – alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-7} , heteroarilo C_{1-7} – alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos por 1, 2, 3, o 4 grupos R^z seleccionados independientemente;

cada R' , R^w y R^y se seleccionan independientemente de hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , y di – alquilamino C_{1-4} ; y

cada R'' , R^x , y R^z se seleccionan independientemente de hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , y di – alquilamino C_{1-4} ;

siempre que no se exceda la valencia de cada átomo en los restos opcionalmente sustituidos.

Adecuadamente, las variantes funcionales/derivados de la fórmula anterior tienen una afinidad por un anticuerpo de la presente invención que es comparable o mayor que la de DOTAM, y tienen una fuerza de unión para Pb que es comparable o mayor que la de DOTAM (siendo la "afinidad" medida por la constante de disociación, como se describió anteriormente). Por ejemplo, la constante de disociación del derivado funcional/variante con el anticuerpo de la presente invención o/Pb puede ser 1,1 veces o menos, 1,2 veces o menos, 1,3 veces o menos, 1,4 veces o menos, 1,5 veces o menos, o 2 veces o menos que la constante de disociación de DOTAM con el mismo anticuerpo/Pb.

Cada R^N puede ser H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} ; de modo preferente H, alquilo C_{1-4} , o haloalquilo C_{1-4} . De modo más preferente, cada R^N es H.

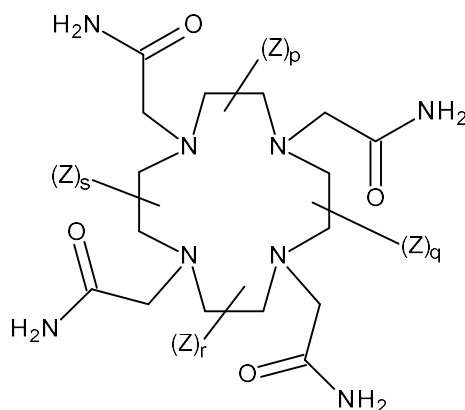
Para las variantes de DOTAM, se prefiere que 1, 2, 3 o más de modo preferente cada L^2 sea alquilenos C_2 . Ventajosamente, las variantes de alquilenos C_2 de DOTAM pueden tener una afinidad particularmente alta por Pb. Los sustituyentes opcionales para

L^2 pueden ser R^1 , alquilo C_{1-4} o haloalquilo C_{1-4} . Adecuadamente, los sustituyentes opcionales para L^2 pueden ser alquilo C_{1-4} o haloalquilo C_{1-4} .

Opcionalmente, cada L^2 puede ser alquileno C_2 no sustituido $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

Cada L^1 es de modo preferente alquileno C_{1-4} , de modo más preferente alquileno C_1 tal como $-\text{CH}_2-$.

La variante funcional/derivado de DOTAM puede ser un compuesto de la siguiente fórmula:



en donde cada Z es independientemente R^1 como se definió anteriormente; p , q , r , y s son 0, 1 o 2; y $p + q + r + s$ es 1 o mayor. De modo preferente, p , q , r , y s son 0 o 1 y/o $p + q + r + s$ es 1. Por ejemplo, el compuesto puede tener $p + q + r + s = 1$, donde Z es resto p -SCN-bencilo – dicho compuesto está disponible comercialmente de Macrocyclics, Inc. (Plano, Texas).

Los radionúclidos útiles en la invención pueden incluir radioisótopos de metales, tales como plomo (Pb), lutecio (Lu) o itrio (Y).

Los radionucleidos particularmente útiles en aplicaciones de imágenes pueden ser radionucleidos que son emisores de rayos gamma. Por ejemplo, pueden seleccionarse de ^{203}Pb o ^{205}Bi .

Los radionucleidos particularmente útiles en aplicaciones terapéuticas son radionucleidos que son emisores alfa o beta. Por ejemplo, pueden seleccionarse de ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{225}Ac , ^{211}At , ^{227}Th , ^{223}Ra .

En algunas formas de realización, se puede preferir que DOTAM (o sales o variantes funcionales del mismo) se quelen con Pb o Bi tal como uno de los radioisótopos de Pb o Bi enumerados anteriormente. En otras formas de realización, se puede preferir

que DOTA (o sales o variantes funcionales de los mismos) se quelan con Lu o Y tal como uno de los radioisótopos de Lu o Y enumerados anteriormente.

En algunas formas de realización, los métodos y usos pueden comprender métodos combinados de terapia e imagen, que hacen uso de una mezcla de radioisótopos, por ejemplo, un radioisótopo adecuado para terapia y un radioisótopo adecuado para formación de imágenes. Por ejemplo, estos pueden ser diferentes radioisótopos del mismo metal, quelados por el mismo quelante. En una forma de realización, el método puede comprender administrar ^{203}Pb -DOTAM y ^{212}Pb -DOTAM como una mezcla. En otra forma de realización, el método puede comprender un primer ciclo de dosimetría utilizando un emisor de gamma tal como ^{203}Pb o ^{205}Bi seguido de una o más rondas de tratamiento utilizando un emisor de alfa o beta tal como ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{225}Ac , ^{211}At , ^{227}Th , o ^{223}Ra . Dichos métodos se describen a continuación.

En algunas formas de realización, el sitio de unión funcional formado por asociación del primer y el segundo anticuerpo puede unirse a un quelato Pb-DOTAM.

En algunas formas de realización, el sitio de unión funcional formado por asociación del primer y el segundo anticuerpo puede unirse específicamente al compuesto radiomarcado. En algunas formas de realización, puede unirse al compuesto radiomarcado, como el quelato Pb-DOTAM, con una constante de disociación (K_d) a Pb-DOTAM y/o el objetivo de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo 10^{-7}M o menos, por ejemplo de 10^{-7} a 10^{-13} , 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas formas de realización, puede preferirse que se una con un valor K_d de la afinidad de unión de 100 pM , 50 pM , 20 pM , 10 pM , 5 pM , 1 pM o menos, por ejemplo, $0,9\text{ pM}$ o menos, $0,8\text{ pM}$ o menos, $0,7\text{ pM}$ o menos, $0,6\text{ pM}$ o menos o $0,5\text{ pM}$ o menos. Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unir el quelato metálico con una K_d de aproximadamente 1 pM – 1 nM , por ejemplo, aproximadamente 1 – 10 pM , 1 – 100 pM , 5 – 50 pM , 100 – 500 pM o 500 pM – 1 nM .

C. Ejemplos de sitios de unión a antígeno para DOTA

En una forma de realización particular de la invención, el primer y el segundo anticuerpo se asocian para formar un sitio de unión funcional para DOTA (o un derivado funcional o variante del mismo), por ejemplo, DOTA quelado con Lu o Y (por ejemplo, ^{177}Lu o ^{90}Y). Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unir el compuesto

radiomarcado con una K_d de aproximadamente 1pM–1nM, por ejemplo, aproximadamente 1–10 pM, 1–100pM, 5–50 pM, 100–500 pM o 500pM–1 nM.

C825 es un scFv conocido con alta afinidad por DOTA–Bn (ácido S–2– (4–aminobencil)–1,4,7,10–tetraazaciclododecano tetraacético) complejoado con radiometales como ^{177}Lu y ^{90}Y (véase por ejemplo Cheal et al. 2018, Theranostics 2018 y WO2010099536, incorporados en el presente documento como referencia). Las secuencias CDR y las secuencias VL y VH de C825 se proporcionan en este documento. En una forma de realización, la región variable de la cadena pesada que forma parte del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado puede comprender al menos una, dos o las tres CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de 35; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de 36; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de 37. En una forma de realización alternativa, CDR–H1 puede tener la secuencia GFSLTGYGVH (SEC. ID. NO.: 148). La región variable de la cadena ligera que forma parte del sitio de unión para el compuesto radiomarcado puede comprender al menos una, dos o las tres CDR seleccionadas de (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de 38; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de 39; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de 40.

En otra forma de realización, el dominio variable de la cadena pesada que forma parte del sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado (en el primer anticuerpo) comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 41, o una variante del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEC. ID. NO: 41. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión que comprende esa secuencia conserva la capacidad para unirse a DOTA complejoado con Lu o Y, de modo preferente con una afinidad como se describe en el presente documento. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 41. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 41, incluidas las modificaciones postraduccionales de

esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 35 o la secuencia GFSLTGYGVH (SEC. ID. NO.: 148), (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 36, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 37.

Opcionalmente, el dominio variable de la cadena ligera que forma parte del sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado (en el segundo anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 42 o una variante del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEC. ID. NO: 42. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a DOTA complejoado con Lu o Y, de modo prefernte con una afinidad como se describe en el presente documento. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 42. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 42, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 38; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 39; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 40.

Las formas de realización relacionadas con la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera se contemplan explícitamente en combinación. Por lo tanto, el sitio de unión al antígeno funcional se puede formar a partir de una región variable de la cadena pesada como se definió anteriormente y una región variable de la cadena ligera como se definió anteriormente, en el primer y segundo anticuerpo respectivamente.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, las regiones variables de cadena ligera y pesada que forman el sitio de unión para el complejo DOTA pueden humanizarse. En una forma de realización, la región variable de la cadena ligera y pesada

comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada puede extenderse por uno o más residuos C-terminales tales como uno o más residuos de alanina C-terminales, o uno o más residuos del extremo N del dominio CH1, como se describe más adelante.

D. Ejemplos de sitios de unión a antígeno para DOTAM

En otra forma de realización particular de la invención, el primer y el segundo anticuerpo se asocian para formar un sitio de unión a antígeno funcional para un quelato Pb-DOTAM (Pb-DOTAM).

En ciertas formas de realización, el sitio de unión a antígeno funcional que se une a Pb-DOTAM puede tener una o más de las siguientes propiedades:

- Se une específicamente a Pb-DOTAM y a Bi-DOTAM;
- Es selectivo para Pb-DOTAM (y opcionalmente Bi-DOTAM) en comparación con otros metales quelados, como Cu-DOTAM;
- Se une a Pb-DOTAM con una afinidad muy alta;
- Se une al mismo epítipo en Pb-DOTAM que los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, PRIT-0213 o PRIT-0214 y/o tiene los mismos residuos de contacto que dichos anticuerpos.

Los radioisótopos de Pb son útiles en métodos de diagnóstico y terapia. Los radioisótopos particulares de plomo que pueden ser útiles en la presente invención incluyen ^{212}Pb y ^{203}Pb .

Los radionúclidos que son emisores de partículas α tienen el potencial de matar células tumorales más específicas con menos daño al tejido circundante que los emisores β debido a la combinación de la longitud de vía corta y la alta transferencia de energía lineal. ^{212}Bi es un emisor de partículas α pero su corta vida media dificulta su uso directo. ^{212}Pb es el radionúclido principal de ^{212}Bi y puede servir como un generador *in vivo* de ^{212}Bi , superando así la vida media corta de ^{212}Bi (Yong y Brechbiel, Dalton Trans. 2001 21 de junio; 40 (23) 6068–6076).

^{203}Pb es útil como un isótopo de imagen. Por lo tanto, un anticuerpo unido a ^{203}Pb -DOTAM puede tener utilidad en radioinmunoimagen (RII).

En general, los radiometales se utilizan en forma quelada. En ciertos aspectos de la presente invención, DOTAM se utiliza como el agente quelante. DOTAM es un quelante estable de Pb (II) (Yong and Brechbiel, Dalton Trans. 2001 June 21; 40(23)6068–6076; Chappell et al Nuclear Medicine and Biology, Vol. 27, pp. 93–100, 2000). Por lo tanto, DOTAM es particularmente útil junto con isótopos de plomo como se trató anteriormente, como ^{212}Pb y ^{203}Pb .

En algunas formas de realización, puede preferirse que los anticuerpos se unan a Pb–DOTAM con un valor Kd de la afinidad de unión de 100pM, 50pM, 20pM, 10pM, 5pM, 1pM o menos, por ejemplo, 0,9pM o menos, 0,8pM o menos, 0,7 pM o menos, 0,6 pM o menos o 0,5 pM o menos. Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unir el compuesto radiomarcado con una Kd de aproximadamente 1pM–1nM, por ejemplo, aproximadamente 1–10 pM, 1–100pM, 5–50 pM, 100–500 pM o 500pM–1 nM.

En cierta forma de realización, los anticuerpos se unen adicionalmente a Bi quelado por DOTAM. En algunas formas de realización, puede preferirse que los anticuerpos se unan a Bi–DOTAM (es decir, un quelato que comprende DOTAM complejoado con bismuto, también denominado en el presente documento "quelato de Bi–DOTAM") con un valor Kd de la afinidad de unión de 1nM, 500 pM, 200pM, 100pM, 50pM, 10pM o menos, por ejemplo, 9pM, 8pM, 7pM, 6pM, 5pM o menos. Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unirse a un quelato metálico con una Kd de aproximadamente 1 pM–1 nM, por ejemplo, aproximadamente 1–10 pM, 1–100 pM, 5–50 pM, 100–500 pM o 500 pM–1 nM.

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden unirse a Bi–DOTAM y a Pb–DOTAM con una afinidad similar. Por ejemplo, puede preferirse que la relación de afinidad, por ejemplo, la relación de los valores de Kd, para Bi–DOTAM/Pb–DOTAM se encuentre en el rango de 0,1–10, por ejemplo 1–10.

En una forma de realización, la región variable de la cadena pesada que forma parte del sitio de unión al antígeno para Pb–DOTAM puede comprender al menos una, dos o las tres CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLSTYSMS (SEC. ID. NO: 1); (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de FIGSRGDTYYASWAKG (SEC. ID. NO: 2); (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ERDPYGGGAYPPHL (SEC. ID. NO: 3). La región variable de la cadena ligera que forma parte del sitio de unión para Pb–DOTAM puede comprender al menos una, dos o las tres CDR seleccionadas de (d) CDR–L1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de QSSHSVYSDNDLA (SEC. ID. NO: 4); (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de QASKLAS (SEC. ID. NO: 5); y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de LGGYDDSDTYG (SEC. ID. NO: 6).

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden comprender uno o más de CDR-H1, CDR-H2 y/o CDR-H3, o uno o más de CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3, que tienen sustituciones en comparación con las secuencias de aminoácidos de SEC. ID. NO: 1-6, respectivamente, por ejemplo, 1, 2 o 3 sustituciones.

En algunas formas de realización, los anticuerpos pueden compartir los mismos residuos de contacto que los descritos en el presente documento: por ejemplo, estos residuos pueden ser invariables. Estos residuos pueden incluir lo siguiente:

- a) en CDR2 de cadena pesada: Phe50, Asp56 y/o Tyr58, y opcionalmente también Gly52 y/o Arg 54;
 - b) en CDR3 de cadena pesada: Glu95, Arg96, Asp97, Pro98, Tyr99, Ala100C y/o Tyr100D y opcionalmente también Pro100E;
 - c) en CDR1 de cadena ligera: Tyr28 y/o Asp32;
 - d) en CDR3 de cadena ligera: Gly91, Tyr92, Asp93, Thr95c y/o Tyr96;
 - e) en CDR2 de cadena ligera: opcionalmente Gln50;
- todos enumerados de acuerdo con Kabat.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, CDR-H2 puede comprender la secuencia de aminoácidos FIGSRGDTYYASWAKG (SEC. ID. NO: 2), o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 2, en donde estas sustituciones no incluyen Phe50, Asp56 y/o Tyr58, y opcionalmente tampoco incluye Gly52 y/o Arg 54, todos enumerados de acuerdo con Kabat.

En algunas formas de realización, CDR-H2 puede estar sustituida en una o más posiciones como se muestra a continuación. En el presente documento y en las tablas de sustitución que siguen, las sustituciones se basan en los residuos de la línea germinal (subrayados) o por aminoácidos que teóricamente se ajustan estéricamente y también se producen en el repertorio cristalizado en el sitio. En algunas formas de realización, los residuos como se mencionó anteriormente pueden ser fijos y otros residuos pueden sustituirse de acuerdo con la siguiente tabla: en otras formas de realización, las sustituciones de cualquier residuo pueden realizarse de acuerdo con la siguiente tabla.

WolfGuy	Kabat	AA	Sustitución
251	50	F	<u>Y</u> , <u>H</u>
252	51	I	
253	52	G	
254	53	S	<u>A</u> , <u>G</u> , <u>T</u> , I, N
288	54	R	<u>A</u> , <u>D</u> , <u>G</u> , <u>N</u> , <u>S</u> , T, F, Y
289	55	G	<u>D</u> , <u>S</u> , Y, T, A, N, R, V
290	56	D	
291	57	T	<u>K</u> , <u>I</u> , A, P, S
292	58	Y	<u>E</u> , W, H
293	59	Y	<u>N</u> , F, H, L, S
294	60	A	<u>G</u> , <u>N</u> , <u>S</u> , <u>T</u>
295	61	S	<u>A</u> , <u>G</u> , <u>N</u> , <u>Q</u> , <u>T</u>
296	62	W	<u>K</u> , <u>P</u> , <u>S</u> , A, T, D, N, R, Q
297	63	A	<u>F</u> , <u>L</u> , <u>V</u> , M, I
298	64	K	<u>N</u> , <u>Q</u> , R, E
299	65	G	<u>S</u> , <u>T</u> , D, N, A

Opcionalmente, CDR–H3 puede comprender la secuencia de aminoácidos ERDPYGGGAYPPHL (SEC. ID. NO: 3), o una variante del mismo que tenga hasta 1, 2 o 3 sustituciones en SEC. ID. NO: 3, en donde estas sustituciones no incluyen Glu95, Arg96, Asp97, Pro98 y opcionalmente tampoco incluyen Ala100C, Tyr100D y/o Pro100E y/u opcionalmente tampoco incluyen Tyr99. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las sustituciones no incluyen Glu95, Arg96, Asp97, Pro98, Tyr99 Ala100C y Tyr100D.

En ciertas formas de realización, CDR–H3 puede estar sustituida en una o más posiciones como se muestra a continuación. En algunas formas de realización, los residuos como se mencionó anteriormente pueden ser fijos y otros residuos pueden sustituirse de acuerdo con la siguiente tabla: en otras formas de realización, las sustituciones de cualquier residuo pueden realizarse de acuerdo con la siguiente tabla.

WolfGuy	Kabat	AA	Sustitución
351	95	E	
352	96	R	K, E
353	97	D	
354	98	P	
355	99	Y	F, G, S, T, D
356	100	G	
392	100A	G	
393	100B	G	
394	100C	A	S, T
395	100D	Y	F
396	100E	P	
397	100F	P	
398	101	H	A, T, V, D
399	102	L	Y, V, I, H, F

Opcionalmente, CDR–L1 puede comprender la secuencia de aminoácidos QSSHSVYSDNDLA (SEC. ID. NO: 4) o una variante de la misma que tenga hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 4, en donde estas sustituciones no incluyen Tyr28 y/o Asp32 (numeración de Kabat).

En ciertas formas de realización, CDR–L1 puede estar sustituida en una o más posiciones como se muestra a continuación. Nuevamente, en algunas formas de realización, los residuos como se mencionó anteriormente pueden fijarse y otros residuos pueden sustituirse de acuerdo con la tabla a continuación: en otras formas de realización, las sustituciones de cualquier residuo pueden realizarse de acuerdo con la tabla a continuación.

WolfGuy	Kabat	AA	Sustitución
551	24	Q	<u>R</u> , <u>K</u>
552	25	S	<u>A</u> , <u>G</u>
554	26	S	<u>T</u>

555	27	H	<u>Q</u> , <u>S</u> , R, K
556	27A	S	Q
557	27B	V	<u>L</u> , <u>D</u> , <u>N</u>
561	28	Y	F
562	29	S	T, <u>V</u>
571	30	D	<u>R</u> , <u>S</u> , <u>N</u> , <u>G</u>
572	31	N	K
597	32	D	
598	33	L	<u>L</u> , <u>V</u> , <u>M</u>
599	34	A	<u>S</u>

Opcionalmente, CDR–L3 puede comprender la secuencia de aminoácidos LGGYDDESDTYG (SEC. ID. NO: 6) o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en SEC. ID. NO: 6, en donde estas sustituciones no incluyen Gly91, Tyr92, Asp93, Thr95c y/o Tyr96 (Kabat).

En ciertas formas de realización, CDR–L3 puede sustituirse en las siguientes posiciones como se muestra a continuación. (Dado que la mayoría de los residuos están expuestos al solvente y sin contactos de antígeno, se pueden concebir muchas sustituciones). Nuevamente, en algunas formas de realización, los residuos como se mencionó anteriormente pueden fijarse y otros residuos pueden sustituirse de acuerdo con la tabla a continuación: en otras formas de realización, las sustituciones de cualquier residuo pueden realizarse de acuerdo con la tabla a continuación.

WolfGuy	Kabat	AA	Sustitución
751	89	L	A, V, Q
752	90	G	A
753	91	G	
754	92	Y	A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V
755	93	D	A, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
756	94	D	A, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
794	95	E	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
795	95A	S	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
796	95B	D	A, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
797	95C	T	S
798	96	Y	F, H, R
799	97	G	A, E, I, K, L, M, N, Q, S, T, V

El anticuerpo puede comprender además CDR-H1 o CDR-L2, que opcionalmente tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 1 o SEC. ID. NO: 5 respectivamente, o una variante del mismo que tiene al menos 1, 2 o 3 sustituciones relativas a la misma, opcionalmente sustituciones conservativas.

Por lo tanto, el dominio variable de la cadena pesada que forma parte del sitio de unión al antígeno para Pb-DOTAM puede comprender al menos:

a) CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos FIGSRGDTYYASWAKG (SEC. ID. NO: 2), o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 2, en donde estas sustituciones no incluyen Phe50, Asp56 y/o Tyr58, y opcionalmente tampoco incluyen Gly52 y/o Arg54;

b) CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ERDPYGGGAYPPHL (SEC. ID. NO: 3), o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 3, en donde estas sustituciones no incluyen Glu95, Arg96, Asp97, Pro98 y, opcionalmente, tampoco incluyen Ala100C, Tyr100D y/o Pro100E y/u opcionalmente tampoco incluyen Tyr99.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada incluye adicionalmente una CDR1 de cadena pesada que es opcionalmente:

c) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GFSLSTYSMS (SEC. ID. NO: 1) o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 1.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada incluye adicionalmente una alanina C-terminal (por ejemplo, Ala114 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) para evitar la unión de anticuerpos preexistentes que reconocen la región VH libre. Como se informó en Holland MC *et al* J.Clin Immunol (2013), un C-terminal libre parece ser importante para la unión de autoanticuerpos HAVH (dominio humano anti-VH) a anticuerpos del dominio VH, dado que los autoanticuerpos HAVH no se unen a IgG intacta o fragmentos de IgG (fAb o moléculas de VH modificadas) que contienen las mismas secuencias marco de VH, o para anticuerpos del dominio VK. Cordy JC *et al.*, Clinical and Experimental Immunology (2015) señala la existencia de un epítipo críptico en el epítipo C-terminal de VH dAbs, que no es naturalmente accesible para los anticuerpos HAVH en moléculas de IgG completas.

Por lo tanto, cuando el anticuerpo comprende una región VH libre (no fusionada a ningún otro dominio en su extremo C), la secuencia puede extenderse por uno o más residuos C-terminales. La extensión puede evitar la unión de anticuerpos que reconocen la región VH libre. Por ejemplo, la extensión puede ser de 1 a 10 residuos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos. En una forma de realización, la secuencia VH puede extenderse por uno o más residuos de alanina C-terminal. La secuencia VH también puede

extenderse por una porción N-terminal del dominio CH1, por ejemplo, de 1 a 10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. (Los primeros diez residuos del dominio IgG1 CH1 humano son ASTKGPSVFP (SEC. ID. NO.: 149), por lo que en una forma de realización, se pueden tomar de 1 a 10 residuos del extremo N de esta secuencia). Por ejemplo, en una forma de realización, la secuencia de péptidos AST (correspondiente a los 3 primeros residuos del dominio IgG1 CH1) se agrega al extremo C-terminal de la región VH.

En otra forma de realización, el dominio variable de la cadena ligera que forma parte del sitio de unión al antígeno para Pb-DOTAM comprende al menos:

d) CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSSHSVYSDNDLA (SEC. ID. NO: 4) o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 4, en donde estas sustituciones no incluyen Tyr28 y Asp32;

e) CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos LGGYDDSDTYG (SEC. ID. NO: 6) o una variante de la misma que tiene hasta 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 6, en donde estas sustituciones no incluyen Gly91, Tyr92, Asp93, Thr95c y Tyr96.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena ligera incluye adicionalmente una CDR2 de la cadena ligera que es opcionalmente:

f) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QASKLAS (SEC. ID. NO: 5) o una variante de la misma que tiene al menos 1, 2 o 3 sustituciones en la SEC. ID. NO: 5, opcionalmente sin incluir Gln50.

En cualquiera de las formas de realización de la presente invención que incluyen variantes de una secuencia que comprende las CDR expuestas anteriormente (por ejemplo, de un dominio variable), la proteína puede ser invariante en uno o más de los residuos de CDR como se expuso anteriormente.

Opcionalmente, el dominio variable de la cadena pesada que forma parte del sitio de unión al antígeno funcional para Pb-DOTAM (en el primer anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NO: 7 y SEQ ID NO 9, o su variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEC. ID. NO: 7 o la SEC. ID. NO: 9. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene

sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Pb-DOTAM, de modo preferente con una afinidad como se describe en este documento. La secuencia VH puede retener los residuos invariantes como se estableció anteriormente. En ciertas formas de realización, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en las SEC. ID. NO: 7 o SEQ ID NO 9. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 7 o SEC. ID. NO: 9, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia, opcionalmente con una Ala C-terminal. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 1, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 2, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 3.

En algunas formas de realización, como se mencionó anteriormente, en algunas variantes, la SEC. ID. NO: 7 o 9 puede extenderse por uno o más residuos C-terminales adicionales, por ejemplo, por uno o más residuos de alanina, opcionalmente un solo residuo de alanina. Así, por ejemplo, en una variante específica, la secuencia de SEC. ID. NO: 7 puede extenderse para ser:

VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIS
RGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCARERDPY
GGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA (SEC. ID. NO.: 150)

En otras formas de realización, la extensión puede ser por una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, por 1-10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, la extensión puede ser por la secuencia peptídica AST.

Opcionalmente, el dominio variable de la cadena ligera que forma parte del sitio de unión al antígeno funcional para Pb-DOTAM (en el segundo anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 8, o su variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEC. ID. NO: 8. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene

sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión anti-Pb-DOTAM que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Pb-DOTAM, de modo preferente con una afinidad como se describe en este documento. La secuencia VL puede retener los residuos invariantes como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 8. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Pb-DOTAM comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 8, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 4; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 5; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 6.

Las formas de realización relacionadas con la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera se contemplan explícitamente en combinación. Por lo tanto, el sitio de unión al antígeno funcional para Pb-DOTAM puede formarse a partir de una región variable de cadena pesada como se definió anteriormente y una región variable de cadena ligera como se definió anteriormente, en el primer y segundo anticuerpo respectivamente.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno específico para el quelato Pb-DOTAM puede formarse a partir de un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NO: 7 o SEC. ID. NO: 9, o su variante como definió anteriormente (incluyendo una variante con una extensión C-terminal como se trató anteriormente), y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 8, o una variante de la misma como se definió anteriormente. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno específico para el quelato Pb-DOTAM puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 7 o su variante, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 8 o su variante, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En otra forma de realización, puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 9 o su

variante (que incluye una variante con una extensión C-terminal como se trató anteriormente) y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC. ID. NO: 8 o una variante de la misma, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, las regiones variables de cadena ligera y pesada que forman el sitio de unión anti-Pb-DOTAM pueden humanizarse. En una forma de realización, la región variable de la cadena ligera y pesada comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. En otra forma de realización, las regiones variables de cadena ligera y/o pesada comprenden CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende regiones marco derivadas de vk 1 39 y/o vh 2 26. Para vk 1 39, en algunas formas de realización puede no haber mutaciones posteriores. Para vh 2 26, el residuo de la línea germinal Ala49 se puede volver a mutar a Gly49.

E. Ejemplos de sitios de unión a antígeno para CEA

En otra forma de realización particular de la presente invención, que puede combinarse con las formas de realización tratadas anteriormente, el antígeno objetivo unido por el primer y segundo anticuerpo puede ser CEA (antígeno carcinoembrionario). Los anticuerpos que se han producido contra CEA incluyen T84.66 y versiones humanizadas y quiméricas de los mismos, como T84.66-LCHA como se describe en WO2016/075278 A1 y/o WO2017/055389, CH1A1a, un anticuerpo anti-CEA como se describe en WO2012/117002 y WO2014/131712 y CEA hMN-14 o labetuzimab (por ejemplo, como se describe en los documentos US 6 676 924 y US 5 874 540). Otro anticuerpo ejemplar contra CEA es A5B7 (por ejemplo, como se describe en MJ Banfield et al, *Proteins* 1997, 29 (2), 161-171), o un anticuerpo humanizado derivado de A5B7 murino como se describe en WO 92/01059 y WO 2007/071422. Véase también la solicitud co-pendiente PCT/EP2020/067582. Un ejemplo de una versión humanizada de A5B7 es A5H1EL1 (G54A). Un anticuerpo ejemplar adicional contra CEA es MFE23 y sus versiones humanizadas descritas en el documento US 7 626 011 y/o solicitud co-pendiente PCT/EP2020/067582. Incluso un ejemplo adicional de un anticuerpo anti-CEA es 28A9.

Cualquiera de estos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden utilizar para formar un resto de unión a CEA en la presente invención.

Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a CEA puede unirse con un valor de K_d de 1 nM o menos, 500 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos para la unión monovalente.

En algunas formas de realización, el primer y/o segundo anticuerpo puede unirse al epítipo CH1A1a, el epítipo A5B7, el epítipo MFE23, el epítipo T84.66 o el epítipo 28A9 de CEA.

En algunas formas de realización, al menos uno de los anticuerpos primero y segundo se une a un epítipo de CEA que no está presente en CEA soluble (sCEA). El CEA soluble es una parte de la molécula de CEA que es escindida por la fosfolipasa GPI y liberada en la sangre. Un ejemplo de un epítipo que no se encuentra en CEA soluble es el epítipo CH1A1A. Opcionalmente, uno del primer y/o segundo anticuerpo se une a un epítipo que no está presente en CEA soluble, y el otro se une a un epítipo que está presente en CEA soluble.

El epítipo para CH1A1a y su anticuerpo murino principal PR1A3 se describe en WO2012/117002A1 y Durbin H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4313–4317, 1994. Un anticuerpo que se une al epítipo CH1A1a se une a un epítipo conformacional dentro del dominio B3 y el ancla GPI de la molécula CEA. En un aspecto, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo CH1A1a que tiene el VH de la SEC. ID. NO: 25 y VL de SEC. ID. NO 26 en el presente documento. El epítipo A5B7 se describe en la solicitud co-pendiente PCT/EP2020/067582. Un anticuerpo que se une al epítipo A5B7 se une al dominio A2 de CEA, es decir, al dominio que comprende los aminoácidos de la SEC. ID. NO: 154:

PKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSRLQLSN
DNRTLTLTSLVTRNDVGP YECGIQNKLSVDHSDPVILN (SEC ID. NO: 154).

En un aspecto, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo A5B7 que tiene el VH de la SEC. ID. NO: 49 y VL de SEC. ID. NO: 50 en este documento.

En un aspecto, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el T84.66 descrito en WO2016/075278. El anticuerpo se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo que tiene el VH de la SEC. ID. NO: 17 y VL de la SEC. ID. NO: 18 en este documento.

El epítopo MFE23 se describe en la solicitud co–pendiente PCT/EP2020/067582. Un anticuerpo que se une al epítopo MFE23 se une al dominio A1 de CEA, es decir, al dominio que comprende los aminoácidos de la SEC. ID. NO: 155:

PKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSN
GNRTLTLFNVTRNDTAS YKCETQNPVSARRSDSVILN (SEC. ID. NO: 155).

En un aspecto, el anticuerpo puede unirse al mismo epítopo que un anticuerpo que tiene el dominio VH de la SEC. ID. NO: 167 y el dominio VL de la SEC. ID. NO: 168 en este documento.

En algunas formas de realización, el primer y/o segundo anticuerpo puede unirse al mismo epítopo CEA que un anticuerpo proporcionado en el presente documento, por ejemplo, P1AD8749, P1AD8592, P1AE4956, P1AE4957, P1AF0709, P1AF0298, P1AF0710 o P1AF0711.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítopo de CEA entre sí. Así, por ejemplo, el primer y el segundo anticuerpo pueden unirse al epítopo CH1A1a, al epítopo A5B7, al epítopo MFE23, al epítopo T84.66 o al epítopo 28A9.

En algunas formas de realización, tanto el primer como el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR y/o dominios VH/VL) de CH1A1A; o, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de A5B7 o su versión humanizada; o, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de T84.66 o su versión humanizada; o el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de MFE23 o una versión humanizada del mismo; o el primer y el segundo anticuerpo pueden tener ambas secuencias de unión a CEA de 28A9 o su versión humanizada. Se describen secuencias ejemplares en el presente documento.

En otras formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítopos de CEA. Así, por ejemplo, i) un anticuerpo puede unirse al epítopo CH1A1A y el otro puede unirse al epítopo A5B7, el epítopo T84.66, el epítopo MFE23 o el epítopo 28A9; ii) un anticuerpo puede unirse al epítopo A5B7 y el otro puede unirse al epítopo CH1A1A, epítopo T84.66, epítopo MFE23 o epítopo 28A9; iii) un anticuerpo puede unirse al epítopo MFE23 y el otro puede unirse al epítopo CH1A1A, epítopo A5B7, epítopo T84.66 o epítopo 28A9; iv) un anticuerpo puede unirse al epítopo T84.66 y el otro puede unirse al epítopo CH1A1A, epítopo A5B7, epítopo MFE23 o epítopo 28A9; o v) un

anticuerpo puede unirse al epítipo 28A9 y el otro puede unirse al epítipo CH1A1A, el epítipo A5B7, el epítipo MFE23 o el epítipo T84.66.

En algunas formas de realización, i) un anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) de CH1A1A y el otro puede tener secuencias de unión a CEA de A5B7 o su versión humanizada, de T84.66 o su versión humanizada, de MFE23 o su versión humanizada, o de 28A9 o su versión humanizada; ii) un anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de A5B7 o su versión humanizada y el otro puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A, de T84.66 o una versión humanizada del mismo, de MFE23 o su versión humanizada, o de 28A9 o su versión humanizada; iii) un anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de MFE23 o su versión humanizada y el otro puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A, de A5B7 o su versión humanizada, de T84.66 o su versión humanizada, o de 28A9 o su versión humanizada; iv) un anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de T84.66 o su versión humanizada y el otro puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A, de A5B7 o su versión humanizada, de MFE23 o su versión humanizada, o de 28A9 o una versión humanizada; v) un anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de 28A9 o su versión humanizada y el otro puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A, de A5B7 o su versión humanizada del mismo, de T84.66 o su versión humanizada, o de MFE23 o su versión humanizada.

En una forma de realización particular, un anticuerpo puede unirse al epítipo CH1A1A y el otro puede unirse al epítipo A5B7. El primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo CH1A1A y el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de A5B7 (incluida su versión humanizada); o, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo A5B7 (incluida su versión humanizada) y el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A.

En otra forma de realización particular, un anticuerpo puede unirse al epítipo CH1A1A y el otro puede unirse al epítipo T84.66. El primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo CH1A1A y el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de T84.66 (incluida su versión humanizada); o, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo T84.66 (incluida su versión humanizada) y el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de CH1A1A. En algunas formas de realización, un primer anticuerpo puede unirse al epítipo

T84.66 y/o tener un sitio de unión a antígeno como se describe en (i) a continuación, y el segundo anticuerpo puede unirse al epítipo CH1A1A y/o tener un sitio de unión a antígeno como se describe en (ii) a continuación.

Los ejemplos de secuencias de unión a CEA i) –v) se describen a continuación. Estos proporcionan ejemplos de secuencias de unión a CEA de i) T84.66, ii) CH1A1A, iii) A5B7, iv) 28A9 y v) MFE23 (o de sus versiones humanizadas).

i) En una forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 11; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 12; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 13; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 14; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 15; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 16.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 11; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 12; y (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 13.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 14; (b) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 15; y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 16.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VH CDR seleccionadas de (i) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 11, (ii) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 12, y (iii) CDR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 13; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 14, (ii) CDR–L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEC. ID. NO: 15, y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 16.

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 11; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 12; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 13; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 14; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 15; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 16.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico puede ser humanizado. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti–CEA comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 17. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al CEA, de modo preferente con la afinidad como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 17. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a CEA comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 17, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 11, (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 12, y (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 13.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 18. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 18. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para CEA comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 18, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 14; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 15; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 16.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 17 y SEC. ID. NO: 18, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

ii). En una forma de realización particular adicional, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 19; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 20; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 21; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 22; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 23; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 24.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 19; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 20; y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 21.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 22; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 23; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 24.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VH CDR seleccionadas de (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 19, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 20, y (iii) CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 21; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 22, (ii) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 23, y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 24.

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 19; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 20; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 21; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 22; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 23; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 24.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico puede ser humanizado. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti-CEA comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 25. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 25. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a CEA comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 25, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 19, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 20, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 21.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 26. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 26. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para CEA comprende la secuencia VL en SEC. ID. NO: 26, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID.

NO: 22; (b) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 23; y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 24.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 25 y SEC. ID. NO: 26, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

iii) En una forma de realización particular adicional, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 43; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 44; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 45; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 46; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 47; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 48. En algunas formas de realización, CDR–H1 puede tener la secuencia GFTFTDYMN (SEC. ID. NO.: 151).

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 43; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 44; y (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 45. En algunas formas de realización, CDR–H1 puede tener la secuencia GFTFTDYMN (SEC ID. NO.: 151).

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 46; (b) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 47; y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 48.

Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a CEA comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VH CDR seleccionadas de (i) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 43, (ii) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 44, y

(iii) CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 45; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 46, (ii) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 47, y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 48. En algunas formas de realización, CDR-H1 puede tener la secuencia GFTFTDYMN (SEC ID. NO.: 151).

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 43; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 44; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 45; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 46; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 47; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 48. En algunas formas de realización, CDR-H1 puede tener la secuencia GFTFTDYMN (SEC ID. NO.: 151).

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico se puede humanizar. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti-CEA comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 49. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 49. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende la secuencia VH en la SEC. ID.

NO: 49, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 43 o la secuencia GFTFTDYMN (SEC ID. NO.: 151), (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 44, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 45.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 50. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 50. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para CEA comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 50, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 46; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 47; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 48.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 49 y SEC. ID. NO: 50, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

iv) En otra forma de realización particular adicional, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR

seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 59; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 60; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 61; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 62; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 63; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 64.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 59; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 60; y (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 61.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 62; (b) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 63; y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 64.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VH CDR seleccionadas de (i) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 59, (ii) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 60, y (iii) CDR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 61; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 62, (ii) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 63, y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 64.

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 59; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 60; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 61; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 62; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 63; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 64.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico puede ser humanizado. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti-CEA comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 65. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al CEA, de modo preferente con la afinidad como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 65. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 65, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 59, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 60, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 61.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 66. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO:

66. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para CEA comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 66, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 62; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 63; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 64.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 65 y SEC. ID. NO: 66, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

v) En incluso una forma de realización particular adicional, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 156; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 157 o 158; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 159; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 160, 161 o 162; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 163, 164 o 165; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 166.

Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a CEA puede comprender:

Secuencias de VH CDR (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 156; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 157 o 158; y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 159; y/o

Secuencias de VL CDR (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 160, 161 o 162; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 163, 164 o 165; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 166.

En una forma de realización, el sitio de unión a antígeno para CEA comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 167, o (de modo más preferente) seleccionada de SEC. ID. NO: 169, 170, 171, 172, 173 o 174, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 168 o (de modo más preferente) seleccionada de SEC. ID. NO: 175, 176, 177, 178, 179 o 180.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico puede ser humanizado. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti-CEA comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno capaz de unirse a CEA comprende:

(a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 169 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 179, o

(b) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 173 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 179, o

(c) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 170 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 179, o

(d) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 174 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 178, o

(e) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 173 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 178, o

(f) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 171 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 178, o

(g) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 169 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 178.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se menciona en a) a g) anteriormente. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad como se establece anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR).

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se menciona en a) a g) anteriormente. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CEA, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR).

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a CEA comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente.

F. Ejemplos de sitios de unión a antígeno para otros objetivos

En otra forma de realización particular de la presente invención, que puede combinarse con las formas de realización tratadas anteriormente (por ejemplo, los sitios de

unión para DOTA o DOTAM), el antígeno objetivo unido por el primer y segundo anticuerpo puede ser GPRC5D o FAP.

Opcionalmente, el sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D o FAP puede unirse con un valor de K_d de 1 nM o menos, 500 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos para la unión monovalente.

Las secuencias de unión a GPRC5D ejemplares se describen a continuación.

En una forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 67; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 68; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 69; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 70; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 71; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 72.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D puede comprender al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 67; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 68; y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 69.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 70; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 71; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 72.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VH CDR seleccionadas de (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 67, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 68, y (iii) CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 69; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 70, (ii) CDR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEC. ID. NO: 71, y (c) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 72.

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 67; (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 68; (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 69; (d) CDR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 70; (e) CDR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 71; y (f) CDR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 72.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico se puede humanizar. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti–GPRC5D comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco aceptor humano, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 73. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a GPRC5D, de modo preferente con la afinidad como se estableció anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 73. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 73, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 67, (b) CDR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 68, y (c) CDR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 69.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 74. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a GPRC5D, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 74. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para GPRC5D comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 74, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 70; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 71; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 72.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a GPRC5D comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 73 y SEC. ID. NO: 74, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

Ejemplos de secuencias de unión a FAP se describen a continuación.

En una forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 75; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 76; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 77; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 78; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 79; y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 80.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP puede comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 75; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 76; y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 77.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VL CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 78; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 79; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 80.

Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH CDR seleccionadas de (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 75, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 76, y (iii) CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. NO: 77; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias VL CDR seleccionadas de (i) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 78, (ii) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 79, y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 80.

En otro aspecto, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 75; (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 76; (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 77; (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 78; (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 79; y (f) CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos SEC. ID. NO: 80.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el anticuerpo multiespecífico se puede humanizar. En una forma de realización, el sitio de unión al antígeno anti-FAP comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y además comprende un marco humano aceptor, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 81. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a FAP, de modo preferente con la afinidad como se estableció anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC. ID. NO: 81. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende la secuencia VH en la SEC. ID. NO: 81, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VH comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 75, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC, ID. NO: 76, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 77.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 82. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero el sitio de unión al antígeno que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a FAP, de modo preferente con la afinidad establecida anteriormente. En ciertas formas de realización, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEC. ID. NO: 82. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el sitio de unión a antígeno para FAP comprende la secuencia VL en la SEC. ID. NO: 82, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una forma de realización particular, el VL comprende una, dos o tres CDR seleccionadas de (a) CDR-L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 78; (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 79; y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 80.

En otra forma de realización, el sitio de unión a antígeno que se une a FAP comprende un VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente y un VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en las SEC. ID. NO: 81 y SEC. ID. NO: 82, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

G. Formatos de anticuerpos

Como se describió anteriormente, la presente invención se refiere a un conjunto de anticuerpos que comprende:

i) un primer anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula objetivo, y que además comprende un dominio VH de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado, pero que no comprende un dominio VL de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado; y

ii) un segundo anticuerpo que se une al antígeno expresado en la superficie de la célula objetivo, y que además comprende un dominio VL de un sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado, pero que no comprende un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado,

en donde dicho dominio VH del primer anticuerpo y dicho dominio VL del segundo anticuerpo son juntos capaces de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden comprender cada uno un dominio Fc. La presencia de una región Fc tiene beneficios en el contexto de radioinmunoterapia y radioimagen, por ejemplo prolongando la vida media circulante de la proteína y/o dando como resultado una absorción tumoral más alta que la que se puede observar con fragmentos más pequeños.

En algunas formas de realización, donde la región Fc está presente, puede preferirse que la región Fc esté diseñada para reducir o eliminar la función efectora. Esto puede incluir la sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 234, 235, 238, 265, 269, 270, 297, 327 y/o 329, por ejemplo, uno o más de 234, 235 y/o 329. En algunas

formas de realización, la región Fc puede diseñarse para incluir la sustitución de Pro 329 a Gly, Leu 234 a Ala y/o Leu 235 a Ala (numeración de acuerdo con el índice de EU).

En algunas formas de realización, como se trató anteriormente, donde el dominio VH de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado está libre en su extremo C (por ejemplo, no está fusionado a otro dominio a través de su término C), entonces puede extenderse por uno o más residuos para evitar la unión de autoanticuerpos HAVH. Por ejemplo, la extensión puede ser de 1 a 10 residuos, por ejemplo, 1,2,3,4,5,6,7,8,9 o 10 residuos. En una forma de realización, puede extenderse por uno o más residuos de alanina, opcionalmente por un residuo de alanina. La secuencia VH también puede extenderse por una porción N-terminal del dominio CH1, por ejemplo, de 1 a 10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. (Los primeros diez residuos del dominio IgG1 CH1 humano son ASTKGPSVFP (SEC. ID. NO.: 149), por lo que en una forma de realización, se pueden tomar de 1 a 10 residuos del extremo N de esta secuencia). Por ejemplo, en una forma de realización, la secuencia de péptidos AST (correspondiente a los 3 primeros residuos del dominio IgG1 CH1) se agrega al extremo C-terminal de la región VH. En algunas formas de realización, el primer y/o el segundo anticuerpo pueden ser multivalentes, por ejemplo, bivalentes para el antígeno objetivo (por ejemplo, el antígeno asociado a tumor). Esto tiene la ventaja de aumentar la avidéz.

En algunas formas de realización, se puede preferir que cuando el primer y el segundo anticuerpo están asociados, formen un complejo de anticuerpos que es monovalente para el compuesto radiomarcado. Por lo tanto, el primer anticuerpo puede comprender solo un dominio VH de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado, y el segundo anticuerpo puede comprender solo un dominio VL de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado, de modo que juntos forman un solo sitio de unión funcional completo para el compuesto radiomarcado.

Cada uno de los anticuerpos puede comprender i) al menos un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno específico para el antígeno objetivo, ii) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado, y iii) opcionalmente una región Fc. El fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, al menos un fragmento Fv, scFv, Fab o Fab cruzado, que comprende un sitio de unión a antígeno específico para el antígeno objetivo. El fragmento de anticuerpo puede fusionarse a a) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al

antígeno para el compuesto radiomarcado o b) si los anticuerpos comprenden una región Fc, a una región Fc que está fusionada a un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado. En algunas formas de realización, el término C de la región Fc está fusionado con el término N del dominio VL o dominio VH.

La fusión puede ser directa o indirecta. En algunas formas de realización, la fusión puede ser a través de un ligador. Por ejemplo, la región Fc puede fusionarse con el fragmento de anticuerpo a través de la región bisagra u otro ligador adecuado. De manera similar, la conexión del dominio VL o VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado con el resto de la estructura del anticuerpo se puede realizar a través de un ligador. El ligador puede ser un péptido de al menos 5 aminoácidos, de modo preferente de 5 a 100, de modo más preferente de 10 a 50 o de 25 a 50 aminoácidos. El ligador puede ser un ligador rígido o un ligador flexible. En algunas formas de realización, es un ligador flexible que comprende o que consiste en residuos Thr, Ser, Gly y/o Ala. Por ejemplo, puede comprender o consistir en residuos Gly y Ser. En algunas formas de realización, puede tener un motivo repetitivo como (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n, donde n es, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra forma de realización, dicho ligador peptídico es (GxS)_n o (GxS)_nGm con G = glicina, S = serina y (x = 3, n = 3, 4, 5 o 6, y m = 0, 1, 2 o 3) o (x = 4, n = 2, 3, 4 o 5 y m = 0, 1, 2 o 3), por ejemplo, x = 4 y n = 2 o 3, por ejemplo, con x = 4, n = 2. En algunas formas de realización, el ligador puede ser o puede comprender la secuencia GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC. ID. NO.: 31). Se pueden utilizar otros ligadores y podrían ser identificados por la persona experta.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

- a) un fragmento scFv, en el que el fragmento scFv se une al antígeno objetivo; y
- b) un polipéptido que comprende o consiste en

- i) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH); o

- ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del fragmento scFv.

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en:

- c) un segundo scFv que se une al antígeno objetivo; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del fragmento scFv.

El dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del primer anticuerpo y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del segundo anticuerpo juntos forman un sitio funcional de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado, tras la asociación de los dos anticuerpos.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte b (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

Los dominios variables que reconocen el antígeno objetivo de la cadena pesada y ligera de un scFv pueden conectarse mediante una enlace peptídico. Dicha enlace peptídico puede comprender de 1 a 25 aminoácidos, de modo preferente de 12 a 20 aminoácidos, de modo preferente de 12 a 16 o de 15 a 20 aminoácidos. El enlace descrito anteriormente puede comprender uno o más motivos (G3S) y/o (G4S), en particular 1, 2, 3, 4, 5 o 6 (G3S) y/o (G4S) motivos, de modo preferente 3 o 4 (G3S)) y/o (G4S) motivos, de modo más preferente 3 o 4 (G4S) motivos.

Opcionalmente, el primer anticuerpo puede consistir esencialmente o estar compuesto por los componentes (a) y (b) enumerados anteriormente y el segundo anticuerpo puede consistir o consistir esencialmente de los componentes (c) y (d) enumerados anteriormente. En cualquier caso, el primer anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (b) del primer anticuerpo; y el segundo anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional

para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (d) del segundo anticuerpo.

En otra forma de realización particular, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

- a) un fragmento Fab que une el antígeno objetivo, y
- b) un polipéptido que comprende o consiste en
 - i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado, o
 - ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde el polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del dominio CL o CH1 del fragmento Fab.

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en:

- c) un fragmento Fab que une el antígeno objetivo, y
- d) un polipéptido que comprende o que consiste en
 - iii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado, o
 - iv) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo de un sitio de unión a antígeno para un compuesto radiomarcado y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL se fusiona con el extremo N del dominio constante;

en donde el polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del dominio CL o CH1 del fragmento Fab.

El dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo del polipéptido de (b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo del polipéptido de (d) juntos forman un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado (es decir, tras la asociación del dos anticuerpos)

Opcionalmente, el polipéptido de la parte b (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH como se describió anteriormente, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un solo residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

Opcionalmente, el primer anticuerpo puede consistir esencialmente o estar compuesto por los componentes (a) y (b) enumerados anteriormente y el segundo anticuerpo puede constar o consistir esencialmente de los componentes (c) y (d) enumerados anteriormente. En cualquier caso, el primer anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (b) del primer anticuerpo; y el segundo anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (d) del segundo anticuerpo.

La cadena del fragmento Fab que se fusiona con el polipéptido se puede seleccionar independientemente para el primero y para el segundo anticuerpo. Por lo tanto, en una forma de realización, el polipéptido de (b) se fusiona con el extremo C-terminal del dominio CH1 del fragmento Fab del primer anticuerpo, y el polipéptido de (d) se fusiona con el extremo C-terminal del dominio CH1 del fragmento Fab del segundo anticuerpo. En otra forma de realización, el polipéptido de (b) se fusiona con el extremo C del dominio CL del fragmento Fab del primer anticuerpo, y el polipéptido de (d) se fusiona con el extremo C del dominio CL del fragmento Fab del segundo anticuerpo. En otra forma de realización, el polipéptido de (b) se fusiona con el extremo C del dominio CH1 del fragmento Fab del primer anticuerpo, y el polipéptido de (d) se fusiona con el extremo C del dominio CL del Fab fragmento del segundo anticuerpo. En una forma de realización adicional, el polipéptido de (b) se fusiona con el extremo C del dominio CL del fragmento Fab del primer anticuerpo, y el polipéptido de (d) se fusiona con el extremo C del dominio CH1 del fragmento Fab del segundo anticuerpo.

Como se señaló anteriormente, en algunas formas de realización, el primer y/o el segundo anticuerpo pueden ser multivalentes, por ejemplo, bivalentes para el antígeno objetivo (por ejemplo, el antígeno asociado a tumor). Esto tiene la ventaja de aumentar la avidéz. Los anticuerpos pueden ser multivalentes, por ejemplo, bivalentes, y cada uno puede ser monoespecífico para un epítipo particular (que puede ser el mismo epítipo para el primer y segundo anticuerpo, o puede ser diferente para el primer y segundo anticuerpo). Por lo tanto, en algunas formas de realización, el primer anticuerpo puede comprender i) dos o más fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno específico para el mismo epítipo del antígeno objetivo, ii) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado (pero no ambos), y iii) opcionalmente una región Fc. El segundo anticuerpo puede comprender i) dos o más fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno específico para el mismo epítipo del antígeno diana, ii) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado (pero no ambos), y iii) opcionalmente una región Fc. Como se indicó anteriormente, el epítipo puede ser el mismo para el primer y segundo anticuerpo, o puede ser diferente para el primer y segundo anticuerpo

Por ejemplo, cada uno de los anticuerpos primero y segundo puede comprender un Fab en tándem, es decir, dos fragmentos Fab, que están conectados a través de un enlace peptídica (Fab–enlace–Fab), en donde el primer Fab está conectado a través de su C–terminal al N–terminal del segundo Fab.

En una forma de realización, el primer anticuerpo comprende

a) un Fab en tándem que comprende dos fragmentos Fab, en donde el primer y el segundo fragmento Fab se unen al mismo antígeno objetivo ("antígeno objetivo A") y el epítipo unido por el primer fragmento Fab es el mismo que el epítipo unido por el segundo Fab fragmento, y en donde el primer y el segundo fragmento Fab están conectados a través de un enlace peptídico, en donde el primer Fab está conectado a través de su extremo C al extremo N del segundo Fab; y

b) un polipéptido que comprende o consiste en

- i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo; o
- ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo (CH1), en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio CH1;

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del dominio CL o CH1 del segundo fragmento Fab;

y el segundo anticuerpo comprende

c) un Fab en tándem que comprende dos fragmentos Fab, en donde el primer y el segundo fragmento Fab se unen al antígeno A objetivo y el epítipo unido por el primer fragmento Fab es el mismo que el epítipo unido por el segundo fragmento Fab, y en donde el primero y el segundo fragmento Fab está conectado a través de un enlace peptídico, en donde el primer Fab está conectado a través de su extremo C al extremo N del segundo Fab; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante (CL) de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C del dominio CL o CH1 del segundo fragmento Fab.

El dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo de la parte b (en el primer anticuerpo) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo de la parte (d) (en el segundo anticuerpo) juntos forman un sitio de unión a antígeno funcional para el radiomarcado compuesto, es decir, tras la asociación de los dos anticuerpos.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte b (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

La cadena del tándem Fab que se fusiona con el polipéptido (es decir, si el polipéptido se fusiona con el dominio CL o CH1 del segundo fragmento Fab) se puede seleccionar independientemente para el primero y para el segundo cualquiera.

Como se describió anteriormente, el primer fragmento Fab del tándem Fab está conectado al extremo N del segundo fragmento Fab. En una forma de realización, el

extremo C del fragmento de la cadena pesada del primer fragmento Fab está conectado al extremo N del fragmento de la cadena pesada o del fragmento de la cadena ligera del segundo fragmento Fab. En otra forma de realización, el fragmento de la cadena ligera del extremo C del primer fragmento Fab está conectado al extremo N del fragmento de la cadena pesada o del fragmento de la cadena ligera del segundo fragmento Fab. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el tándem Fab del primer y/o segundo anticuerpo puede comprender tres cadenas como sigue:

1) el fragmento de cadena ligera ((VLCL)1) del primer fragmento Fab, el fragmento de cadena pesada del primer fragmento Fab conectado al fragmento de cadena pesada del segundo fragmento Fab a través de un enlace peptídico ((VHCH1)1–enlace–(VHCH1)2) y el fragmento de cadena ligera del segundo fragmento Fab ((VLCL)2); o

2) el fragmento de cadena ligera del primer fragmento Fab ((VLCL)1), el fragmento de cadena pesada del primer fragmento Fab conectado al fragmento de cadena ligera del segundo fragmento Fab a través de un enlace peptídico ((VHCH1)1–enlace–(VLCL)2) y el fragmento de cadena pesada del segundo fragmento Fab ((VH–CH1)2); o

3) el fragmento de cadena pesada (VHCH1) del primer fragmento Fab, el fragmento de cadena ligera del primer fragmento Fab conectado al fragmento de cadena ligera del segundo fragmento Fab a través de un enlace peptídico ((VLCL)1–enlace–(VLCL)2) y el fragmento de cadena pesada del segundo fragmento Fab; o

4) el fragmento de cadena pesada (VHCH1) del primer fragmento Fab, el fragmento de cadena ligera del primer fragmento Fab conectado al fragmento de cadena pesada del segundo fragmento Fab a través de un enlace peptídico ((VLCL)1–enlace–(VHCH1)2) y el fragmento de cadena ligera del segundo fragmento Fab ((VLCL)2).

En otra forma de realización, el primer y/o segundo anticuerpo pueden unirse cada uno a más de, opcionalmente dos, epítomos diferentes del antígeno objetivo. Por lo tanto, uno o ambos anticuerpos pueden ser biparatópicos para el antígeno objetivo. En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden comprender cada uno i) un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno específico para un primer epítomo del antígeno objetivo A; ii) un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno para un segundo epítomo del antígeno objetivo A, iii) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado (pero no ambos), y iv) opcionalmente una región Fc.

En tales formas de realización, el ensamblaje correcto de las cadenas ligeras con sus respectivas cadenas pesadas puede ser asistido mediante el uso de tecnología cross-mab. Por ejemplo, en una forma de realización, cada anticuerpo puede comprender un Fab en tándem que comprende un Fab y un Fab cruzado, en donde un fragmento seleccionado del Fab y el Fab cruzado es específico para un primer epítipo, y el otro es específico para un segundo epítipo.

En un ejemplo particular, el primer anticuerpo puede comprender:

a) un Fab en tándem que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en donde el primer fragmento está conectado por su extremo C a través de un enlace peptídico al extremo N del segundo fragmento, en donde el primer fragmento se une a un primer epítipo de antígeno objetivo A y el segundo fragmento se une a un segundo epítipo del antígeno objetivo A, y en donde uno de los fragmentos seleccionados del primer y segundo fragmento es un Fab y el otro es un Fab cruzado,

b) un polipéptido que comprende o consiste en

i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo (CH1), en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio CH1;

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las cadenas del segundo fragmento.

El segundo anticuerpo puede comprender

c) un Fab en tándem que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en donde el primer fragmento está conectado por su extremo C al extremo N del segundo fragmento, en donde el primer fragmento se une a un primer epítipo del antígeno objetivo A y el segundo el fragmento se une a un segundo epítipo del antígeno objetivo A, y en donde uno de los fragmentos seleccionados entre el primer y el segundo fragmento es un Fab y el otro es un Fab cruzado; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante (CL) de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL se fusiona con el extremo N del dominio constante de la cadena ligera,

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las cadenas del segundo fragmento.

El dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del primer anticuerpo y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo del segundo anticuerpo juntos forman un sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte b (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

El primer o segundo fragmento puede ser el Fab cruzado, siempre que el Fab en tándem comprenda un Fab convencional y un Fab cruzado.

En cualquiera de las formas de realización de Fab en tándem descritas anteriormente (incluidas las que implican Fabs cruzados), opcionalmente, el primer anticuerpo puede consistir esencialmente en los componentes (a) y (b) y el segundo anticuerpo puede constar o consistir esencialmente en los componentes (c) y (d). En cualquier caso, el primer anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (b) del primer anticuerpo; y el segundo anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (d) del segundo anticuerpo.

En cualquiera de las formas de realización de Fab en tándem (incluidas las que implican Fabs cruzados), el enlace peptídico que conecta los fragmentos Fab en el primer y segundo anticuerpo puede ser un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, de modo preferente con una longitud de 5 a 100, de modo más preferente de 10 a 50 aminoácidos. En una forma de realización, dicho ligador peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$ con G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, \text{ y } m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5 \text{ y } m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, de modo preferente $x = 4$ y $n = 2 \text{ o } 3$, de modo más preferente con $x = 4, n = 2$. En una forma de realización, dicho enlace peptídico es $(G4S)_2$.

Como se indicó anteriormente, en algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden comprender cada uno un dominio Fc, opcionalmente diseñado para reducir o eliminar la función efectora.

En una forma de realización, cada uno de los anticuerpos primero y segundo puede comprender i) un dominio Fc, ii) al menos un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento scFv, Fv, Fab o Fab cruzado, que comprende un sitio de unión a antígeno específico para el antígeno objetivo y iii) un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado (pero no ambos).

Opcionalmente, los anticuerpos que comprenden el dominio Fc pueden ser monovalentes con respecto a la unión al antígeno objetivo. En otras formas de realización, pueden ser multivalentes, por ejemplo, bivalentes. El primer y el segundo anticuerpo pueden ser multivalentes y monoespecíficos para el mismo epítipo del antígeno objetivo. En otras formas de realización más, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener sitios de unión para diferentes epítopos del antígeno objetivo, por ejemplo, pueden ser biparatópicos.

El fragmento de anticuerpo puede ser un scFv. Por lo tanto, en una forma de realización, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

- a) un fragmento scFv, en donde el fragmento scFv se une al antígeno objetivo;
- b) un dominio Fc; y
- c) un polipéptido que comprende o consiste en
 - i) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH); o
 - ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante (CH1) de cadena pesada de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde el scFv de (a) está fusionado al extremo N del dominio Fc, y en donde el polipéptido de c) está fusionado por el extremo N del dominio VH al extremo C del dominio Fc, de modo preferente a través de un ligador peptídico.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte c (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un solo residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió

anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en:

d) un segundo scFv que se une al antígeno objetivo;

e) un dominio Fc; y

f) un polipéptido que comprende o consiste en

i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante (CL) de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL está fusionado con el extremo N del dominio constante;

en donde el scFv de (d) está fusionado con el extremo N del dominio Fc, y en donde el polipéptido de (f) está fusionado por el extremo N del dominio VH con el extremo C del dominio Fc, de modo preferente a través de un ligador peptídico.

En otra forma de realización, el primer y el segundo anticuerpo pueden ser cada uno una IgG de un solo brazo que comprende un Fab para el antígeno objetivo (por ejemplo, un Fab único para el antígeno objetivo) y un dominio Fc. Por lo tanto, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

i) un fragmento de cadena ligera completo;

ii) una cadena pesada completa;

iii) una cadena Fc adicional que carece de Fd; y

iv) un polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado;

en donde la cadena ligera de (i) y la cadena pesada de (ii) juntas proporcionan un sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo; y en donde el polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado está fusionado por su extremo N, de modo preferente a través de un ligador, al extremo C de cualquiera de (ii) o (iii).

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en

v) un fragmento de cadena ligera completo;

vi) una cadena pesada completa;

vii) una cadena Fc adicional que carece de Fd; y

viii) un polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado;

en donde la cadena ligera de (v) y la cadena pesada de (vi) juntas proporcionan un sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo; y en donde el polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado se fusiona por su extremo N, de modo preferente a través de un ligador, al extremo C de cualquiera de (vi) o (vii).

El polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VH del sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado puede ser un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, en cuyo caso el polipéptido puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina u opcionalmente una porción N-terminal del dominio CH1 como se describe anteriormente; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante (CH1) de cadena pesada de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio CH1.

El polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado puede ser un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena pesada (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL está fusionado con el extremo N del dominio constante.

Cuando el primer y el segundo anticuerpo son heterodímeros, por ejemplo, como para las IgG de un brazo, su ensamblaje puede ser asistido mediante el uso de tecnología de botón en ojal, como se describe más adelante.

En otra forma de realización, los anticuerpos pueden comprender cada uno un Fab en tándem como se describió anteriormente (por ejemplo, que comprende dos fragmentos Fab, en donde el primer y el segundo fragmento Fab se unen al mismo epítipo del antígeno objetivo A; o que comprende un Fab y un Fab cruzado en donde uno de ellos une un primer epítipo del antígeno objetivo A y el otro une un segundo epítipo del antígeno objetivo A), en donde el tándem Fab está fusionado (por ejemplo, a través de su extremo C) con el extremo N de un dominio Fc, y en donde el péptido que comprende o que

consiste en el dominio VH o VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado se fusiona (por ejemplo, a través de su extremo N-terminal) al extremo C-terminal del dominio Fc.

Por lo tanto, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

a) un Fab en tándem seleccionado de

i) un Fab en tándem que comprende dos fragmentos Fab, en donde el primer y el segundo fragmento Fab se unen al antígeno objetivo A y el epítipo unido por el primer fragmento Fab es el mismo que el epítipo unido por el segundo fragmento Fab, y en donde el primero y el segundo fragmento Fab está conectado a través de un enlace peptídico, en donde el primer Fab está conectado a través de su extremo C al extremo N del segundo Fab; y

ii) un Fab en tándem que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en donde el primer fragmento está conectado por su extremo C a través de un enlace peptídico al extremo N del segundo fragmento, en donde el primer fragmento se une a un primer epítipo de antígeno objetivo A y el segundo fragmento se une a un segundo epítipo del antígeno objetivo A, y en donde uno de los fragmentos seleccionados entre el primer y el segundo fragmento es un Fab y el otro es un Fab cruzado;

b) un dominio Fc; y

c) un polipéptido que comprende o que consiste en:

i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante (CH1) de cadena pesada de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio CH1,

en donde el Fab en tándem se fusiona al extremo N-terminal de una de las cadenas del dominio Fc, y el polipéptido de c) se fusiona por el extremo N-terminal del dominio VH al extremo C de una de las cadenas del Dominio Fc, de modo preferente a través de un ligador peptídico.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte c (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un solo residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió

anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en:

d) un Fab en tándem seleccionado de:

i) un Fab en tándem que comprende dos fragmentos Fab, en donde el primer y el segundo fragmento Fab se unen al antígeno objetivo A y el epítipo unido por el primer fragmento Fab es el mismo que el epítipo unido por el segundo fragmento Fab, y en donde el primero y el segundo fragmento Fab está conectado a través de un enlace peptídico, en donde el primer Fab está conectado a través de su extremo C al extremo N del segundo Fab; y

ii) un Fab en tándem que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en donde el primer fragmento está conectado por su extremo C a través de un enlace peptídico al extremo N del segundo fragmento, en donde el primer fragmento se une a un primer epítipo de antígeno objetivo A y el segundo fragmento se une a un segundo epítipo del antígeno objetivo A, y en donde uno de los fragmentos seleccionados entre el primer y el segundo fragmento es un Fab y el otro es un Fab cruzado;

e) un dominio Fc; y

f) un polipéptido que comprende o que consiste en:

i) un dominio variable de cadena pesada (VL) de anticuerpo; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el extremo C del dominio VL está fusionado con el extremo N del dominio constante de la cadena ligera,

en donde el Fab en tándem de (d) está fusionado con el extremo N-terminal de una de las cadenas del dominio Fc, y el polipéptido de (f) está fusionado por el extremo N-terminal del dominio VL con el extremo C-terminal de uno de las cadenas del dominio Fc, de modo preferente a través de un ligador peptídico.

El dominio VH del primer anticuerpo y el dominio VL del segundo anticuerpo juntos forman un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado, es decir, tras la asociación de los dos anticuerpos.

Si el primer anticuerpo comprende un Fab en tándem de acuerdo con (a) (i), entonces generalmente será el caso que el segundo anticuerpo comprenda un Fab en

tándem de acuerdo con d (i); si el primer anticuerpo comprende un Fab en tándem de acuerdo con (a) (ii), entonces generalmente será el caso que el segundo anticuerpo comprenda un Fab en tándem de acuerdo con d (ii).

El Fab en tándem puede ser generalmente como se describe anteriormente. Por ejemplo, el enlace que une los dos fragmentos del Fab en tándem puede ser como se describió anteriormente. El Fab en tándem puede estar compuesto por cualquiera de los conjuntos de cadenas establecidos anteriormente. En general, el fragmento de la cadena pesada del segundo Fab (que puede ser un Fab cruzado) se puede unir al dominio Fc.

En una forma de realización adicional, cada uno de los anticuerpos primero y segundo puede comprender a) un dominio Fc, b) al menos un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento scFv, Fv, Fab o Fab cruzado, que comprende un sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo y c) un polipéptido que comprende un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado (pero no ambos), en donde el extremo C del fragmento de anticuerpo de (b) está fusionado con el extremo N de una cadena del dominio Fc, y el extremo C del polipéptido de (c) se fusiona con el extremo N de la otra cadena del dominio Fc. La fusión del fragmento de anticuerpo de (b) es de modo preferente a través de la región bisagra. La fusión del polipéptido de (c) puede realizarse a través de un ligador colocado entre el extremo C del polipéptido y el extremo N de la región Fc y/o a través de parte o la totalidad de la región de la bisagra superior (por ejemplo, el Asp221 y los residuos C-terminal de acuerdo con el índice de numeración de EU). En una forma de realización, el fragmento de anticuerpo de (b) puede ser un fragmento Fab. En una forma de realización, en el primer anticuerpo, el polipéptido de (c) consiste en el dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado; y en el segundo anticuerpo, el polipéptido de (c) consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado.

Por lo tanto, en una forma de realización, el primer anticuerpo puede comprender o consistir en:

- i) una cadena ligera completa;
- ii) una cadena pesada completa;
- iii) una cadena Fc adicional; y
- iv) un polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado;

en donde la cadena ligera de (i) y la cadena pesada de (ii) juntas proporcionan un sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo; y en donde el polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado se fusiona por su extremo C, de modo preferente a través de un ligador, al extremo N de (iii).

El segundo anticuerpo puede comprender o consistir en

v) una cadena ligera completa;

vi) una cadena pesada completa;

vii) una cadena Fc adicional; y

viii) un polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado;

en donde la cadena ligera de (v) y la cadena pesada de (vi) juntas proporcionan un sitio de unión a antígeno para el antígeno objetivo; y en donde el polipéptido que comprende o que consiste en el dominio VL del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado se fusiona por su extremo c, de modo preferente a través de un ligador, al extremo N de (vii).

El ligador puede comprender cualquier ligador flexible conocido por el experto en la materia, por ejemplo, el ligador GGGGSGGGGSGGGGSGGSGG (SEC ID. NO.: 152). El ligador puede incluir además parte de toda la región de la bisagra superior, por ejemplo, puede extenderse desde Asp221 hasta el comienzo de la cadena Fc (por ejemplo, en Cys226).

En otra forma de realización adicional, el primer y/o segundo anticuerpo comprenden cada uno un anticuerpo de longitud completa que tiene un sitio de unión al antígeno para el antígeno objetivo, y además comprenden un dominio VL o un dominio VH del sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede comprender:

a) un primer anticuerpo de longitud completa que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos, en donde al menos un brazo del anticuerpo de longitud completa se une al antígeno objetivo A; y

b) un polipéptido que comprende o consiste en

i) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo adicional; o

ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo adicional y un dominio constante (CH1) de anticuerpo adicional, en donde el extremo C del dominio VH está fusionado con el extremo N del dominio CH1,

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho primer anticuerpo de longitud completa.

El segundo anticuerpo puede comprender

c) un segundo anticuerpo de longitud completa que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos, en donde al menos un brazo del anticuerpo de longitud completa se une al antígeno objetivo A; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en

i) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo adicional; o

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo adicional y un dominio constante (CL) de cadena ligera de anticuerpo adicional, en donde el extremo C del dominio VL está fusionado con el extremo N del dominio CL,

en donde dicho polipéptido está fusionado por el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho segundo anticuerpo de longitud completa.

El dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del primer anticuerpo y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo del segundo anticuerpo juntos forman un sitio de unión al antígeno funcional para el compuesto radiomarcado, es decir, tras la asociación de los dos anticuerpos.

Opcionalmente, el polipéptido de la parte b (i) puede comprender adicionalmente uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina. Opcionalmente, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

Opcionalmente, el primer anticuerpo puede constar esencialmente en o consistir en los componentes (a) y (b) enumerados anteriormente, y el segundo anticuerpo puede consistir esencialmente o consistir en los componentes (c) y (d) enumerados anteriormente. En cualquier caso, el primer anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el

compuesto radiomarcado en asociación con el componente (b) del primer anticuerpo; y el segundo anticuerpo no comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo capaz de formar un sitio de unión a antígeno funcional para el compuesto radiomarcado en asociación con el componente (b) del segundo anticuerpo.

Puede preferirse que ambos brazos del anticuerpo de longitud completa tengan especificidad de unión para el antígeno objetivo A. Cuando el anticuerpo es bivalente para el antígeno objetivo, ambos brazos del anticuerpo de longitud completa pueden unirse al mismo epítipo del antígeno objetivo A.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede ser biparatópico para el antígeno objetivo; por ejemplo, un brazo del anticuerpo de longitud completa puede unirse a un primer epítipo del antígeno objetivo A y un brazo puede unirse a un segundo epítipo del antígeno A objetivo. En tales formas de realización, un brazo del anticuerpo puede comprender un Fab y un brazo puede comprender un Fab cruzado, para ayudar en el ensamblaje correcto de las cadenas ligeras con sus respectivas cadenas pesadas. Por lo tanto, en una forma de realización, la primera cadena pesada del anticuerpo de longitud completa puede comprender un dominio VL en lugar del dominio VH (por ejemplo, VL-CH1-bisagra-CH2-CH3) y la primera cadena ligera puede comprender un dominio VH intercambiado para el dominio VL (por ejemplo, VH-CL), o la primera cadena pesada puede comprender un dominio CL en lugar del dominio HC1 (por ejemplo, VH-CL-bisagra-CH2-CH3) y la primera cadena ligera puede comprender un dominio CH1 en lugar del dominio CL (por ejemplo, VL-CH1). En esta forma de realización, la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera tienen la estructura de dominio convencional (por ejemplo, VH-CH1-bisagra-CH2-CH3 y VL-CL, respectivamente). En una forma de realización alternativa, la segunda cadena pesada del anticuerpo de longitud completa puede comprender un dominio VL en lugar del dominio VH (por ejemplo, VL-CH1-bisagra-CH2-CH3) y la segunda cadena ligera puede comprender un dominio VH intercambiado por el dominio VL (por ejemplo, VH-CL), o la segunda cadena pesada puede comprender un dominio CL en lugar del dominio HC1 (por ejemplo, VH-CL-bisagra-CH2-CH3) y la segunda cadena ligera puede comprender un dominio CH1 en lugar del dominio CL (por ejemplo, VL-CH1). En esta forma de realización, la primera cadena pesada y la primera cadena ligera tienen la estructura de dominio convencional.

En algunas formas de realización, el ensamblaje correcto de las cadenas ligeras con sus respectivas cadenas pesadas puede ser asistido adicional o alternativamente utilizando modificación de carga, como se trata más adelante.

El ensamblaje correcto de cadenas pesadas heterodiméricas puede ser asistido por la tecnología de botón en ojal.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo de longitud completa" denota un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas de anticuerpos de longitud completa" y dos "cadenas ligeras de anticuerpos de longitud completa". Una "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" puede ser un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio de cadena pesada constante de anticuerpo 1 (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 2 (CH2) y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CH3), abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3; y opcionalmente un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 4 (CH4) en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. De modo preferente, la "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de VH, CH1, HR, CH2 y CH3. La posibilidad de formación de Mab cruzada no se debe excluir por la referencia a "longitud completa"; por lo tanto, la cadena pesada puede tener el dominio VH intercambiado por un dominio VL, o el dominio CH1 intercambiado por un dominio CL. Una "cadena ligera de anticuerpo de longitud completa" puede ser un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviado como VL-CL. Alternativamente, en el caso de un Mab cruzada, el dominio VL puede intercambiarse por un dominio VH o el dominio CL puede intercambiarse por un dominio CH1. El dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo (CL) puede ser κ (kappa) o γ (lambda). Las dos cadenas de anticuerpos de longitud completa están unidas entre sí a través de enlaces disulfuro interpolipéptidos entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagras de las cadenas pesadas de anticuerpos de longitud completa. Los ejemplos de anticuerpos típicos de longitud completa son anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo, IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE.) Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención pueden ser de una sola especie, por ejemplo humanos, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa descritos en el

presente documento comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por un par de VH y VL, que en algunas formas de realización pueden unirse específicamente al mismo antígeno o pueden unirse a antígenos diferentes. El término C de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa denota el último aminoácido en el término C de dicha cadena pesada o ligera.

El término N del dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del polipéptido en b) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo en el polipéptido en d) denota el último aminoácido en el extremo N del dominio VH o VL.

Las técnicas que se conocen para fabricar anticuerpos multiespecíficos también se pueden utilizar para fabricar cualquiera de los heterodímeros descritos en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada–cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)) e ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.731.168, y Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270: 26 (1997)). Otros métodos incluyen la ingeniería de los efectos de dirección electrostática para producir la molécula heterocimérica Fc del anticuerpo (véase, por ejemplo, WO 2009/089004); entrecruzar dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980, y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); utilizando cremalleras de leucina (véase, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547–1553 (1992) y WO 2011/034605); y utilizar la tecnología de cadena ligera común para sortear el problema de mal emparejamiento de la cadena ligera (véase, por ejemplo, el documento WO 98/50431).

Los dominios CH3 del anticuerpo de longitud completa como se describió anteriormente pueden ser alterados por la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., *Protein Eng* 9 (1996) 617–621; y Merchant, A.M., et al., *Nat Biotechnol* 16 (1998) 677–681. En este método, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". Por ejemplo, uno comprende las llamadas "mutaciones botón" (T366W y opcionalmente una de S354C o Y349C) y el otro comprende las llamadas "mutaciones de ojal" (T366S, L368A e Y407V y opcionalmente

Y349C o S354C) (véase, por ejemplo, Carter, P. et al., *Immunotechnol.* 2 (1996) 73) de acuerdo con la numeración del índice de EU.

La introducción de un puente disulfuro se puede utilizar adicional o alternativamente para estabilizar los heterodímeros (Merchant, AM, y col., *Nature Biotech* 16 (1998) 677–681; Atwell, S., et al., *J. Mol. Biol.* 270 (1997) 26–35) y aumentar el rendimiento.

Así, en algunas formas de realización, el primer y/o segundo anticuerpo se caracteriza además porque: el dominio CH3 de una cadena pesada del anticuerpo de longitud completa y el dominio CH3 de la otra cadena pesada del anticuerpo de longitud completa se encuentran cada uno en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios de anticuerpos CH3; en donde dicha interfaz se altera para promover la formación del anticuerpo, en donde la alteración se caracteriza porque:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada, de modo que dentro de la interfaz original el dominio CH3 de una cadena pesada que cumple con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando así una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede colocar en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada, y

b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de modo que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando así una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro del cual se puede posicionar una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

Dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor puede seleccionarse opcionalmente del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). Dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño puede seleccionarse opcionalmente del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

Opcionalmente, en algunas formas de realización, ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente por la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones

correspondientes de cada dominio CH3 de manera que se pueda formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

Los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biparatópicos) de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos en moléculas Fab (incluyendo moléculas Fab cruzadas) comprendidas en ellas que son particularmente eficientes para reducir el emparejamiento incorrecto de cadenas ligeras con cadenas pesadas no coincidentes (productos secundarios tipo Bence-Jones), que pueden ocurrir en la producción de moléculas de unión a antígeno bi/multiespecíficas basadas en Fab con un intercambio VH/VL en una (o más, en el caso de moléculas que comprenden más de dos moléculas Fab de unión a antígeno) de sus brazos de unión (véase también la publicación PCT N° WO 2015/150447, en particular los ejemplos en el mismo, incorporados en el presente documento como referencia en su totalidad). La proporción de anticuerpos multiespecíficos deseados en comparación con los productos secundarios no deseados, en particular los productos secundarios de tipo Bence Jones que se presentan en uno de sus brazos de unión, puede mejorarse mediante la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL de una molécula Fab (a veces denominada en el presente documento "modificaciones de carga").

Por lo tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención que comprenden moléculas Fab, comprenden al menos un Fab con un dominio CH1 de dominio constante de cadena pesada que comprende modificaciones de carga como se describe en el presente documento, y un dominio CL constante de cadena ligera que comprende modificaciones de carga como se describe en el presente documento.

Las modificaciones de carga se pueden realizar en las moléculas Fab convencionales comprendidas en los anticuerpos de la presente invención, o en las moléculas Fab cruzadas comprendidas en los anticuerpos de la presente invención (pero no en ambas). En formas de realización particulares, las modificaciones de carga se realizan en la o las moléculas Fab convencionales comprendidas en los anticuerpos de la presente invención.

En algunas formas de realización, en un Fab o Fab cruzado que comprende un dominio constante de cadena ligera CL que comprende modificaciones de carga y un dominio constante de cadena pesada CH1 que comprende modificaciones de carga, las modificaciones de carga en el dominio constante de cadena ligera CL están en la posición

124 y opcionalmente en la posición 123 (numeración de acuerdo con Kabat), y las modificaciones de carga en el dominio constante de cadena pesada CH1 están en la posición 147 y/o 213 (numeración de acuerdo con el índice Kabat EU). En algunas formas de realización, en el dominio constante de la cadena ligera CL, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización preferida independientemente por lisina (K)), y en el dominio constante CH1 de la cadena pesada, el aminoácido en la posición 147 y/o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice Kabat EU).

H. Anticuerpos Ejemplares

Los aspectos y las formas de realización con respecto a la unión objetivo (por ejemplo, la unión a CEA, la unión a FAP o la unión a GPRC5D) y los aspectos y formas de realización con respecto a la unión a DOTA se pueden combinar en algunas formas de realización. Es decir, puede preferirse que el primer y el segundo anticuerpo comprendan cada uno un sitio de unión para CEA, FAP o GPRC5D, por ejemplo, que comprendan cualquiera de las secuencias como se describió anteriormente, y que el primer y el segundo anticuerpo se asocien para formar un sitio de unión para un quelato DOTA que tiene cualquiera de las secuencias como se describió anteriormente. También se contempla expresamente que los aspectos y las formas de realización relacionadas con la unión a CEA, FAP o GPRC5D y/o la unión de DOTA se pueden combinar con formatos preferidos para el anticuerpo como se describió anteriormente, es decir, en cualquiera de los formatos preferidos, la parte que se une al antígeno objetivo puede comprender CDR o secuencias de regiones variables como se describió anteriormente, y/o la parte que se une al compuesto marcado con radionúclidos puede ser un aglutinante DOTA que tiene CDR y/o secuencias de región variable como se describió anteriormente.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede comprender:

- a) un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a CEA y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos; y
- b) un polipéptido que comprende o que consiste en un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo en donde el dominio variable de cadena pesada comprende

CDR de cadena pesada de SEC. ID. NOs 35–37 (o en donde CDR–H1 tiene la secuencia GFSLTDYGVH (SEC. ID. NO.: 148)), y/o en donde el dominio variable de la cadena pesada tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEQ ID NO 41;

en donde dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho primer anticuerpo de longitud completa.

El primer anticuerpo no comprende un dominio de cadena ligera que se asocie con el polipéptido de (b) para formar un dominio de unión funcional para un compuesto radiomarcado.

Se puede preferir que el polipéptido de (b) comprenda además uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, por ejemplo, 1–10 residuos. Opcionalmente, estos pueden ser uno o más residuos de alanina, opcionalmente un solo residuo de alanina. En otra forma de realización, los residuos adicionales pueden ser una porción N–terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) tienen dominios variables idénticos, opcionalmente dominios CH1 y/o CH2 variables idénticos. Opcionalmente, pueden diferir solo en sus dominios CH3, por ejemplo, mediante la creación de mutaciones de botón en ojal y otras mutaciones destinadas a promover la asociación correcta de heterodímeros.

El segundo anticuerpo puede comprender:

c) un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a CEA y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende CDR de SEC. ID. NO: 38–40 y/o en donde el dominio variable de la cadena ligera tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SE: ID. NO 42;

en donde dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho segundo anticuerpo de longitud completa y en donde el segundo anticuerpo no

comprende un dominio de cadena pesada que se asocia con el polipéptido de (d) para formar un dominio de unión funcional para un compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) tienen dominios variables idénticos entre sí, opcionalmente dominios CH1 y/o CH2 variables idénticos. Opcionalmente, pueden diferir solo en sus dominios CH3, por ejemplo, mediante la creación de mutaciones de botón en ojal y otras mutaciones destinadas a promover la asociación correcta de heterodímeros.

Los sitios/secuencias de unión a CEA pueden ser cualquiera de los sitios/secuencias de unión a CEA descritos anteriormente.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo CH1A1A.

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 22–24 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 26. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 103. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (a) sean idénticas entre sí.

Las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. NOs: 19–21 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 25. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (a) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 100 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 102.

En una forma de realización específica, el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 100, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 101 (en donde el AST C-terminal es opcional y puede estar ausente o sustituido con otra extensión C-terminal como se describe en el presente documento) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 103.

El segundo anticuerpo también puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo CH1A1A.

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 22–24 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID.

NO 26. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 103 En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) sean idénticas entre sí. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) tengan la misma secuencia que las cadenas ligeras en (a) del primer anticuerpo, por ejemplo, que todas dichas cadenas ligeras en las partes (a) y (c) tengan la misma secuencia

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden las CDR de las SEC. ID. NO: 19–21 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 25. En una forma de realización, una cadena pesada de la parte (c) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 97 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 99.

En una forma de realización específica, el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 97, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 98 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 103.

De manera similar, los aspectos y las formas de realización con respecto a la unión a objetivos (por ejemplo, la unión a CEA, la unión a FAP o la unión a GPRC5D) y los aspectos y las formas de realización con respecto a la unión a Pb–DOTAM se pueden combinar en algunas formas de realización. Es decir, puede preferirse que el primer y el segundo anticuerpo comprendan cada uno un sitio de unión para CEA, FAP o GPRC5D, por ejemplo, que comprendan cualquiera de las secuencias como se describió anteriormente, y que el primer y el segundo anticuerpo se asocien para formar un sitio de unión para un quelato de Pb–DOTAM que tiene cualquiera de las secuencias descritas anteriormente. También se contempla expresamente que los aspectos y formas de realización relacionados con la unión de CEA, FAP o GPRC5D y/o la unión de Pb–DOTAM se pueden combinar con formatos preferidos para el anticuerpo como se describió anteriormente, es decir, en cualquiera de los formatos preferidos, la parte que une el antígeno objetivo puede comprender CDR o secuencias de regiones variables como se describió anteriormente, y/o la parte que se une al compuesto marcado con radionúclidos puede ser un aglutinante Pb–DOTAM que tiene CDR y/o secuencias de región variable como se describió anteriormente.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede comprender:

a) un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a CEA y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos; y

b) un polipéptido que comprende o que consiste en un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo en donde el dominio variable de cadena pesada comprende CDR de cadena pesada de SEC. ID. NOs 1–3, y/o en donde el dominio variable de cadena pesada tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 7;

en donde dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VH, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho primer anticuerpo de longitud completa.

El primer anticuerpo no comprende un dominio de cadena ligera que se asocie con el polipéptido de (b) para formar un dominio de unión funcional para un compuesto radiomarcado.

Se puede preferir que el polipéptido de (b) comprenda además uno o más residuos en el extremo C del dominio VH, opcionalmente, uno o más residuos de alanina, opcionalmente un único residuo de alanina. Por ejemplo, el polipéptido de (b) puede comprender o consiste en la SEC. ID. NO: 7 con una extensión de alanina C-terminal, es decir, la secuencia

VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIS
RGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCARERDPY
GGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA (SEC. ID. NO.: 150).

En otra forma de realización, los residuos adicionales pueden ser una porción N-terminal del dominio CH1 como se describió anteriormente, por ejemplo, 1–10 residuos del extremo N del dominio CH1, por ejemplo, del dominio IgG1 CH1 humano. Por ejemplo, los residuos adicionales pueden ser AST.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) tienen dominios variables idénticos, opcionalmente dominios CH1 y/o CH2 variables idénticos. Opcionalmente, pueden diferir solo en sus dominios CH3, por ejemplo, mediante la creación de mutaciones de botón en ojal y otras mutaciones destinadas a promover la asociación correcta de heterodímeros.

El segundo anticuerpo puede comprender:

c) un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a CEA y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas ligeras de anticuerpos; y

d) un polipéptido que comprende o que consiste en un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo en donde el dominio variable de cadena ligera comprende CDR de SEC. ID. NO: 4–6 y/o en donde el dominio variable de cadena ligera tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 8;

en donde dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL, de modo preferente a través de un ligador peptídico, al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho segundo anticuerpo de longitud completa y en donde el segundo anticuerpo no comprende un dominio de cadena pesada que se asocia con el polipéptido de (d) para formar un dominio de unión funcional para un compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) tienen dominios variables idénticos entre sí, opcionalmente dominios CH1 y/o CH2 variables idénticos. Opcionalmente, pueden diferir solo en sus dominios CH3, por ejemplo, mediante la creación de mutaciones de botón en ojal y otras mutaciones destinadas a promover la asociación correcta de heterodímeros.

En una forma de realización particular, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo CH1A1A.

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 22–24 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 26. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 34. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (a) sean idénticas entre sí.

Las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. NOs: 19–21 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 25. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (a) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 27 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 28.

En una forma de realización específica, el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 28, y una segunda cadena pesada de SEC. ID.

NO: 32 (o su variante que comprende una alanina C-terminal adicional u otra extensión C-terminal como describió en el presente documento, como una extensión con AST) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 34. A continuación se muestra una variante de SEC. ID. NO: 32 con una extensión de alanina C-terminal:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQG
LEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGF
SLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQV
VLTMTNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA (SEC.
ID. NO.: 153)

En otra forma de realización particular, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo A5B7 (incluida una versión humanizada del mismo).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 46–48 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 50. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 54 En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (a) sean idénticas entre sí.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) pueden comprender las CDR de SEC. ID. NO: 43–45 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 49. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (a) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 51 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 53.

En una forma de realización específica, el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 51, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 52 (o una variante del mismo con una extensión de alanina C-terminal u otra extensión C-terminal como se describió en el presente documento, como una extensión con AST) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 54.

En otra forma de realización particular, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo T84.66 (incluida una versión humanizada del mismo).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 14–16 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 18. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 89. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (a) sean idénticas entre sí.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) pueden comprender las CDR de las SEC ID Nos: 11–13 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 17. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (a) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 86 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 88.

En una forma de realización específica, el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 86 y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 87 (o su variante en donde el "AST" C-terminal está ausente o sustituido por una extensión C-terminal diferente como se describe en el presente documento) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 89.

En otra forma de realización particular, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo 28A9 (incluida una versión humanizada del mismo).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (a) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 62–64 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 66. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 96. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (a) sean idénticas entre sí.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) pueden comprender las CDR de SEC. ID. NO: 59–61 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 65. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (a) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 93 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 95.

En una forma de realización específica, el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 93, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 94 (o su variante sin el "AST" C-terminal o con una extensión C-terminal diferente como se describe en el presente documento) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 96.

En algunas formas de realización, el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo CH1A1A.

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 22–24 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 26. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 34. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) sean idénticas entre sí. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) tengan la misma secuencia que las cadenas ligeras en (a) del primer anticuerpo, por ejemplo, que todas dichas cadenas ligeras en las partes (a) y (c) tengan la misma secuencia

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden las CDR de las SEC. ID. Nos: 19–21 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 25. En una forma de realización, una cadena pesada de la parte (c) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 29 y la otra tiene la secuencia de la SEC. ID. NO: 30.

En una forma de realización específica, el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 30 y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 33 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 34.

En otra forma de realización particular, el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) de A5B7 (incluida su versión humanizada).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 46–48 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 50. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 58. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) sean idénticas entre sí. En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) tengan la misma secuencia que las cadenas ligeras en (a) del primer anticuerpo, por ejemplo, que todas dichas cadenas ligeras en las partes (a) y (c) tengan la misma secuencia

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden las CDR de las SEC. ID. NOs: 43–45 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 49. En una forma de realización, una cadena pesada de la parte (c) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 55 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 57.

En una forma de realización específica, el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 55, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 56 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 58.

En otra forma de realización particular, el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo T84.66 (incluida su versión humanizada).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 14–16 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 18. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 89 En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) sean idénticas entre sí.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. NOs: 11–13 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) comprenden un dominio variable que tiene al menos

90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 17. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (c) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 83 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 85.

En una forma de realización específica, el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 83, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 84 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 89.

En otra forma de realización particular, el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA (es decir, CDR o dominios VH/VL) del anticuerpo 28A9 (incluida su versión humanizada).

Por ejemplo, las dos cadenas ligeras en (c) pueden comprender las CDR de las SEC. ID. Nos 62–64 y/o pueden comprender dominios variables de cadenas ligeras que tienen al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 66. En algunas formas de realización pueden tener al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO: 96 En algunas formas de realización, puede preferirse que las dos cadenas ligeras en (c) sean idénticas entre sí.

En algunas formas de realización, las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (c) pueden comprender las CDR de SEC. ID. NOs: 59–61 y/o las dos cadenas pesadas de anticuerpos en la parte (a) comprenden un dominio variable que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con la SEC. ID. NO 65. En una forma de realización, una cadena pesada en la parte (c) tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 90 y la otra tiene la secuencia de SEC. ID. NO: 92.

En una forma de realización específica, el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 90, y una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 91 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 96.

En algunas formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo de CEA. Así, por ejemplo, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo CH1A1A; o, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de A5B7 (incluyendo su versión humanizada); o, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de T84.66 (incluyendo su versión humanizada); o, el primer y el segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de 28A9 (incluyendo su versión humanizada); o, el primer y el

segundo anticuerpo pueden tener secuencias de unión a CEA de MFE23 (incluida su versión humanizada).

Así, por ejemplo:

i) el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 28, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 32 (opcionalmente con una extensión C-terminal como se describe en el presente documento, por ejemplo, AST) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 34; y el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 30, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 33 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 34;

ii) el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 51, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 52 (opcionalmente con una extensión C-terminal como se describe en el presente documento, por ejemplo, AST) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 54; y el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 55, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 56 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 58;

iii) el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 86, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 87 (en donde los residuos AST C-terminales son opcionales y pueden estar ausentes o sustituidos por una extensión C-terminal alternativa) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 89; y el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 83, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 84 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 89; o

iv) el primer anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 93, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 94 (en donde los residuos AST C-terminales son opcionales y pueden estar ausentes o sustituidos por una extensión C-terminal alternativa) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 96; y el segundo anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 90, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 91 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 96.

En otras formas de realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítomos de CEA, como se trató anteriormente. Así, por ejemplo, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo CH1A1A y el segundo anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA de A5B7; o, el primer anticuerpo puede tener secuencias de unión a CEA del anticuerpo A5B7 y el segundo anticuerpo puede tener

secuencias de unión a CEA de CH1A1A. En el ejemplo 6c se describe un ejemplo del uso de pares bi-paratópicos (CH1A1A y A5B7).

En otras formas de realización específicas adicionales, el antígeno objetivo puede ser GPRC5D o FAP y el formato puede ser como se muestra en la figura 25 B. Opcionalmente, el primer y segundo anticuerpo se asocian para formar un sitio de unión a antígeno funcional para un quelato Pb-DOTAM (Pb-DOTAM).

Por lo tanto, en una forma de realización (donde el antígeno objetivo es GPRC5D):

i) el primer anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 104, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 106 (en donde la alanina C-terminal es opcional y puede estar ausente o reemplazada por una extensión C-terminal alternativa como se describe en el presente documento) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 107; y

ii) el segundo anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 104, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 105 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 107.

En otra forma de realización (donde el antígeno objetivo es FAP):

i) el primer anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 108, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 110 (en donde la alanina C-terminal es opcional y puede estar ausente o reemplazada por una extensión C-terminal alternativa como se describe en el presente documento) y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 111; y

ii) el segundo anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 108, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 109 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 111.

En incluso formas de realización específicas adicionales, el objetivo puede ser CEA, por ejemplo, que tiene secuencias de unión a CEA del anticuerpo CH1A1A, y el formato puede ser como se muestra en la figura 25C. Opcionalmente, el primer y segundo anticuerpo se asocian para formar un sitio de unión a antígeno funcional para un quelato Pb-DOTAM (Pb-DOTAM). Por lo tanto, en una forma de realización específica:

i) el primer anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 112, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 114 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 115; y

ii) el segundo anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 112, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 113 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 115.

I. Variantes de Anticuerpos

En ciertas formas de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

Variantes de Sustitución, Inserción y Eliminación

En ciertas formas de realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las HVR (CDR) y FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el título de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el título de "sustituciones ejemplares", y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos pueden rastrearse para una actividad deseada, por ejemplo, unión de antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC reducidas o eliminadas.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo principal (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para estudio adicional tendrá modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, mayor afinidad, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo principal y/o habrá retenido sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo principal. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, utilizando técnicas de maduración de afinidad basadas en la presentación en fagos, como las descritas en el presente documento. Brevemente, uno o más. de los residuos de CDR están mutados y los anticuerpos variantes se muestran en fagos y se rastrean para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Dichas alteraciones se pueden realizar en “puntos críticos” de CDR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179–196 (2008)), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, con la variante resultante VH o VL siendo analizada por afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante la construcción y la reelección de genotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178: 1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos aspectos de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, barajado de cadena o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Luego se crea una genoteca secundaria. La genoteca luego se rastrea para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir la diversidad implica enfoques dirigidos por CDR, en los que varios residuos de CDR (por ejemplo, 4–6 residuos a la vez) se asignan al azar. Los residuos de CDR implicados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, utilizando mutagénesis o modelado de rastreo de alanina. CDR–H3 y CDR–L3 en particular a menudo son objetivos.

En ciertos aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir dentro de una o más CDR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las CDR. En ciertas variantes de secuencias VH y VL proporcionadas anteriormente, cada CDR está inalterada o no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser objetivo de mutagénesis se denomina "mutagénesis de rastreo de alanina" como lo describen Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081–1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y reemplazan por un aminoácido neutro o negativamente cargado (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, se puede utilizar una estructura cristalina de un complejo antígeno–anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos vecinos pueden ser seleccionados o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden rastrear para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT (terapia de profármaco enzimático dirigido por anticuerpo)) o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en suero.

Variantes de glucosilación

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. La adición o eliminación de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede realizarse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o eliminen uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el oligosacárido unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente está unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15: 26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunos aspectos, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En un aspecto, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen un oligosacárido no fucosilado, es decir, una estructura de oligosacárido que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dicho oligosacárido no fucosilado (también denominado oligosacárido "afucosilado") es particularmente un oligosacárido unido a N que carece de un residuo de fucosa unido al primer GlcNAc en el tallo de la estructura de oligosacárido biantenarico. En un aspecto, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo nativo o principal. Por ejemplo, la proporción de oligosacáridos no fucosilados puede ser al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 80% o incluso aproximadamente 100% (es decir, no hay oligosacáridos fucosilados). El porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es la cantidad (promedio) de oligosacáridos que carece de residuos de fucosa, en relación con la suma de todos los oligosacáridos unidos a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa), medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2006/082515, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de residuos

de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse alrededor de ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichos anticuerpos que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc pueden tener una unión al receptor Fc γ RIIIa mejorada y/o una función efectora mejorada, en particular una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, US 2003/0157108; US 2004/0093621.

Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos con fucosilación reducida incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533–545 (1986); US 2003/0157108; y WO 2004/056312, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células inactivadas CHO (véase, por ejemplo, Yamane–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614–622 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4): 680–688 (2006); y WO 2003/085107), o células con actividad reducida o abolida de una proteína transportadora o síntesis de GDP–fucosa (véase, por ejemplo, US2004259150, US2005031613, US2004132140, US2004110282).

En un aspecto adicional, las variantes de anticuerpos se proporcionan con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en donde GlcNAc bisecciona un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada como se describió anteriormente. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, por ejemplo, en Umana et al., *Nat Biotechnol* 17, 176–180 (1999); Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93, 851–861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

Se puede preferir que el anticuerpo se modifique para reducir el grado de glicosilación. En algunas formas de realización, el anticuerpo puede estar aglicosilado o desglicosilado. El anticuerpo puede incluir una sustitución en N297, por ejemplo, N297D/A.

Variantes de la región Fc

En ciertas formas de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en este documento, generando así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas formas de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo con función efectora reducida, por ejemplo, unión CDC, ADCC y/o FcγR reducida o eliminada. En ciertos aspectos, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) son innecesarias o perjudiciales.

Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar las células ADCC, NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457–492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de los Estados Unidos N° 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5,821,337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y

células Natural Killer (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como se describe en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652–656 (1998). Los ensayos de unión a C1q también se pueden llevar a cabo para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad CDC Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano–Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045–1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). La unión a FcRn y las determinaciones de vida media/eliminación *in vivo* también se pueden realizar utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006); WO 2013/120929 A1).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de Estados Unidos N° 6.737.056), por ejemplo, P329G. Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (Patente de Estados Unidos N°. 7.332.581).

En ciertos aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que disminuyen la unión de FcγR, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 234 y 235 de la región Fc (numeración EU de residuos). En un aspecto, las sustituciones son L234A y L235A (LALA). En ciertos aspectos, la variante de anticuerpo comprende además D265A y/o P329G en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En un aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y P329G (LALA–PG) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, WO 2012/130831). En otro aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y D265A (LALA–DA) en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana.

En otras formas de realización, puede ser posible utilizar un subtipo de IgG con función efectora reducida tal como IgG4 o IgG2.

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591–6604 (2001).)

En algunas formas de realización, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida, de modo preferente disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

En ciertos aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, que reducen la unión de FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 253, y/o 310, y/o 435 de la región Fc (numeración EU de residuos). En ciertos aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 253, 310 y 435. En un aspecto, las sustituciones son I253A, H310A y H435A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. Véase, por ejemplo, Grevys, A., et al., *J. Immunol.* 194 (2015) 5497–5508.

En ciertos aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, que reducen la unión de FcRn, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 310, y/o 433, y/o 436 de la región Fc (numeración EU de residuos). En ciertos aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 310, 433 y 436. En un aspecto, las sustituciones son H310A, H433A e Y436A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. (Véase, por ejemplo, WO 2014/177460 A1). Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede utilizar la unión normal a FcRn.

Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322: 738–40 (1988); Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

El término C de una cadena pesada del anticuerpo de longitud completa como se informa en el presente documento puede ser un término C completo que termina con los residuos de aminoácidos PGK. El término C de la cadena pesada puede ser un término C acortado en donde se han eliminado uno o dos de los residuos de aminoácidos C terminales. El término C de la cadena pesada puede ser un término C acortado que termina PG. En un aspecto de todos los aspectos como se informa en este documento, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C-terminal, como se especifica en este documento, comprende un residuo de glicina C-terminal (G446, numeración de índice EU de posiciones de aminoácidos). Esto todavía se incluye

explícitamente con el término "anticuerpo de longitud completa" o "cadena pesada de longitud completa" como se utiliza en el presente documento.

Derivados de anticuerpos

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse en función de consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo se utilizará en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

J. Métodos y Composiciones Recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. En una forma de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado o un conjunto de ácidos nucleicos aislados que codifican un conjunto de anticuerpos descritos en el presente documento.

Por ejemplo, un conjunto de ácidos nucleicos puede comprender los siguientes ácidos nucleicos que codifican el primer anticuerpo:

i) un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada del primer anticuerpo, en donde dicha primera cadena pesada comprende una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo, fusionado a través de su extremo C a un polipéptido que comprende un dominio VH de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado;

ii) un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada del primer anticuerpo, en donde dicha segunda cadena pesada comprende una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo y no comprende un dominio VL de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado (opcionalmente, la segunda cadena pesada consiste en la cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo);

iii) un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del primer anticuerpo.

Un conjunto de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención puede comprender adicional o alternativamente los siguientes ácidos nucleicos que codifican el segundo anticuerpo:

iv) un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada del segundo anticuerpo, en donde dicha primera cadena pesada comprende una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo, fusionado a través de su extremo C a un polipéptido que comprende un dominio VL de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado;

v) un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada del segundo anticuerpo, en donde dicha segunda cadena pesada comprende una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo y no comprende un dominio VH de un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado (opcionalmente, la segunda cadena pesada consiste en la cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al antígeno objetivo);

vi) un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del segundo anticuerpo.

En algunas formas de realización, algunos de estos ácidos nucleicos pueden ser iguales entre sí. Por ejemplo, el ácido nucleico en (iii) puede ser el mismo que en (vi), de modo que el conjunto general comprende solo 5 secuencias distintas de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en una o más moléculas de ácido nucleico o vectores de expresión.

Por lo tanto, en una forma de realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dichos ácidos nucleicos. En una forma de realización, cada cadena pesada y ligera respectiva se expresa a partir de un plásmido individual.

En una forma de realización adicional, se proporciona una célula huésped o un conjunto de células huésped que comprenden dicho o dichos ácidos nucleicos o vectores. En una forma de realización, se proporciona una primera célula huésped que expresa el primer anticuerpo, y se proporciona una segunda célula huésped que expresa el segundo anticuerpo.

En una de tales formas de realización, una primera célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende ácidos nucleicos (i)–(iii) anteriores, o (2) un primer vector que comprende ácido nucleico (i), un segundo vector que comprende ácido nucleico (ii) y un tercer vector que comprende ácido nucleico (iii); o (3) dos vectores que comprenden colectivamente los ácidos nucleicos (i)–(iii) anteriores. Una segunda célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende ácidos nucleicos (iv)–(vi) anteriores, o (2) un primer vector que comprende ácido nucleico (iv), un segundo vector que comprende nucleico ácido (v) y un tercer vector que comprende ácido nucleico (vi); o (3) dos vectores que colectivamente comprenden los ácidos nucleicos (iv)–(vi) anteriores.

En una forma de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, células Y0, NS0, Sp20). En una forma de realización, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo de acuerdo con la invención, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describió anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos

convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesita la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, KA, In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, BKC (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245–254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, como los hongos filamentosos o la levadura, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, incluidos los hongos y las cepas de levadura cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que resulta en la producción de un anticuerpo con patrón de glucosilación parcialmente o completamente humano. Véase Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409–1414; y Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210–215.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos (glicosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden utilizar junto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIESTM para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden utilizar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos que están adaptadas para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59–74); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de sertoli de

ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243–252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO–76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather, JP et al., Annals NY Acad. Sci. 383 (1982) 44–68); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células DHFR–CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216–4220), y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, AM, Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, BKC (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255–268.

En un aspecto, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

K. Ensayos

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden identificarse, rastrearse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, Western blot, etc.

Afinidad de anticuerpos

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en este documento tiene una constante de disociación (K_d) para el antígeno objetivo de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M), o como se indica en el presente documento

En ciertas formas de realización, un sitio de unión a antígeno para el compuesto radiomarcado tiene una constante de disociación (K_d) para el compuesto radiomarcado de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-

⁸ M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas formas de realización, el Kd es 1 nM o menos, 500pM o menos, 200pM o menos, 100pM o menos, 50pM o menos, 20pM o menos, 10pM o menos, 5pM o menos o 1pM o menos, o como se indica en el presente documento. Por ejemplo, el sitio de unión funcional puede unir el compuesto radiomarcado/quelato metálico con una Kd de aproximadamente 1pM–1nM, por ejemplo, aproximadamente 1–10 pM, 1–100pM, 5–50 pM, 100–500 pM o 500pM–1 nM.

En una forma de realización, Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En una forma de realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de la solución de Fabs por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865–881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de múltiples pocillos MICROTITER[®] (Thermo Scientific) se recubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc # 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM [^{125}I]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57: 4593–4599 (1997)). El Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar por un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se retira la solución y la placa se lava ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20[®]) en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20[™]; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual al 20% de la unión máxima se eligen para utilizar en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra forma de realización, Kd se mide utilizando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE[®]. Por ejemplo, un ensayo utilizando un

BIACORE[®]-2000 o BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25°C con chips de antígeno inmovilizado CM5 a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En una forma de realización, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20TM) al 0,05% (PBST) a 25°C en un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (Software de evaluación BIACORE[®] versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865–881 (1999). Si la tasa de encendido excede 10^6 M⁻¹ s⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de encendido puede determinarse utilizando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm ; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, como un espectrofotómetro equipado para detener el flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCOTM serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

En otra forma de realización, K_d se mide utilizando un ensayo SET (titulación de equilibrio de solución). De acuerdo con este ensayo, los anticuerpos de prueba se aplican típicamente en una concentración constante y se mezclan con diluciones en serie del antígeno de prueba. Después de la incubación para establecer un equilibrio, la porción de anticuerpos libres se captura en una superficie recubierta de antígeno y se detecta con anticuerpos anti-especies marcados/etiquetados, generalmente utilizando electroquímiluminiscencia (por ejemplo, como se describe en Haenel *et al.* *Analytical Biochemistry* 339 (2005) 182– 184).

Por ejemplo, en una forma de realización, se incuban placas de estreptavidina de 384 pocillos (Nunc, Microcoat # 11974998001) durante la noche a 4°C con 25 µl/pocillo de una mezcla de antígeno–biotina–isómero en buffer PBS a una concentración de 20 ng/ml. Para el equilibrio de las muestras de anticuerpos con antígeno libre: 0,01 nM – 1 nM de anticuerpo se titula con el antígeno relevante en etapas de dilución 1: 3, 1: 2 o 1: 1,7 comenzando a una concentración de 2500 nM, 500 nM o 100 nM de antígeno. Las muestras se incuban a 4°C durante la noche en microplacas de polipropileno de almacenamiento REMP selladas (Brooks). Después de la incubación durante la noche, las placas de estreptavidina se lavan 3 veces con 90 µl de PBST por pocillo. Se transfieren 15 µl de cada muestra de la placa de equilibrio a la placa de ensayo y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3x 90 µl de pasos de lavado con buffer PBST. La detección se lleva a cabo agregando 25 µl de un conjugado POD–anticuerpo IgG anti–humana de cabra (Jackson, 109–036–088, 1: 4000 en OSEP), seguido de 6x 90 µl de lavado con buffer PBST. Se agregan a cada pocillo 25 µl de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No.: 11835033001). La medición se realiza a 370/492 nm en un lector Safire2 (Tecan).

En otra forma de realización, Kd se mide utilizando un ensayo KinExA (exclusión cinética). De acuerdo con este ensayo, el antígeno se titula típicamente en una concentración constante de sitios de unión de anticuerpos, se permite que las muestras se equilibren y luego se extraen rápidamente a través de una celda de flujo donde los sitios de unión de anticuerpos libres se capturan en perlas recubiertas de antígeno, mientras que el complejo de antígeno–anticuerpo saturado se elimina por lavado. El anticuerpo capturado con perlas se detecta luego con un anticuerpo anti–especies marcado, por ejemplo, marcado con fluorescencia (Bee *et al.* PloS One, 2012; 7 (4): e36261). Por ejemplo, en una forma de realización, los experimentos KinExA se realizan a temperatura ambiente (RT) utilizando PBS pH 7,4 como buffer de ejecución. Las muestras se preparan en buffer en ejecución suplementado con 1 mg/ml de BSA ("buffer de muestra"). Se utiliza un caudal de 0,25 ml/min. Una cantidad constante de anticuerpo con concentración de sitio de unión de 5 pM se titula con antígeno mediante dilución en serie doble comenzando a 100 pM (rango de concentración 0,049 pM – 100 pM). Una muestra de anticuerpo sin antígeno sirve como señal al 100% (es decir, sin inhibición). Los complejos antígeno–anticuerpo se incuban a temperatura ambiente durante al menos 24 h para permitir alcanzar el equilibrio. Luego, las mezclas equilibradas se extraen a través de una columna de perlas acopladas a

antígeno en el sistema KinExA a un volumen de 5 ml, lo que permite que las perlas capturen el anticuerpo no unido sin perturbar el estado de equilibrio de la solución. El anticuerpo capturado se detecta utilizando 250 ng/ml de anticuerpo secundario específico de fragmento Fc antihumano conjugado con Dylight 650 © en buffer de muestra. Cada muestra se mide por duplicado para todos los experimentos de equilibrio. La KD se obtiene del análisis de regresión no lineal de los datos utilizando un modelo de unión homogéneo de un sitio contenido en el software KinExA (Versión 4.0.11) utilizando el método de "análisis estándar".

L. Métodos Terapéuticos y Composiciones

El conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento se puede utilizar en métodos terapéuticos. En un aspecto, se proporciona un conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento para su uso como medicamento. En ciertos aspectos, se proporciona un conjunto de anticuerpos para utilizar en un método de tratamiento.

Como se discutió anteriormente, en algunos aspectos, los conjuntos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención son adecuados para cualquier tratamiento en donde se desee administrar un radionúclido a una célula objetivo en un sujeto. Por ejemplo, se proporciona un conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento para su uso en un método de radioinmunoterapia dirigida previamente, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer.

En ciertos aspectos, la invención proporciona el conjunto de anticuerpos para su uso en un método de radioinmunoterapia dirigida previamente en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del conjunto de anticuerpos. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores es de modo preferente un ser humano.

Como se señaló anteriormente, el tratamiento puede ser de cualquier afección que sea tratable por la actividad citotóxica dirigida a las células enfermas del paciente. El tratamiento es de modo preferente de un tumor o cáncer. Sin embargo, la aplicabilidad de la invención no se limita a tumores y cánceres. Por ejemplo, el tratamiento también puede ser de infección viral o infección por otro organismo patógeno, por ejemplo, un procarionota. Opcionalmente, el direccionamiento también puede ser a las células T para el tratamiento de la enfermedad autoinmune dirigida por las células T o los cánceres de sangre de las

células T. Por lo tanto, las afecciones a tratar pueden incluir infecciones virales como VIH, rabia, EBV y el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y los fármacos contra la enfermedad del injerto versus el huésped.

El término "cáncer", como se utiliza en el presente documento, incluye cánceres sólidos y hematológicos, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, incluyendo adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, que puede ser cáncer de colon y/o cáncer de recto, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluidas las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, las versiones experimentadas de inhibidor de punto de control de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Un método para dirigir un radioisótopo a una célula, tejido u órgano para terapia puede comprender:

i) administrar al sujeto un primer y un segundo anticuerpo como se describe en el presente documento (simultánea o secuencialmente, en cualquier orden), en donde los anticuerpos se unen al antígeno objetivo y se localizan en la superficie de una célula que expresa el antígeno objetivo; y en donde la asociación del primer y segundo anticuerpo forma un sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado;

y

ii) administrar posteriormente un compuesto radiomarcado, en donde el compuesto radiomarcado se une al sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado.

El compuesto radiomarcado se marca con un radioisótopo que es citotóxico para las células. Los radioisótopos adecuados incluyen emisores alfa y beta como se trató anteriormente.

En los métodos de radioinmunoterapia pre-dirigida que hacen uso de un anticuerpo biespecífico (es decir, no un anticuerpo "dividido" de acuerdo con la presente invención) es una práctica común administrar un agente de eliminación o un agente bloqueante, entre la administración del anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado. Los agentes de eliminación se unen a los anticuerpos y mejoran su tasa de eliminación del cuerpo. Incluyen anticuerpos anti-idiotipo. Los agentes de bloqueo son típicamente agentes que se unen al sitio de unión al antígeno para el compuesto radiomarcado, pero que no están radiomarcados. Por ejemplo, cuando el compuesto radiomarcado comprende un quelante cargado con un radioisótopo de un determinado elemento químico (por ejemplo, un metal), el agente de bloqueo puede comprender el mismo quelante cargado con un isótopo no radiactivo del mismo elemento (por ejemplo, metal), o puede comprender un quelante no cargado o un quelante cargado con un resto no radiactivo diferente (por ejemplo, un isótopo no radiactivo de un elemento diferente), siempre que pueda estar unido por el sitio de unión al antígeno. En algunos casos, el agente de bloqueo puede comprender adicionalmente un resto que aumenta el tamaño y/o el radio hidrodinámico de la molécula. Estos obstaculizan la capacidad de la molécula para acceder al tumor, sin interferir con la capacidad de la molécula para unirse al anticuerpo en la circulación. Los restos ejemplares incluyen polímeros hidrófilos. El resto puede ser un polímero o copolímero, por ejemplo, de dextrano, dextrina, PEG, ácidos polisálicos (PSA), ácido hialurónico, hidroxietil-almidón (HES) o poli(2-etil 2-oxazolina) (PEOZ). En otras formas de realización, el resto puede ser un péptido o proteína no estructurado tal como polipéptidos XTEN (polímeros de proteínas hidrófilas no estructuradas), polímero de homo-aminoácidos (HAP), polímero de prolina-alanina-serina (PAS), péptido similar a elastina (ELP), o proteína similar a la gelatina (GLK). Los restos ejemplares adicionales incluyen proteínas tales como albúmina, por ejemplo, albúmina de suero bovino o IgG. Los pesos moleculares adecuados para los restos/polímeros pueden estar en el intervalo, por ejemplo, de al menos 50 kDa, por ejemplo entre 50 kDa y 2000 kDa. Por ejemplo, el peso molecular puede ser 200–800kDa, opcionalmente mayor que 300, 350, 400 o 450

kDa, y opcionalmente menor que 700, 650, 600 o 550kDa, opcionalmente aproximadamente 500kDa.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención, no hay ninguna etapa de administrar un agente de eliminación o un agente de bloqueo al sujeto. En ciertos aspectos, no hay paso de administrar ningún agente que se una al primer o segundo anticuerpo, entre la administración de los anticuerpos y la administración del compuesto radiomarcado. En ciertos aspectos, no hay ninguna etapa de administrar ningún agente entre la administración de los anticuerpos y el compuesto radiomarcado, excepto opcionalmente un compuesto seleccionado de un agente quimioterapéutico, inmunoterapéutico y un radiosensibilizador. En algunas formas de realización, no se administra ningún agente entre la administración de los anticuerpos y la administración del compuesto radiomarcado. En algunas formas de realización, puede no haber inyección o infusión de ningún otro agente al sujeto, entre la administración del anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, el método puede ser un método de dos pasos de radioinmunoterapia pre-dirigida que consiste o consiste esencialmente en los pasos de i) administrar el conjunto de anticuerpos (en donde el primer y segundo anticuerpo pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden) y ii) posteriormente administrar el compuesto radiomarcado. El tratamiento puede implicar múltiples ciclos de dicha terapia, es decir, múltiples ciclos de estos dos pasos. Una duración del ciclo de tratamiento ejemplar es de 28 días, en los que el conjunto de anticuerpos se administra el día 1 del ciclo, y el compuesto radiomarcado se administra opcionalmente el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 del ciclo, por ejemplo, el día 7. El número de ciclos terapéuticos puede variar. En una forma de realización, puede haber 4, 5 o 6 ciclos de tratamiento.

Los presentes inventores han determinado sorprendentemente que utilizando anticuerpos de acuerdo con la invención, es posible obtener una absorción terapéuticamente efectiva del compuesto radiomarcado en el tumor, mientras se evita la acumulación excesiva de radioactividad en tejidos normales. De hecho, en los ejemplos, se encontró que el nivel de acumulación de radiactividad en los tejidos no objetivo era más bajo que en un método PRIT de tres pasos, que utilizaba anticuerpos biespecíficos y un paso de eliminación, al tiempo que hacía uso de un procedimiento más simple.

En algunas formas de realización, el compuesto radiomarcado se puede administrar al sujeto una vez que el primer y segundo anticuerpo han recibido un período de tiempo

adecuado para localizar las células objetivo. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el compuesto radiomarcado se puede administrar al sujeto inmediatamente después del primer y segundo anticuerpo o al menos 4 horas, 8 horas, 1 día o 2 días, después del primer y segundo anticuerpo. Opcionalmente, puede administrarse no más de 3 días, 5 días o 7 días después del primer y segundo anticuerpo. En una forma de realización particular, el compuesto radiomarcado puede administrarse al sujeto de 2 a 7 días después del primer y segundo anticuerpo.

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en este documento se pueden administrar como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, se pueden administrar en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos: el agente quimioterapéutico y el anticuerpo pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden. Adicionalmente o alternativamente, pueden administrarse en combinación con uno o más inmunoterapéuticos: el agente inmunoterapéutico y el anticuerpo pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden.

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse adicional o alternativamente en combinación con radiosensibilizadores. El radiosensibilizador y el anticuerpo pueden administrarse simultánea o secuencialmente, en cualquier orden.

Los anticuerpos de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional, por ejemplo, el compuesto radiomarcado) se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas.

En algunas formas de realización, se pueden utilizar uno o más ciclos de dosimetría antes de uno o más ciclos de tratamiento como se describe anteriormente. Un ciclo de dosimetría puede comprender los pasos de i) administrar el conjunto de anticuerpos (en donde el primer y segundo anticuerpo pueden administrarse simultánea o secuencialmente en cualquier orden) y ii) administrar posteriormente un compuesto adecuado para la formación de imágenes radiomarcadas con un emisor gamma (en donde dicho compuesto radiomarcado se une al sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado). El

compuesto puede ser el mismo que el compuesto utilizado en los ciclos de tratamiento posteriores, excepto que está marcado con un emisor gamma en lugar de un emisor alfa o beta. Por ejemplo, en una forma de realización, el compuesto radiomarcado utilizado en el ciclo de dosimetría puede ser ^{203}Pb -DOTAM y el compuesto radiomarcado utilizado en el ciclo de tratamiento puede ser ^{212}Pb -DOTAM. El paciente puede estar sometido a imágenes para determinar la absorción del compuesto en el tumor y/o estimar la dosis absorbida del compuesto. Esta información se puede utilizar para estimar la exposición a la radiación esperada en los pasos de tratamiento posteriores y para ajustar la dosis del compuesto radiomarcado utilizado en los pasos de tratamiento a un nivel seguro.

M. Formulaciones Farmacéuticas

El primer y segundo anticuerpo descritos en el presente documento pueden formularse en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el primer y segundo anticuerpos de la invención, o una primera formulación farmacéutica que comprende el primer anticuerpo de la invención y una segunda composición farmacéutica que comprende el segundo anticuerpo de la invención, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos o de diagnóstico descritos en este documento. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Las formulaciones farmacéuticas de anticuerpos como se describe en el presente documento pueden prepararse mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: buffers tales como histidina, fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil

parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones iónicos formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Halozyme, Inc.). Ciertos sHASEGP y métodos de uso ejemplares, incluido rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nos. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Ejemplos de composiciones de anticuerpos liofilizados se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.267.958. Las composiciones acuosas de anticuerpos incluyen las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.171.586 y WO 2006/044908, las últimas composiciones incluyen un buffer de histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, de modo preferente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos y/o radiosensibilizadores como se trató anteriormente. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y

nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en la 16ª edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Osol, A. Ed. (1980)

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

N. Métodos y Composiciones para Diagnóstico y Detección

El conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento también se puede utilizar en métodos de diagnóstico o formación de imágenes, de modo preferente métodos de o que comprenden radioinmunoimagen pre-dirigida. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico e imagen. Además, proporciona el uso del conjunto de anticuerpos en un método de obtención de imágenes como se describe en el presente documento, y un conjunto de anticuerpos como se describe en el presente documento (es decir, el primer y segundo anticuerpo como se describe en el presente documento) para utilizar en un método de diagnóstico realizado sobre un sujeto, por ejemplo, en el cuerpo humano o animal.

Los métodos de obtención de imágenes son adecuados para obtener imágenes de la presencia y/o distribución del antígeno objetivo en el cuerpo. Por ejemplo, el método puede ser un método de obtención de imágenes de células que expresan un antígeno asociado con una enfermedad, como cualquiera de las afecciones de la enfermedad tratadas anteriormente. Opcionalmente, el método es para obtener imágenes de tumores o cáncer. El método puede ser con el propósito de diagnosticar a un sujeto sospechoso de tener un trastorno proliferativo como el cáncer o una enfermedad infecciosa.

En algunas formas de realización, puede preferirse que el sujeto sea un ser humano.

Un método para dirigir un radioisótopo a un tejido u órgano para obtener imágenes o diagnóstico puede comprender:

i) administrar al sujeto un primer y un segundo anticuerpo como se describe en este documento (simultánea o secuencialmente, en cualquier orden), en donde los anticuerpos

se unen a un antígeno objetivo y se localizan en la superficie de una célula que expresa el antígeno objetivo, en donde la asociación del primer y segundo anticuerpo forman un sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado;

y

ii) administrar posteriormente un compuesto radiomarcado, en donde el compuesto radiomarcado se une al sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado.

Opcionalmente, el método puede comprender además:

iii) obtener imágenes del tejido u órgano donde el compuesto radiomarcado se ha localizado, o se espera que esté localizado.

Opcionalmente, el método puede comprender además uno o más pasos para formar un diagnóstico, entregar un diagnóstico al sujeto y/o determinar y/o administrar un tratamiento adecuado en base al diagnóstico.

En otra forma de realización, un método de la invención puede comprender la obtención de imágenes de un tejido u órgano de un sujeto, en donde el sujeto se ha administrado previamente con:

i) un primer y un segundo anticuerpo como se describe en este documento (simultánea o secuencialmente, en cualquier orden), en donde los anticuerpos se unen a un antígeno objetivo y se localizan en la superficie de una célula que expresa el antígeno objetivo, y en donde la asociación del primer y segundo el anticuerpo forma un sitio de unión funcional para el compuesto radiomarcado; y

ii) un compuesto radiomarcado, en donde el compuesto radiomarcado se une al sitio de unión al antígeno para dicho compuesto radiomarcado formado por asociación del primer y segundo anticuerpo.

En los métodos de formación de imágenes y/o diagnóstico descritos en este documento, el compuesto radiomarcado se marca con un radioisótopo que es adecuado para la obtención de imágenes. Los radioisótopos adecuados incluyen emisores gamma como se trató anteriormente.

En los métodos convencionales de radioimagen pre-dirigida, es una práctica común administrar un agente de eliminación o bloqueo entre la administración del anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado, por ejemplo, un agente de eliminación o bloqueo como se describió anteriormente.

En ciertas formas de realización de la presente invención, no hay etapa de administrar un agente de eliminación o un agente de bloqueo. En ciertos aspectos, no hay

paso de administrar ningún agente que se una al primer o segundo anticuerpo, entre la administración de los anticuerpos y la administración del compuesto radiomarcado. En ciertos aspectos, no hay paso de administrar ningún agente entre la administración de los anticuerpos y el compuesto radiomarcado, excepto opcionalmente un compuesto seleccionado de un agente quimioterapéutico, agente inmunoterapéutico y un radiosensibilizador. En algunas formas de realización, no se administra ningún agente entre la administración de los anticuerpos y la administración del compuesto radiomarcado. En algunas formas de realización, puede no haber inyección o infusión de ningún otro agente al sujeto, entre la administración del anticuerpo y la administración del compuesto radiomarcado.

En algunas formas de realización, el compuesto radiomarcado puede administrarse al sujeto una vez que el primer y segundo anticuerpo han recibido un período de tiempo adecuado para localizar las células objetivo. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el compuesto radiomarcado puede administrarse al sujeto inmediatamente después del primer y segundo anticuerpo o al menos 4 horas, 8 horas, 1 día o 2 días después del primer y segundo anticuerpo. Opcionalmente, puede administrarse no más de 3 días, 5 días o 7 días después del primer y segundo anticuerpo. En una forma de realización particular, el compuesto radiomarcado puede administrarse al sujeto de 2 a 7 días después del primer y segundo anticuerpo.

En algunas formas de realización, el método de obtención de imágenes puede ser un método de radioimagen pre-dirigida que consiste o consiste esencialmente en los pasos de i) administrar el conjunto de anticuerpos (en donde el primer y segundo anticuerpo pueden administrarse simultánea o secuencialmente en cualquier orden) ii) administrar posteriormente el compuesto radiomarcado y iii) formar imágenes del tejido u órgano de interés. Un método de diagnóstico puede consistir o consistir esencialmente en dichos pasos seguidos de los pasos de formar un diagnóstico, que luego puede entregarse al paciente y puede usarse como la base para seleccionar y/o administrar un régimen de tratamiento.

El antígeno objetivo puede ser cualquier antígeno objetivo como se trata en el presente documento. En algunas formas de realización, el antígeno objetivo puede ser un antígeno específico de tumor como se trató anteriormente, y la obtención de imágenes puede ser un método de obtención de imágenes de un tumor o tumores. Puede saberse o se sospecha que el individuo tiene un tumor.

Por ejemplo, el método puede ser un método de obtención de imágenes de tumores en un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalviolares, cáncer de hueso, cáncer de páncreas incluyendo PDAC, cáncer de piel, cáncer la cabeza o el cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal que puede ser cáncer rectal y/o cáncer de colon, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de trompas de falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de pituitaria y sarcoma de Ewings, incluidas las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o las versiones experimentadas de inhibidores de punto de control de cualquiera de estos cánceres, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

III. SECUENCIAS

SEC. ID. NO	Descripción	Secuencia
1	CDR1 de cadena pesada, <Pb–Dotam>	gfslstysms
2	CDR2 de cadena pesada <Pb–Dotam>	figsrgdtyyaswakg
3	CDR3 de cadena pesada <Pb–Dotam>	erdpygggaypphl
4	CDR1 de cadena ligera, <Pb–Dotam>	qsshsvysdndla
5	CDR2 de cadena ligera <Pb–Dotam>	qasklas
6	CDR3 de cadena ligera <Pb–Dotam>	lggyddesdyg
7	Dominio variable de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0213	vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsgdtyyas wakgrltisk dtsksqvlt mtnmdpvda tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvts s
8	Dominio variable de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0213	iqmtqspssl sasvgrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapkliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
9	Dominio variable de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0214	vqlqqwgagl lkpsetlsl cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaada vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvts s
10	Dominio variable de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0214	iqmtqspssl sasvgrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapkliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
11	CDR1 de cadena pesada <CEA> T84.66	GFNIKDTYMH
12	CDR2 de cadena pesada <CEA> T84.66	RIDPANGNSKYVPKFQG
13	CDR3 de cadena pesada <CEA> T84.66	FGYYVSDYAMAY
14	CDR1 de cadena ligera <CEA> T84.66	RAGESVDIFGVGLH

15	CDR2 de cadena ligera <CEA> T84.66	RASNRAT
16	CDR3 de cadena ligera <CEA> T84.66	QQTNEDPYT
17	Dominio variable de cadena pesada <CEA> T84.66	qvqlvqsgaevkkpgssvkvscasgfnikdtymhvwrqapgglewm gridpangnskyvpkfqgrvtitadtststaymelsslrstedtavyycapfgy yvsdyamaywgqgtltvtss
18	Dominio variable de cadena ligera <CEA> T84.66	eivltqspatlspsgeratls cragesvdifvgvflhwyqqkpgqaprlliya snratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqqtndpytfgqgkcleik
19	CDR1 de cadena pesada <CEA> CH1A1A	GYTFTEFGMN
20	CDR2 de cadena pesada <CEA> CH1A1A	WINTKTGEATYVEEFKG
21	CDR3 de cadena pesada <CEA> CH1A1A	WDFAYYVEAMDY
22	CDR1 de cadena ligera <CEA> CH1A1A	KASAAVGTYVA
23	CDR2 de cadena ligera <CEA> CH1A1A	SASYRKR
24	CDR3 de cadena ligera <CEA> CH1A1A	HQYYTYPLFT
25	Dominio variable de cadena pesada <CEA> CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
26	Dominio variable de cadena ligera <CEA> CH1A1A	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTYVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKL EIK
27	Cadena pesada <CEA> de P1AD8749 sin ligador y <DOTAM– VH>→ Mismo plásmido que SeqID32, sin ligador y <DOTAM>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP

		SSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
28	P1AD8749 Ojal de cadena pesada <CEA> CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
29	Cadena pesada <CEA> de P1AD8592 sin ligador y <DOTAM– VL>→ Mismo plásmido que SeqID33, sin ligador y <DOTAM>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

		PEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
30	PIAD8592 Botón de cadena pesada <CEA>CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
31	Ligador	GGGGSGGGSGGGGSGGGGS
32	PIAD8749 Botón de cadena pesada <CEA>CH1A1A<Dotam-VH>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL

		YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG <u>GGGGS</u> GGGGS <u>GGGGS</u> GGGGSVTLKES GPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGK ALEWLGFISRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQ VVLTMNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPH LWGRGTLVTVSS
33	PIAD8592 Ojal de cadena pesada <CEA>CH1A1A<Dotam-VL>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG <u>GGGGS</u> GGGGS <u>GGGGS</u> GGGGSIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKP GKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLGGYDDSDTYGFGGGTKVEIK
34	PIAD8749 y PIAD8592 cadena ligera <CEA> CH1A1A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVA WYQQKPGKAPKLLIYS ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCHQYYTYPLFTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
35	CDR 1 de Cadena pesada, <C825>	DYGVH
36	CDR 2 de Cadena pesada, <C825>	VIWSGGGTAYNTALIS
37	CDR 3 de Cadena pesada, <C825>	RGSYPNYFDA
38	CDR 1 de Cadena ligera, <C825>	GSSTGAVTASNAN

39	CDR 2 de Cadena ligera, <C825>	GHNNRPP
40	CDR 3 de Cadena ligera, <C825>	ALWYSDHWV
41	Dominio variable de cadena pesada <C825>	HVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVH WVRQSPGKGLEWLGVWSSGGGTAYNTALISRLNI YRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYP YNYFDAWGQGTTVTVSS
42	Dominio variable de cadena ligera, <C825>	QAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYA NWVQEKPDLFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIG DKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGT KLTVL
43	CDR1 de cadena pesada <CEA> A5B7	DYYMN
44	CDR2 de cadena pesada <CEA> A5B7	FIGNKANAYTTEYSASVKG
45	CDR3 de cadena pesada <CEA> A5B7	DRGLRFYFDY
46	CDR1 de cadena ligera <CEA> A5B7	RASSSVTYIH
47	CDR2 de cadena ligera <CEA> A5B7	ATSNLAS
48	CDR3 de cadena ligera <CEA> A5B7	QHWSSKPPT
49	Dominio variable de cadena pesada <CEA> A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
50	Dominio variable de cadena ligera <CEA> A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQ QKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
51	P1AE4956 Ojal de cadena pesada <CEA> A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

		NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFPY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
52	PIAE4956 Botón de cadena pesada <CEA> A5B7 <Dotam-VH>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS <u>SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u> VTLKESGP VLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKA LEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQV VLTMTNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHL WGRGTLTVSS
53	Cadena pesada <CEA> de PIAE4956 sin ligador y DOTAM- VH> →Mismo plásmido que SeqID 52, sin ligador y <DOTAM>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA

		KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSP
54	PIAE4956 cadena ligera <CEA> A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWFYQ QKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
55	PIAE4957 Botón de cadena pesada <CEA> A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
56	PIAE4957 Ojal de cadena pesada <CEA> A5B7 <Dotam-VL>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP

		SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSP <u>GGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u> SIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGK APKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
57	Cadena pesada <CEA> de P1AE4957 sin ligador y DOTAM-VL> → Mismo Plásmido que SeqID 56, sin ligador y <DOTAM>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYM NWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVK GRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRD RGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSP
58	P1AE4957 cadena ligera <CEA> A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWWYQ QKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTL TLISKADYEKKHVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
59	CDR1 de cadena pesada <CEA> 28A9	GGTFSYYAIS
60	CDR2 de cadena pesada <CEA> 28A9	GILPAFGAANYAQKFQG
61	CDR3 de cadena pesada <CEA> 28A9	LPPLPGAGLDY
62	CDR1 de cadena ligera <CEA> 28A9	RASQSISSWLA
63	CDR2 de cadena ligera <CEA>	DASSLES

	28A9	
64	CDR3 de cadena ligera <CEA> 28A9	QQNTQYPMT
65	Dominio variable de cadena pesada <CEA> 28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP GAGLDYWGGQTTVTVSS
66	Dominio variable de cadena ligera <CEA> 28A9	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEI K
67	CDR1 de cadena pesada <GPRC5D>	GFTFSKYAMA
68	CDR2 de cadena pesada <GPRC5D>	SISTGGVNTYYADSVKG
69	CDR3 de cadena pesada <GPRC5D>	HTGDYFDY
70	CDR1 de cadena ligera <GPRC5D>	RASQSVSISGINLMN
71	CDR2 de cadena ligera <GPRC5D>	HASILAS
72	CDR3 de cadena ligera <GPRC5D>	QQTRESPLT
73	Dominio variable de cadena pesada <GPRC5D>	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAM AWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHG DYFDYWGGQTMVTVSS
74	Dominio variable de cadena ligera <GPRC5D>	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLM NWYQQKPGQPKLLIYHASILASGIPDRFGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRL EIK
75	CDR1 de cadena pesada <FAP> 4B9	GFTFSSYAMS
76	CDR2 de cadena pesada <FAP> 4B9	AIIGSGASTYYADSVKG
77	CDR3 de cadena pesada <FAP> 4B9	GWFGGFNY
78	CDR1 de cadena ligera <FAP> 4B9	RASQSVTSSYLA
79	CDR2 de cadena ligera <FAP> 4B9	VGSRRAT
80	CDR3 de cadena ligera <FAP> 4B9	QQGIMLPPT
81	Dominio variable de cadena pesada	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS

	<FAP> 4B9	WVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGG FNYWGQGLTVTVSS
82	Dominio variable de cadena ligera <FAP> 4B9	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEI K
83	PIAF0709 HCbotón <CEA> T84.66 (D1AE4688)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
84	PIAF0709 HCojal <CEA> T84.66 Dotam-VL (D1AA4920)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQSSHVSYSNDLAWYQQKPGKAP

		KLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
85	PIAF0709 HCojal <CEA> T84.66 sin ligador y DOTAM	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
86	PIAF0298 HCojal <CEA> T84.66 (D1AE4687)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
87	PIAF0298 HCbotón <CEA> T84.66 Dotam– VH–AST (D1AE3668)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

		NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSVTLKESGPV LVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALE WLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL TMTNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWG RGT LVT VSSAST
88	PIAF0298 HCbotón <CEA> T84.66 sin ligador y DOTAM	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
89	PIAF0709 y PIAF0298 cadena ligera (D1AA4120)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQAPRLLIYASNATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQTNEPTYFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
90	PIAF0710 HCbotón <CEA> 28A9 (D1AE4690)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP

		GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
91	PIAF0710 HCojal <CEA> 28A9 Dotam-VL (D1AC3172)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLI YQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
92	PIAF0710 HCojal <CEA> 28A9 sin ligador o DOTAM	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

		LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
93	PIAF0711 HCojal <CEA> 28A9 (D1AE4689)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
94	PIAF0711 HCbotón <CEA> 28A9 Dotam-VH- AST (D1AE3671)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLP GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSVTLKESGPVLVKPT ETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFI GSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMNTM DPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLV TVSSAST
95	PIAF0711	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAIS

	HCbotón <CEA> 28A9 sin ligador y DOTAM	WVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARLPPLP GAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	PIAF0710 y PIAF0711 cadena ligera (D1AA2299)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN R GEC
97	PIAF0712 HCbotón <CEA> CH1A1A (D1AC4023)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
98	PIAF0712 HCojal <CEA> CH1A1A DOTA-VL (D1AE4684)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF

		AYYVEAMDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSQAVVIQES ALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKP DHLFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIA GTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTKLTVL
99	P1AF0712 HCojal <CEA> sin ligador o DOTA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
100	P1AF0713 HCojal <CEA> CH1A1A (D1AC4022)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED

		PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
101	P1AF0713 HCbotón <CEA> CH1A1A DOTA-VH-AST (D1AE3670)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHVKLQES GPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKN QVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAW GQGTTVTVSSAST
102	P1AF0713 HCbotón <CEA> CH1A1A sin ligador y DOTA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL

		YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
103	P1AF0712 y P1AF0713 cadena ligera (D1AA3384)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYYVA WYQQKPGKAPKLLIYSASVSRKRGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
104	P1AF8284 y P1AF8285 HCbotón <GPRC5D> (D1AF6517)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAM AWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTG DYFDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	P1AF8284 HCojal Dotam-VL (D1AG3592)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGG GSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQSSHSV YSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDDESD TYGFGGGTKVEIK
106	P1AF8285 H ojal Dotam-VHA (D1AG3591)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

		VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGG GSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL TYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAK GRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARE RDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA
107	P1AF8284 y P1AF8285 cadena ligera (D1AF6469)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSISGINLM NWYQQKPGQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
108	P1AF8286 y P1AF8287 HCbotón <FAP> 4B9 (D1AF6515)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGG FNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	P1AF8286 HCojal Dotam-VL (D1AG3592)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGG GSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHVS

		YSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESD TYGFGGGTKVEIK
110	P1AF8287 HCojal Dotam–VHA (D1AG3591)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGG GSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL TYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAK GRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYYCARE RDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA
111	P1AF8286 y P1AF8287 cadena ligera (D1AB9974)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
112	P1AF7782 y P1AF7784 HCojal Dotam–VL <CEA> CH1A1A (D1AD3419)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGM NWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGR VTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDF AYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
113	P1AF7782 HCojal Dotam–VL	SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHVSVDNDLA

	(D1AG2237)	WYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGG TKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
114	P1AF7784 HCojal Dotam–VH (D1AG2236)	GVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMS WIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTIS KDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARERDPYG GGAYPPHLWGRGTLTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGSGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	P1AF7782 y P1AF7784 cadena ligera (D1AD3421)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
156	CDR1 de cadena pesada <CEA> MFE23	DSYMH
157	CDR2 de cadena pesada <CEA> MFE23	WIDPENGDTHEYAPKFQG
158	CDR2 de cadena pesada <CEA> MFE23–H26	WIDPENGGTNYAQKFQG
159	CDR3 de cadena pesada <CEA> MFE23	GTPTGPYYFDY

160	CDR1 de cadena ligera <CEA> MFE23	SASSSVSYMH
161	CDR1 de cadena ligera <CEA> MFE23–L24, L25	RASSSVSYMH
162	CDR1 de cadena ligera <CEA> MFE23–L26	RASQSISSYM
163	CDR2 de cadena ligera <CEA> MFE23	STSNLAS
164	CDR2 de Cadena ligera <CEA> MFE23–L26	YTSNLAS
165	CDR2 de Cadena ligera <CEA> MFE23–L29	STSSLQS
166	CDR3 de cadena ligera <CEA> MFE23	QQRSSYPLT
167	Dominio variable de Cadena pesada <CEA> MFE23	QVKLQQSGAELVRSGTSVKLSCTASGFNIKDSYM HWLRQGPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPKFQGKA TFTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCNEGTPTG PYYFDYWGQGTTVTVSS
168	Dominio variable de Cadena ligera <CEA> MFE23	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHW QKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLEL K
169	MFE–H24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYM HWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDEYAPKFQGR VTMTTDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTP GPYYFDYWGQGLTVTVSS
170	MFE–H25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKDSY MHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDEYAPKFQ GRVTMTTDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEG TPTGPYYFDYWGQGLTVTVSS
171	MFE–H26	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYM HWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGGTNYAQKFQG RVTMTTDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTP TGPYYFDYWGQGLTVTVSS
172	MFE–H27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYM

		HWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTHEYAPKFQGR VTMTTDSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTPT GPYYFDYWGQGLVTVSS
173	MFE-H28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYM HWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTHEYAPKFQGR VTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTP GPYYFDYWGQGLVTVSS
174	MFE-H29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDSYM HWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTHEYAPKFQGR VTITDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTP GPYYFDYWGQGLVTVSS
175	MFE-L24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWY QQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
176	MFE-L25	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWY QQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
177	MFE-L26	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYMHY QQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
178	MFE-L27	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVPYMHY QQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
179	MFE-L28	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVPYMHWL QQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
180	MFE-L29	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVPYMHWL QQKPGKAPKLLIYSTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK

IV. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden practicar varias otras formas de realización, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

5

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

	ADA	Anticuerpo anti-fármaco
	AST	Alanina, serina, treonina
	BsAb	Anticuerpo biespecífico
10	CA	Agente de eliminación
	CEA	Antígeno carcinoembrionario
	DOTAM	1,4,7,10-tetrakis(carbamoilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano
	ID	Dosis inyectada
	ELISA	Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas
15	FAP	Proteína de activación de fibroblastos
	GPRC5D	Receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro D
	IV	Intravenoso
	PM	Peso molecular
	PBS	Solución salina amortiguada con fosfato
20	p.i.	Post inyección
	PK	Farmacocinética
	PRIT	Radioinmunoterapia pre-dirigida
	RIT	Radioinmunoterapia
	RT	Temperatura ambiente
25	SC	Subcutáneo
	SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
	SD	Desviación estándar
	SOPF	Libre de patógenos específicos y oportunistas
	TA	Antígeno objetivo
30	TGI	Inhibición del crecimiento tumoral
	TR	Regresión tumoral

EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS DE UNIÓN A DOTAM DE CONEJO

Ejemplo 1A: Inmunización de conejos

Se utilizó una mezcla 1: 1 de las 2 fracciones enantioméricas de Pb-DOTAM-alquil-PEG₄-KLH (*Fracción 1 MS2-DOTAM KLH* y *Fracción 2 MS2-DOTAM KLH*) para la inmunización de conejos blancos de Nueva Zelanda o conejos transgénicos que comprenden un ser locus de inmunoglobulina humana como se informa en WO 2000/46251, WO 2002/12437, WO 2005/007696, WO 2006/047367, US 2007/0033661 y WO 2008/027986. Cada conejo se inmunizó con 500 ug de la mezcla inmunógena, emulsionada con adyuvante completo de Freund, en el día 0 mediante aplicación intradérmica y 500 ug cada uno en los días 7, 14, 28, 56 alternando aplicaciones intramusculares y subcutáneas. Posteriormente, los conejos recibieron inmunizaciones subcutáneas mensuales de 500 ug, y se tomaron pequeñas muestras de sangre 7 días después de la inmunización para la determinación de los títulos séricos. Se tomó una muestra de sangre más grande (10% del volumen sanguíneo total estimado) durante el tercer y noveno mes de inmunización (a los 5-7 días después de la inmunización), y se aislaron células mononucleares periféricas, que se utilizaron como una fuente de células B específicas de antígeno en el proceso de clonación de células B.

Determinación de títulos séricos (ELISA)

Cada una de las 2 fracciones enantioméricas de Pb-DOTAM (*PJRD05.133F1* o *PJRD05.133F2*) se inmovilizó en una placa NUNC Maxisorp de 96 pocillos a 1 ug/ml, 100 ul/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con 2% de croteína C en PBS, 200 ul/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, por duplicado, en 0,5% de Croteína C en PBS, 100 ul/pocillo; detección con anticuerpo IgG anti-conejo de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) y estreptavidina-HRP; cada uno diluido en 0,5% de Croteína C en PBS, 100 ul/pocillo. Para todas las etapas, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05% en PBS. La señal se desarrolló mediante la adición de BM Blue POD Substrate soluble (Roche), 100 ul/pocillo; y se detuvo mediante la adición de HCl 1 M, 100 ul/pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. El título se definió como la dilución de antisueros que da como resultado una señal semimáxima.

Ejemplo 1B: Clonación de Células B de Conejos

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica de conejo (PBMCs)

Se tomaron muestras de sangre de conejos inmunizados. El EDTA que contenía sangre completa se diluyó dos veces con 1x PBS (PAA, Pasching, Austria) antes de la
 5 centrifugación de densidad utilizando mamífero linfolito (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. PBMC se lavaron dos veces con 1x PBS.

Medio EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con FCS al 10%
 10 (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), Glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomicina al 1% (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM, 10 mM de HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y b-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia) se utilizaron.

Recubrimiento de placas

Las placas de 6 pocillos de cultivo celular estéril se revistieron con KLH 2 µg/ml en
 15 buffer de carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, carbonato de hidrógeno disódico 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron en PBS estéril tres veces antes de su uso. Las placas de 6 pocillos recubiertas con estreptavidina estéril (Microcoat, Bernried, Alemania) se recubrieron con una mezcla de enantiómero 1 + 1 de isómero biotinilado TCMC-Pb-dPEC3-biotina A (1 µg/ml) y B (1 µg/ml) en PBS durante 3 h a temperatura
 20 ambiente. Antes del paso de barrido, estas placas de 6 pocillos se lavaron tres veces con PBS estéril.

Agotamiento de macrófagos/monocitos

Las PBMC se sembraron en placas de 6 pocillos recubiertas con KLH estériles para
 agotar los macrófagos y monocitos a través de una adhesión inespecífica y para eliminar las
 25 células que se unen a KLH. Cada pocillo se llenó al máximo con 4 ml de medio y hasta 6 x 10⁶ PBMC del conejo inmunizado y se dejó unir durante 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Las células en el sobrenadante (linfocitos de sangre periférica (PBL)) se utilizaron para la etapa de análisis de antígeno.

Enriquecimiento de células B en el enantiómero TCMC que contiene Pb

Las placas de 6 pocillos recubiertas con la mezcla de enantiómeros de los isómeros TCMC–Pb–dPEC3–biotina A y B se sembraron con hasta 6×10^6 PBL por 4 ml de medio y se dejaron unir durante 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Las células no adherentes se eliminaron lavando cuidadosamente los pocillos 1–3 veces con 1x PBS. Las células pegajosas restantes se separaron con tripsina durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO₂. La tripsinación se detuvo con medio EL–4 B5. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción de fluorescencia inmune.

Tinción de fluorescencia inmune y Citometría de Flujo

El FITC anti–IgG (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) se utilizó para la clasificación de células individuales. Para la tinción de la superficie, las células de la etapa de agotamiento y enriquecimiento se incubaron con el anticuerpo anti–IgG FITC en PBS y se incubaron durante 45 minutos en la oscuridad a 4°C. Después de la tinción, las PBMC se lavaron dos veces con PBS helado. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en PBS helado e inmediatamente se sometieron a los análisis FACS. Se agregó yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis FACS para discriminar entre células muertas y vivas.

Se utilizó un Becton Dickinson FACSAria equipado con una computadora y el software FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) para la clasificación de células individuales.

20 Cultivo de células B

El cultivo de las células B de conejo se preparó mediante un método descrito por Lightwood et al (J Immunol Methods, 2006, 316: 133–143). Brevemente, se incubaron células B de conejo de clasificación única en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL–4 B5 que contenía células Pansorbin (1: 100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland), sobrenadante de timocitos de conejo al 5% (MicroCoat, Bernried, Alemania) y células de timoma EL–4 B5 murinas irradiadas con rayos gamma (5×10^5 células/pocillo) durante 7 días a 37°C en la incubadora. Los sobrenadantes del cultivo de células B se eliminaron para el rastreo y las células restantes se cosecharon inmediatamente y se congelaron a –80°C en 100 µl de buffer RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

Ejemplo 1C: Expresión de anticuerpo de conejo

Amplificación por PCR de dominios V

El ARN total se preparó a partir de lisado de células B (resuspendido en buffer RLT – Qiagen – Cat. N° 79216) utilizando el kit de ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey & Nagel; 740709.4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se eluyó con 60 µl de agua libre de RNasa. Se utilizaron 6 µl de ARN para generar ADNc mediante reacción de transcriptasa inversa utilizando la Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) y un oligo dT-primer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los pasos se realizaron en un sistema Hamilton ML Star. Se utilizaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (VH y VL) con AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl utilizando los cebadores rbHC.up y rbHC.do para la cadena pesada y rbLC.up y rbLC.do para la cadena ligera (Tabla a continuación). Todos los cebadores directos fueron específicos para el péptido señal (de VH y VL respectivamente) mientras que los cebadores inversos fueron específicos para las regiones constantes (de VH y VL respectivamente). Las condiciones de PCR para RbVH + RbVL fueron las siguientes: arranque en caliente a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de 20s a 94°C, 20s a 70°C, 45s a 68°C, y una extensión final a 68°C durante 7 min.

Secuencias de cebadores

rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC (SEC. ID. NO.: 141)
rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG (SEC. ID. NO.: 142)
rbLC.up	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC (SEC. ID. NO.: 143)
rbLC.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC (SEC. ID. NO.: 144)

Se cargaron 8 µl de 50 µl de solución de PCR en un 48 E-Gel al 2% (Invitrogen G8008-02). Las reacciones positivas de PCR se limpiaron utilizando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se

eluyeron en 50 µl de buffer de elución. Todos los pasos de limpieza se realizaron en un sistema Hamilton ML Starlet.

Expresión recombinante de anticuerpos monoclonales bivalentes de conejo

Para la expresión recombinante de anticuerpos monoclonales bivalentes de conejo, los productos de PCR que codifican VH o VL se clonaron como ADNc en vectores de expresión mediante el método de clonación saliente (RS Haun et al., *Biotechniques* (1992) 13, 515–518; MZ Li et al., *Nature Methods* (2007) 4, 251–256). Los vectores de expresión contenían un casete de expresión que consta de un promotor CMV 5' que incluye el intrón A y una secuencia de poliadenilación BGH 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina para la amplificación de plásmidos en *E. coli*. Se utilizaron tres variantes del plásmido básico: un plásmido que contiene la región constante de IgG de conejo diseñada para aceptar las regiones VH, mientras que dos plásmidos adicionales que contienen región constante de LC kappa de conejo o humano para aceptar las regiones VL. Los plásmidos de expresión linealizados que codifican la región constante kappa o gamma y los insertos VL/VH se amplificaron por PCR utilizando cebadores superpuestos. Los productos de PCR purificados se incubaron con ADN-polimerasa T4 que generaba salientes de cadena sencilla. La reacción se detuvo mediante la adición de dCTP. En el siguiente paso, el plásmido y el inserto se combinaron e incubaron con recA que indujo la recombinación específica del sitio. Los plásmidos recombinados se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, las colonias cultivadas se recogieron y analizaron para determinar el plásmido recombinado correcto mediante preparación del plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN. Para la expresión de anticuerpos, los plásmidos HC y LC aislados se cotransfectaron transitoriamente en 2 ml (placa de 96 pocillos) de células FreeStyle HEK293-F (Invitrogen R790-07) mediante el uso del Reactivo de transfección libre 239 (Novagen) siguiendo el procedimiento sugerido por el proveedor de reactivos. Los sobrenadantes se cosecharon después de 1 semana y se entregaron para su purificación.

Ejemplo 1D: Selección de Anticuerpos Monoclonales de Conejo

Se realizó un ensayo SET (titulación de equilibrio de solución) como se describe a continuación.

Ensayo SET

Materiales:

1. Mezcla DOTAM–Biotina–Isómero:
- 5 Mezcla de los siguientes componentes, conc. = 20 ng/ml
 - Pb–Dotam–Bn–biotina/TCMC–Pb–dPEG3–Biotina, isómero A
 - Pb–Dotam–Bn–biotina/TCMC–Pb–dPEG3–Biotina, isómero B
 - Pb–Dotam–alquil–biotina isómero A
 - Pb–Dotam–alquil–biotina isómero B
- 10
2. PBS: DPBS, PAN, P04–36500
3. BSA: Roche, 10735086001
- 15
4. Tween 20: Polysorbat 20 (usb, # 20605, 500ml)
5. PBST: 10x, Roche, # 11666789001/0,1% Tween 20
6. OSEP: PBS (10x, Roche, # 11666789001)/0,5% BSA (fracción de albúmina sérica
- 20 bovina V, libre de ácidos grasos, Roche, # 10735086001)/0,05% Tween 20

Preparación de la placa de ensayo: se incubaron placas de estreptavidina de 384 pocillos (Nunc, Microcoat # 11974998001) durante la noche a 4°C con 25 µl/pocillo de una mezcla de DOTAM–biotina–isómero en buffer PBS a una concentración de 20 ng/ml.

- 25 Equilibrio de muestras de anticuerpos anti–DOTAM con quelatos libres de DOTAM–metal (Pb, Bi, Ca, Cu, Zn, Mg, Fe): 0,01 nM – 1 nM de anticuerpo se tituló con los quelatos de metal DOTAM relevantes en pasos de dilución 1: 3, 1: 2 o 1: 1,7 comenzando a una concentración de 2500 nM, 500 nM o 100 nM de quelato de metal DOTAM. Las muestras se incubaron a 4°C durante la noche en microplacas de polipropileno de almacenamiento REMP
- 30 selladas (Brooks).

Después de la incubación durante la noche, las placas de estreptavidina se lavaron 3 veces con 90 µl de PBST por pocillo. Se transfirieron 15 µl de cada muestra de la placa de equilibrio a la placa de ensayo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente,

seguido de 3x 90 µl de pasos de lavado con buffer PBST. La detección se llevó a cabo mediante la adición de 25 µl de un conjugado de POD–anticuerpo IgG anti–humana de cabra (Jackson, 109–036–088, 1: 4000 en OSEP), seguido de 6x 90 µl de pasos de lavado con buffer PBST. Se agregaron 25 µl de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No.: 11835033001) a cada pocillo. La medición se realizó a 370/492 nm en un lector Safire2 (Tecan).

La siguiente tabla muestra las propiedades de varios anticuerpos monoclonales de conejo bivalentes según se determina utilizando este ensayo. PRIT–0128 se seleccionó como el candidato principal, dado que tiene una unión comparable a Pb y Bi quelatados, una unión reducida a otros metales quelados y una alta afinidad (<100 pM).

Unión de anticuerpos monoclonales bivalentes de conejo a metales quelados

Nombre	Especies	KD [SET–Titulación]			
		Pb	Bi	Ca	Zn
PRIT–0135	WTRa	0,000	0,000	0,001	0,285
PRIT–0129	WTRa	0,001	0,024	0,013	9,251
PRIT–0128	WTRa	0,002	0,003	0,003	8,152
PRIT–0132	WTRa	0,002	0,046	0,002	0,217
PRIT–0134	WTRa	0,002	0,059	0,003	0,443
PRIT–0136	WTRa	0,004	0,029	0,014	131,926
PRIT–0127	WTRa	0,014	0,092	0,015	222,339
PRIT–0107	TgRa	1,1	51,0	48,0	>1000

WTRa: Conejos de tipo salvaje; TgRa: conejos transgénicos

15 **Ejemplo 2: Humanización**

Humanización

Luego, el candidato principal PRIT–0128 estaba sujeto a la humanización.

Para la identificación de un marco aceptor humano adecuado durante la humanización del aglutinante DOTAM PRIT–0128, se utilizó una combinación de dos metodologías. Por un lado, se adoptó un enfoque clásico mediante la búsqueda de un marco aceptor con alta homología de secuencia con el anticuerpo principal y el posterior injerto de las regiones CDR en este marco aceptor. Cada diferencia de aminoácidos de los marcos identificados con el

anticuerpo principal se juzgó por su impacto en la integridad estructural del aglutinante y se introdujeron retromutaciones hacia la secuencia principal siempre que fuera apropiado.

Por otro lado, se utilizó una herramienta interna desarrollada in silico para predecir la orientación de los dominios VH y VL de las versiones humanizadas entre sí (véase WO2016/062734). Esto se realizó para los injertos virtuales de las CDR en todas las combinaciones posibles de línea germinal humana. Los resultados se compararon con la orientación del dominio VH–VL del aglutinante principal para seleccionar combinaciones de marco que tengan una geometría cercana al anticuerpo de partida.

En cada caso, las siguientes regiones CDR del anticuerpo principal se injertaron en el marco aceptor (numeración de acuerdo con Kabat):

VH_CDR1: 31–35

VH_CDR2: 50–65

VH_CDR3: 95–102

15

VL_CDR1: 24–34

VL_CDR2: 50–56

VL_CDR3: 89–97

Las variantes de humanización se produjeron en un formato que comprende un anticuerpo de longitud completa para CEA, con el extremo C de una de las cadenas pesadas fusionadas con el extremo N del dominio VH, el aglutinante Dotam y el extremo C de la otra cadena pesada fusionada al extremo N del dominio VL del aglutinante DOTAM, formando un anticuerpo biespecífico con dos sitios de unión para CEA y un sitio de unión funcional para DOTAM. Por lo tanto, el aglutinante DOTAM se fusionó con el extremo C-terminal del Fc del tumor dirigido a IgG como una fusión VH/VL Fv (sin CH1 y Ck respectivamente). La molécula derivada del aglutinante DOTAM principal PRIT-0128 en este formato biespecífico se denomina PRIT-0156.

También se incluyó el marco de Herceptin debido a la conveniencia en términos de predicción de VH/VL y la mayor estabilidad del marco. Para todas las variantes humanizadas de VH, se utilizó el elemento J humano hJH2. Para todas las variantes humanizadas de VK, se utilizó el elemento J humano hJK4.

El HC4 es un injerto de PRIT-128 en la línea germinal humana IGHV3-30-02 con una retromutación Kabat A49G.

Para obtener HC5 de cadena pesada variable, las CDR se injertaron en la línea germinal humana hVH_2_26 con A49G como una retromutación y la eliminación del primer aminoácido para reflejar el extremo N del conejo original.

Injerto en la región V de Herceptin (derivada de la línea germinal humana hVH3_66), la variante HC7 se caracteriza por algunas modificaciones en el marco aceptor: delección de N-terminal E, A49G, A71R y S93A.

Para HC10, las CDR de PRIT-128 se injertaron en la línea germinal humana IGHV4_34_01.

En el presente documento, el N-terminal se modificó, comenzando con V2, para reflejar el anticuerpo de conejo original que comienza con Q2. Además, G29F y F31L se consideraron como retromutación wrt nomenclatura Kabat, así como V71R y F78V en el marco 3.

Para la cadena ligera LC1, las CDR se injertaron en la línea germinal humana IGKV1_39_01 sin ninguna retromutación. El comienzo fue elegido como I2 para reflejar el conejo original Ab que comienza con A2.

La variante de cadena ligera LC3 se obtuvo injertando las CDR en la línea germinal humana hVK1_5. D1 se eliminó y una retromutación I2A se consideró como un nuevo N-terminal. Como retromutaciones adicionales, se tomaron en cuenta K42Q y A43P.

No se produjeron todas las combinaciones posibles de la matriz de humanización, pero se eligió una selección de combinaciones definidas en función de consideraciones como la predicción de VH/VL y los riesgos de secuencia de la combinación dada.

25 Selección de candidatos

El objetivo de la humanización era obtener aglutinantes humanizados que no pierdan más de un factor de 10 en términos de afinidad con DOTAM. Esto se logró con varios aglutinantes de afinidad comparable o incluso mejor con DOTAM.

Como se mencionó anteriormente, PRIT-0156 es un anticuerpo 2: 1 que comprende el aglutinante DOTAM de conejo PRIT-0128 combinado con el aglutinante CEA CH1A1A. PRIT-0178 a PRIT-0204 son variantes humanizadas en el mismo formato con el mismo aglutinante CEA. PRIT-0205 hasta PRIT-0221 corresponden a las variantes de

humanización de PRIT-0178 a PRIT-0204 en la parte de unión DOTAM, pero tienen el aglutinante CEA cambiado a T84.66.

Determinación de kd basada en equilibrio de solución

5 Para rastrear una mayor cantidad de candidatos de humanización por su afinidad con Pb-DOTAM, se utilizó la titulación de equilibrio de solución (SET). La siguiente tabla detalla la determinación de afinidad basada en SET de aglutinantes DOTAM humanizados seleccionados contra Pb-DOTAM. Todos los anticuerpos en esta tabla son anticuerpos biespecíficos que comprenden la unión bivalente a CEA y la unión monovalente a Pb-Dotam (formato 2: 1):

10

Nombre de la molécula	Combinación HC/LC humanizada	SET Pb-DOTAM (pM)
PRIT-0187-0002	HC10 LC1	0,03
PRIT-0193-0002	HC5 LC3	0,36
PRIT-0195-0004	HC10 LC3	0,40
PRIT-0156-0004	Molécula principal	0,43
PRIT-0182-0002	HC8 LC7	5,54
PRIT-0189-0002	HC7 LC2	5,81
PRIT-0185-0002	HC 2 LC1	5,87
PRIT-0192-0002	HC2 LC3	8,04
PRIT-0183-0004	HC2 LC2	8,11
PRIT-0197-0002	HC7 LC1	8,69
PRIT-0198-0002	HC7 LC3	9,09
PRIT-0182-0004	HC8 LC7	17,14
PRIT-0183-0002	HC2 LC2	22,45
PRIT-0180-0004	HC9 LC6	26,10
PRIT-0190-0002	HC9 LC2	33,83
PRIT-0194-0002	HC8 LC3	34,63
PRIT-0199-0002	HC9 LC1	43,91
PRIT-0180-0002	HC9 LC6	47,70
PRIT-0188-0002	HC4 LC2	54,34

Nombre de la molécula	Combinación HC/LC humanizada	SET Pb-DOTAM (pM)
PRIT-0178-0004	HC1 LC6	60,06
PRIT-0179-0004	HC4 LC6	64,92
PRIT-0181-0002	HC4 LC7	65,11
PRIT-0179-0002	HC4 LC6	65,81
PRIT-0178-0002	HC1 LC6	66,68
PRIT-0187-0004	HC10 LC1	78,09
PRIT-0184-0002	HC1 LC1	80,56
PRIT-0200-0002	HC9 LC3	83,24
PRIT-0191-0002	HC1 LC3	111,10

Determinación de kd basada en Kinexa

Para un análisis más detallado y un método ortogonal para la determinación de afinidad, se utilizó Kinexa.

5 Instrumentación y materiales

Se utilizó un instrumento KinExA 3200 de Savidyne Instruments (Boise, ID) con automuestreador. Se adquirieron perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) de Savidyne, mientras que PBS (solución salina amortiguada con fosfato), BSA (fracción de albúmina de suero bovino V) y los anticuerpos anti-DOTAM se prepararon internamente (Roche). El anticuerpo adsorbido con fragmento cruzado Fc IgG de cabra anti-humana purificada por afinidad conjugado con Dylight650® se adquirió de Bethyl Laboratories (Montgomery, TX). Se obtuvieron los antígenos Pb-DOTAM biotinilados (isómero Pb-DOTAM-alquil-biotina A y B, Pb-DOTAM-Bn-biotina/TCMC-Pb-dPEG3-Biotina, isómero A y B) y el Pb-DOTAM no biotinilado de AREVA Med (Bethesda, MD).

15 Preparación de perlas recubiertas de antígenos

Las perlas de PMMA se recubrieron de acuerdo con el protocolo del Manual KinExA para moléculas biotiniladas (Savidyne). Brevemente, primero, se agregaron 10 µg de Biotina-BSA (Thermo Scientific) en 1 ml de PBS (pH 7,4) por vial (200 mg) de perlas para el recubrimiento de adsorción. Después de rotar durante 2 h a temperatura ambiente, se retiró

el sobrenadante y se lavaron las perlas 5 veces con 1 ml de PBS. En segundo lugar, se agregó a las perlas 1 ml de 100 µg de proteína de unión a biotina de neutrAvidina (Thermo Scientific) en PBS que contenía 10 mg/ml de BSA y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales para acoplar NeutrAvidina a las perlas y proporcionar sitios de unión a biotina adicionales para la unión posterior de proteínas biotiniladas. Las perlas recubiertas con neutrAvidina se enjuagaron 5 veces con 1 ml de PBS. Finalmente, las perlas se recubrieron con 200 ng/ml de mezcla de isómero Pb-DOTAM biotinilado (50 ng para cada isómero) en PBS y se incubaron durante 2 horas más a temperatura ambiente. Las perlas se volvieron a suspender en 30 ml de PBS y se utilizaron inmediatamente.

10 Ensayos de equilibrio KinExA

Todos los experimentos KinExA se realizaron a temperatura ambiente (RT) utilizando PBS pH 7,4 como buffer de ejecución. Las muestras se prepararon en buffer en ejecución suplementado con 1 mg/ml de BSA ("buffer de muestra"). Se utilizó un caudal de 0,25 ml/min. Se tituló una cantidad constante de anticuerpo anti-DOTAM con concentración de sitio de unión 5 pM con antígeno Pb-DOTAM mediante dilución en serie doble comenzando a 100 pM (rango de concentración 0,049 pM – 100 pM). Una muestra de anticuerpo sin antígeno sirvió como señal al 100% (es decir, sin inhibición). Los complejos antígeno-anticuerpo se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 24 h para permitir alcanzar el equilibrio. Luego se extrajeron mezclas equilibradas a través de una columna de perlas acopladas a Pb-DOTAM en el sistema KinExA a un volumen de 5 ml, lo que permitió que las perlas capturaran el anticuerpo no unido sin perturbar el estado de equilibrio de la solución. El anticuerpo capturado se detectó utilizando un anticuerpo secundario específico de fragmento Fc antihumano conjugado con Dylight 650 © de 250 ng/ml en buffer de muestra. Cada muestra se midió por duplicado para todos los experimentos de equilibrio.

La KD se obtuvo del análisis de regresión no lineal de los datos utilizando un modelo de unión homogéneo de un sitio contenido en el software KinExA (Versión 4.0.11) utilizando el método de "análisis estándar". El software calcula la KD y determina el intervalo de confianza del 95% ajustando los puntos de datos a una curva KD teórica. El intervalo de confianza del 95% (Sapidyne TechNote TN207R0) se proporciona como KD baja y KD alta.

Mediciones de termoestabilidad para moléculas PRIT humanizadas

Método y análisis de datos

Se diluyeron diferentes variantes de las moléculas PRIT humanizadas en el formato final (en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0) en el mismo buffer a 1 mg/ml. Se transfirieron 30 µl de cada muestra a un dispositivo de filtro de placa de 384 pocillos (junto con un anticuerpo anti-HER3 como referencia). Después de la centrifugación a 1.000 g durante 1 minuto, se cubrieron pocillos con 10 µl de aceite de parafina. La placa se centrifugó de nuevo (1.000 g durante 1 minuto) y se transfirió al lector de placas DLS (Dyna Pro PlateReader-II, Wyatt). Comenzando a 25°C, la temperatura se incrementó a una velocidad de 0,05°C/min a 79,9°C. La luz dispersa se registró utilizando el software Dynamics (V7.0).

Los datos se transfirieron a Excel (Microsoft), ordenados por muestra y temperatura y un complemento de software utilizado para crear curvas de fusión. La temperatura, donde se produjo una clara desviación de la línea de base, se definió como "inicio de agregación" y el punto de inflexión de la curva de fusión como "temperatura de fusión".

15 Resultados

Muestra	inicio de agregación (en °C)	Temperatura de fusión (en °C)
Her 3	63 ±1	67,5 ±1
PRIT-0156 (molécula principal con aglutinante DOTAM de conejo)	45 ±1	51 ±1
PRIT 205	51 ±1	51,5 ±1
PRIT 206	51 ±1	58,1 ±1
PRIT 207	49 ±1	58,1 ±1
PRIT 208	54 ±1	57,7 ±1
PRIT 209	54 ±1	57,7 ±1
PRIT-0213	54 ±1	57,7 ±1

Propiedades de los candidatos

Las tablas a continuación resumen la identidad de varias moléculas PRIT y comparan sus propiedades. Los compuestos preferidos fueron PRIT-0213 y PRIT-0214.

5 Resumen de candidatos

Anticuerpo	Aglutinante CEA	Aglutinante Dotam	Formato
PRIT 0218	ninguno	WT	Anticuerpo de conejo
PRIT0156	CH1A1A	PRIT-0218	Anticuerpo 2: 1 con aglutinante Dotam PRIT 0128
PRIT 0186	CH1A1A	HC5/LC1 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0213	T84.86	HC5/LC1 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/LC1 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0214	T84.86	HC10/LC1 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0206	T84.86	HC5/LC3 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0216	T84.86	HC5/LC3 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0217	T84.86	HC5/LC3 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1
PRIT-0208	T84.86	HC7/LC1 (PRIT-0218 humanizado)	Formato 2:1

Comparación de propiedades

	CEA BiCEAnder	Agglutinante DOTAM	SET PbDOTAM [pM]	Kinexa PbDOTAM [pM]	Rendimiento [mg/l]	T Agg 266nm	Humanidad		Biodistribución
PRIT-0156	CH1A1A	WT Conejo	0,01	0,25	25	45	—	—	Ok
PRIT-0186	CH1A1A	HC5/LC1	0,4	0,92	38	50	HC 58%	LC 57%	Ok
PRIT-0213	T84.66	HC5/LC1	0,4	0,84	4,0	54	HC 58%	LC 57%	Ok
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/ LC1	0,03	0,99	17,8	57	HC 40%	LC 57%	Ok
PRIT-0214	T84.66	HC10/LC1	0,03	0,84	6,0	55	HC 40%	LC 57%	Ok
PRIT-0206	T84.66	HC5/LC3	0,36	1,0	1,32	50	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0216	T84.66	HC5/LC3	—	51	7,0	50	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0217	T84.66	HC5/LC3	—	3	10,0	54	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0208	T84.66	HC7/LC1	8,7	8,3	7,6	59	HC 51%	LC 57%	Ok

A continuación se proporcionan datos adicionales para los valores de afinidad determinados por Kinexa, para PRIT-0213. (PRIT-0213 es la misma molécula que PRIT-0186, excepto por otro CEA que se une a VH/VL).

5 PRIT-0213

Metal-DOTAM quelato afinidades de CEA-DOTAM BsAb

Antígeno	KD [pM]	95% CI[pM]
Pb-DOTAM	0,84	0,44–1,4
Ca-DOTAM	0,95	0,43–1,7
Bi-DOTAM	5,7	4,6–6,2
Cu-DOTAM	122000	60000 – 206000

Los valores adicionales son los que se muestran a continuación:

Nombre	Antígeno	KD [pM]	Intervalo de confianza del 95% [pM]
PRIT-0213	Ca-DOTAM	0,95	0,43 – 1,7*
PRIT-0214	Ca-DOTAM	0,52	0,34 – 0,74
PRIT-0213	Bi-DOTAM	5,7	4,6 – 6,2*
PRIT-0214	Bi-DOTAM	6,0	5,5 – 6,4
PRIT-0213	Cu-DOTAM	122000	60000 – 206000*°
PRIT-0214	CU-DOTAM	38000	19000 – 63000*°

10

* intervalo de confianza amplio, que indica que la K_D medida no es tan precisa

° ensayo no completamente optimizado para nM – afinidad

Secuencias

15 Las secuencias para este ejemplo se proporcionan a continuación. PRIT-0213 y – 0214 tienen un sitio de unión Pb-DOTAM que comprende CDR de la SEC. ID. NO 116–121 a continuación. Las secuencias de la cadena pesada y ligera variable del sitio de unión Pb-DOTAM de PRIT-0213 se muestran en la SEC. ID. NO: 122–123 y las de PRIT-0214 se muestran en la SEC. ID. NO: 124–125.

20 PRIT-0214 se compone de:

i) una primera cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 126;

ii) una segunda cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 127; y

iii) dos cadenas ligeras de anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 128.

5

PRIT-0213 se compone de:

i) una primera cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 129;

ii) una segunda cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 130; y

10

iii) dos cadenas ligeras de anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO: 128.

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
116	CDR1 de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0213	gfslstysms
117	CDR2 de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0213	figsrgdtyyaswakg
118	CDR3 de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0213	erdpygggaypphl
119	CDR1 de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0213	qsshsvysndla
120	CDR2 de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0213	qasklas
121	CDR3 de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0213	lggyddesdyg
122	Dominio variable de cadena pesada 1 de <Pb–Dotam> PRIT–0213	vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsgdtyyas wakgrltisk dtsksqvlt mtnmdpvda tyycarerdpygggaypphl wrgtlvtvs s
123	Dominio variable de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0213	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawayqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyyel ggyddesdy gfgggtkvei k
124	Dominio variable de cadena pesada <Pb–Dotam> PRIT–0214	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdpygggaypphl wrgtlvtvs s
125	Dominio variable de cadena ligera <Pb–Dotam> PRIT–0214	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawayqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyyel ggyddesdy gfgggtkvei k
126	cadena pesada 1 de biespecífico,	1 qvqlvqsgae vkkgpsskv sckasgfnik dtymhwvrqa

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
	trivalente <CEA/Pb-Dotam> PRIT-0214 VH_84.66	pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyy capfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcapeaag gpsvflfppk 251 p kdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvytlppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslsispq 451 gggsgggsgs gggsgggsgs vqlqqwgagl lkpsetlsit cavygfslst 501 ysmswirqpp gkglewigfi gsr gdttyas wakgrvtisr dtsknqvslk 551 lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvts s
127	cadena pesada 2 de biespecífico, trivalente <CEA/Pb-Dotam> PRIT-0214 VL_84.66	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyy capfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcapeaag

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
		gpsvflfppk 251 p kdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiecti skakgqprep 351 qvctlppsrđ eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealnhhy tqkslsispq 451 gggsgggsgs gggsgggsgs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dfiltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
128	cadena ligera <CEA> 84.66	1 eivltqspat lsispgerat lscragesvd ifgvglfhwv qqkpgqaprl 51 liyrasnrat giparfsgsg sgtdftlis slepedfavy ycqqtneđpy 101 tfgqgtklei krtvaapsvf ifppsdeqlk sgtasvccl nnfypreakv 151 qwkvdnalqs gnsqesvteq dskdstysls stltlskady ekhkvyacev 201 thqglsspvt ksfnrgec
129	cadena pesada 1 de biespecífico, trivalente <CEA/Pb-Dotam> PRIT-0213 VH_84.66 → botón	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrseđ tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalglv 151 kdyfpepvtv swnsfaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
		201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtmlisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvytlppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennyktpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggggs gggsgggggs vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst 501 ysmswirqpp gkalewlgfi gsrqdytyas wakgrltisk dtsksqvvt 551 mtmndpvdta tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvts s
130	cadena pesada 2 de biespecífico, trivalente <CEA/Pb-Dotam> PRIT-0213 VL_84.66 → ojal	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtmlisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsrđ eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
		pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdkrs wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggggs gggsgggggs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawayqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
131	cadena pesada 1 de biespecífico, <CEA/Pb–Dotam> Conejo Dotam _84.66	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrse tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsrde eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdkrs wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggggs gggsgggggs avltqtpspv spavggvti scqsshsvys 501 dndlawayqqk lgqppklliy qasklasgvs srfsgsgsgt qftltisgvq 551 sddaatyycl ggyddesdty gfgggtevvv k

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
132	HC5	VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYS MSWIRQPPGKALEWLGEIGSRGDTYYASWAK GRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYC AR <u>ERDPY</u> GGGA <u>Y</u> PPHLWGRGTLVTVSS
133	LC1	SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHVSVDN DLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDD ESDTYGFGGGTKVEIK
134	LC3	aqmtqspstl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgqppklliy qasklasgvp srfsgsgsgt eftltisslq pddfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
135	HC7	vqlvesgggl vqpggslrls caasgfslst ysmswvrqap gkglewvgfi gsgdtyyas wakgrftisr dtskntaylq mnsraedta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
136	HC10	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
137	T84.66 VH 1	qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrse tavyycapfg yyvsdyamay wqggtlvtvs s
138	T84.66 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFG VGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQTNE DPYTFGQGTKLEIK
139	CH1A1A VH	qvqlvqsgae vkkpgasvkv sckasgytft efgmnwvrqa

SEC. ID. NO	Descripción	SECUENCIA
		pgqglewmgw intktgeaty veefkgrvtf ttdtststay melrslrsdd tavyyicarwd fayyveamdy wgqgttvts s
140	CH1A1A VL	diqmtqspss lsasvgdrvt itckasaavg tyvawyqqkp gkapkliys asyrkr gvps rfsgsgsgtd fttlisslqp edfatyychq yytyplftfg qgtkleik

Ejemplo 3: Cristalización, recopilación de datos y determinación de la estructura del complejo Fab P1AA1227 Pb–DOTAM

Para la formación de complejos, el Fab derivado del VH/VL humanizado en PRIT-0213, llamado P1AA1227, a 26 mg/ml se mezcló con polvo de Pb–DOTAM en una relación molar de 1: 4,2. Después de 2 horas de incubación a 4°C, se realizaron ensayos iniciales de cristalización en configuraciones de difusión de vapor de gota sentada a 21°C utilizando la pantalla JCSG + (Qiagen, Hilden). Los cristales aparecieron dentro de 5 días de 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M BIS–TRIS pH 5,5, 25% p/v PEG3350. Los cristales se cosecharon directamente de la placa de rastreo sin ningún paso de optimización adicional.

Recopilación de datos y determinación de estructura. Para la recolección de datos, los cristales se congelaron instantáneamente a 100 K en una solución precipitante que contenía 10% de etilenglicol. Los datos de difracción se obtuvieron a una longitud de onda de 1,0000 Å utilizando un detector PILATUS 6M en la línea de haz X10SA de la Fuente de Luz Suiza (Villigen, Suiza). Los datos se procesaron con XDS (Kabsch, W. Acta Cryst. D66, 133–144 (2010)) y se escalaron con SADABS (BRUKER). Los cristales del complejo pertenecen al grupo espacial C2 con ejes celulares de $a = 135,63$ Å, $b = 56,42$ Å, $c = 64,52$ Å y $\beta = 108,36^\circ$ y difractan a una resolución de 1,40 Å. La estructura se determinó mediante reemplazo molecular con PHASER (McCoy, A.J, Grosse–Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. J. Appl. Cryst. 40, 658–674 (2007)) utilizando las coordenadas de una estructura interna Fab como modelo de búsqueda. Se utilizó la diferencia de densidad de electrones para colocar el Pb–DOTAM y para cambiar los aminoácidos de acuerdo con las diferencias de secuencia por refinamiento en el espacio real. Las estructuras se refinaron con programas de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760–763 (1994).) y BUSTER (Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonnrhein, C., Womack, T.O. (2011). Buster versión 2.9.5 Cambridge, United Kingdom : Global Phasing Ltd.). La reconstrucción manual se realizó con COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. y Cowtan, K. Acta Cryst D66, 486–501 (2010)).

La recopilación de datos y las estadísticas de refinamiento se resumen a continuación.

Todas las presentaciones gráficas se prepararon con PYMOL (The Pymol Molecular Graphics System, Version 1.7.4. Schrödinger, LLC.).

Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para el complejo Fab P1AA1227–

5 Pb–DOTAM

P1AA1227–Pb– DOTAM	
Recopilación de datos	
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda	
a, b, c (Å)	135,63, 56,42, 64,52
α, β, γ (°)	90, 108,36, 90
Resolución (Å)	1,40
R_{sym} o R_{merge}	0,041
$I/\delta I$	10,3 (0,94)
Compleción (%)	94,4 (86,1)
Redundancia	3,37 (3,33)
Refinamiento	
Resolución (Å)	48,9 – 1,40
No. reflexiones	81631
$R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$	19,21/22,38
No. átomos	
Proteína	3342
Agua	523
Pb–DOTAM	29
B –factores	
Proteína	14,81
Agua	37,46

Pb-DOTAM	21,09
R.m.s. desviaciones	
Longitudes de enlace	0,011
(Å)	
Ángulos de enlace (°)	1,57

* Los valores entre paréntesis son para el revestimiento de mayor resolución.

Estructura de Fab P1AA1227 en complejo con Pb-DOTAM

5 Para caracterizar los detalles de interacción del Pb-DOTAM con Fab P1AA1227, se determinó la estructura cristalina del complejo a una resolución de 1,40 Å. La estructura revela que Fab P1AA1227 se une a Pb-DOTAM por las principales contribuciones de CDR1 y CDR3 de la cadena ligera y por CDR2 y CDR3 de la cadena pesada.

10 El análisis de la interfaz de unión con el programa PISA revela un patrón de interacción de Fab P1AA1227 con el Pb-DOTAM a través de 3 enlaces de hidrógeno, interacciones polares y contactos de van der Waals. El Pb-DOTAM se une en un bolsillo formado por una cadena pesada y ligera. Este bolsillo tiene la forma de una caja que está abierta por un lado. Las paredes laterales y el fondo del bolsillo contribuyen con interacciones apolares, mientras que en el borde de las paredes dominan las interacciones

15 polares. Los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral se forman entre los residuos CDR3 de la cadena pesada Glu95 y Asp97 con los átomos de nitrógeno de carbamoilo DOTAM N7 y N8. Se establece un enlace de hidrógeno adicional a través del átomo de carbonilo de la cadena principal de Arg96 con el átomo N7 de DOTAM. El complejo se estabiliza aún más a través de interacciones apolares de cadenas laterales CDR2 Phe50 y Tyr58 de cadena pesada

20 que están orientadas de borde a frente hacia el anillo de azaciclododecano. La cadena ligera contribuye principalmente al "fondo" del bolsillo con residuos CDR3 Gly91-Tyr96 que proporcionan contactos apolares al anillo de tetraciclododecano. Asp32 mantiene un enlace de hidrógeno al átomo de nitrógeno de carbamoilo N6 de DOTAM. (Numeración de acuerdo con Kabat).

25 La siguiente tabla muestra los residuos de paratope de la cadena pesada, basados en el análisis con el programa PISA.

Residuos de la cadena pesada (número de Kabat)	Tipo de interacción	Pb-DOTAM
Phe50	apolar	Borde para enfrentar el anillo de azaciclododecano
Asp56	polar	N8
Tyr58	apolar	Borde para enfrentar el anillo de azaciclododecano
Glu95	Enlace H	N7
Arg96	Enlace H (mc carbonilo)	N7
Asp97	Enlace H	N8
Pro98	Borde-Frente	Por encima de Pb-Dotam, 4Å de distancia
Tyr99	polar (pero distancia 6Å)	N5
Ala100C	apolar	C12
Tyr100D	polar (átomos mc)	N7

5 La siguiente tabla muestra los residuos de paratope de la cadena ligera, basados en el análisis con el programa PISA.

Residuos de la cadena ligera (número de Kabat)	Tipo de interacción	Pb-DOTAM
Tyr28	apolar	Borde para enfrentar el anillo de azaciclododecano
Asp32	polar, Enlace H	N6
Gly91	apolar	debajo del anillo de azaciclododecano
Tyr92	apolar	debajo del anillo de azaciclododecano
Asp93	apolar	debajo del anillo de azaciclododecano
Thr95C	apolar	debajo del anillo de azaciclododecano
Tyr96	apolar	Borde para enfrentar al anillo de azaciclododecano

5 Los residuos de paratope también están subrayados en las siguientes secuencias:

> **P1AA1227_HC**

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDDTYY
ASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAREERDPYGGGAYPPHLWGR

10 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC.
ID. NO.: 145)

> **P1AA1227_LC**

SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLA
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC. ID. NO.:

5 146)

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos CEA–Dividido–DOTAM VH/VL

Los métodos de PRIT (radioinmunoterapia pre-dirigida) utilizando anticuerpos biespecíficos que tienen un sitio de unión para el antígeno objetivo y un sitio de unión para el compuesto radiomarcado, comúnmente utilizan un agente de eliminación (CA) entre las administraciones de anticuerpos y radioligando, para asegurar el direccionamiento efectivo y altas proporciones de dosis absorbidas de tejido tumoral a normal (véase la Figura 3). En un ejemplo de uno de estos métodos, el BsAb inyectado tiene suficiente tiempo para penetrar en los tumores, generalmente de 4 a 10 días, después de lo cual se neutraliza el BsAb circulante utilizando un Pb–DOTAM–dextrano–500 CA. El CA bloquea la unión de ^{212}Pb –DOTAM a BsAb no dirigido sin penetrar en el tumor, lo que bloquearía los sitios pre-dirigidos. Este régimen de pretratamiento permite la acumulación tumoral eficiente del quelato radiomarcado administrado posteriormente, ^{212}Pb –DOTAM.

Sin embargo, en los métodos que involucran un agente de eliminación, el uso de CA introduce un paso más en el método que es ineficiente. Además, puede ser importante elegir el momento y la dosis de la administración de CA con cuidado, lo cual es un factor complicado.

Para abordar los problemas asociados con el uso de un agente de eliminación, los presentes inventores han propuesto una estrategia para dividir los dominios DOTAM VL y VH, de modo que se encuentren en anticuerpos separados.

La generación de anticuerpos DOTAM VH/VL divididos a modo de ejemplo se analiza más adelante.

Generación de plásmidos para la expresión recombinante de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos

Las proteínas deseadas se expresaron mediante transfección transitoria de células renales embrionarias humanas (HEK 293). Para la expresión de un gen/proteína deseado (por

ejemplo, cadena pesada de anticuerpo de longitud completa, cadena ligera de anticuerpo de longitud completa o una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que contiene un dominio adicional (por ejemplo, un dominio variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina en su extremo C) se utilizó una unidad de transcripción que comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P–CMV), incluido el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina humana de cadena pesada (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina (SS),
- un gen/proteína para expresarse, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH pA).

Además de la unidad/casete de expresión que incluye el gen deseado para expresar el plásmido de expresión de mamífero básico/estándar contenido

- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen de beta–lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

a) Plásmido de expresión para cadenas pesadas de anticuerpos

Los genes que codifican la cadena pesada del anticuerpo, incluidos los genes de fusión C–terminales que comprenden una cadena pesada del anticuerpo completo y funcional, seguidos de un dominio de anticuerpo V–pesado o V–ligero adicional se ensamblaron fusionando un fragmento de ADN que codifica los elementos de secuencia respectivos (V–pesado o V–ligero) separados cada uno por un ligador G4Sx4 al término C del dominio CH3 de una molécula de IgG humana (VH–CH1–bisagra–CH2–CH3–ligador–VH o VH–CH1–bisagra–CH2–CH3–ligador–VL). Las moléculas de anticuerpos recombinantes que portan un dominio VH y un dominio VL en el extremo C de los dos dominios CH3, respectivamente, se expresaron utilizando la tecnología de botón en ojal.

Los plásmidos de expresión para la expresión transitoria de una cadena pesada del anticuerpo con un dominio VH o VL C–terminal en células HEK293 comprendieron además del fragmento de cadena pesada del anticuerpo con el casete de expresión del dominio VH o VL C terminal, un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de beta–lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E.*

coli. La unidad de transcripción del fragmento de cadena pesada del anticuerpo con el gen de fusión del dominio VH o VL C-terminal comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV), incluido el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina humana de cadena pesada (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico codificante de cadena pesada de anticuerpo (VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-ligador-VH o VH-CH1-bisagra-CH2-CH3-ligador-VL), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH pA).

La secuencia de aminoácidos del fragmento de cadena pesada del anticuerpo maduro con la proteína de fusión del dominio VH o VL C-terminal es como se muestra a continuación:

Anticuerpo Dividido PRIT con DOTAM-VH – P1AD8749

>D1AC4022

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGW
 INTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
 FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEC. ID.
 NO.: 28)(SEC. ID. NO.: 99) (SEC. ID. NO.: 100)

>D1AA4507

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
 INTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
 FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLST
 YMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL
 MTNMDPVDATATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS (SEC. ID. NO.: 32)

Anticuerpo Dividido PRIT con DOTAM-VL -P1AD8592

>:D1AA4506

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
 INTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
 FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

VLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYS
 DNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
 PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK (SEC. ID. NO.: 33)

>:D1AC4023

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
 INTKTGEATYVEEFKGRVFTTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
 FAYYVEAMDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEC. ID.
 NO.: 30, 97)

b) Plásmido de expresión para cadenas ligeras de anticuerpos

Los genes que codifican la cadena ligera del anticuerpo que comprenden una cadena ligera del anticuerpo completa y funcional se ensamblaron mediante la fusión de un fragmento de ADN que codifica los elementos de secuencia respectivos.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de una cadena ligera de anticuerpo comprendía, además del fragmento de cadena ligera del anticuerpo, un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. La unidad de transcripción del fragmento de cadena ligera del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P–CMV), incluido el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina humana de cadena pesada (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo (VL–CL), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH pA).

La secuencia de aminoácidos del fragmento de cadena ligera de anticuerpo maduro es la misma tanto para P1AD8592 como para P1AD8749.

>D1AA3384

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYS
 ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG
 QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSFNRGEC (SEC. ID. NO.: 34), (SEC. ID. NO.: 103), (SEC. ID. NO.: 115)

Expresión transitoria de las moléculas de anticuerpos

Las moléculas de anticuerpo se generaron en células HEK293 transfectadas transitoriamente (derivadas de la línea celular de riñón embrionario humano 293) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección "293–libre" (Novagen). Las moléculas de cadena pesada y ligera del anticuerpo respectivo como se describió anteriormente se expresaron a partir de plásmidos de expresión individuales. Las transfecciones se realizaron como se especifica en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivos celulares que contenían inmunoglobulina se recogieron de tres a siete (3–7) días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida (por ejemplo, –80°C) hasta la purificación.

Información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, las células HEK293 se proporciona en: Meissner, P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197–203.

Los hemicuerpos PRIT (anticuerpos divididos) se purificaron mediante MabSelect Sure (cromatografía de afinidad) y seguido de Superdex 200 (cromatografía de exclusión por tamaño). Para el anticuerpo dividido PRIT con DOTAM–VL –P1AD8592 se produjeron 5 mg con una concentración de 1,372 mg/ml y una pureza > 96% basada en SEC analítica y CE–SDS. Para el anticuerpo dividido PRIT con DOTAM–VH – P1AD8749 se produjeron

14mg con una concentración de 2,03mg/mL y una pureza > 91% basada en SEC analítica y CE-SDS.

Los anticuerpos P1AE4956 y P1AE4957 también se generaron y sus secuencias se proporcionan en el presente documento. (P1AE4956 tiene cadenas pesadas de SEC. ID. NO: 51 y 52 y la cadena ligera de SEC. ID. NO: 54; P1AE4957 tiene cadenas pesadas de SEC. ID. NO 55 y 56 y la cadena ligera de SEC. ID. NO: 58). Para el anticuerpo dividido PRIT con DOTAM-VL –P1AE4957 se produjeron 19 mg con una concentración de 2,6mg/mL y una pureza > 81,6% basada en SEC analítica y CE-SDS. Para el anticuerpo dividido PRIT con DOTAM-VH – P1AE4956 se produjeron 6,9 mg con una concentración de 1,5mg/mL y una pureza > 90% basada en SEC analítica y CE-SDS. Se utilizó ESI-MS para confirmar la identidad de los hemicuerpos PRIT.

Ejemplo 5: Análisis FACS de la Funcionalidad de Anticuerpo Dividido

Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos divididos o hemicuerpos, las células MKN-45 se separaron del recipiente de cultivo utilizando acutasa a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces en PBS y se sembraron en placas con fondo en V de 96 pocillos hasta una densidad final de 4×10^6 células/pocillo.

Los hemicuerpos P1AD8749 y P1AD8592 y un control ISO humano se mezclaron 1: 1 a las células en concentraciones como se indica en la Fig. 5. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en hielo y se lavaron dos veces en PBS. El sedimento celular se resuspendió y se agregaron 40 µl/pocillo de reactivo de detección, ya sea <IgG humana (H + L)> FITC, (10 µg/ml) o Pb_Dotam_FITC 1: 100 => (10 µg/ml) en PBS/5% FCS. Después de 60 minutos de incubación en hielo, las células se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en 200 µl de PBS/5% de FCS para medir la fluorescencia de FITC utilizando un canto de FACS.

Para evaluar la capacidad de unión de los hemicuerpos a CEA en las células MKN-45, se detectaron utilizando anticuerpos utilizando anticuerpos secundarios específicos de IgG humana (Figura 5). Como se esperaba, no se observa una unión significativa del control ISO humano en estas células. Cuando se ajusta a la misma concentración de IgG, ambos hemicuerpos y la combinación de ambos muestran una unión dependiente de la dosis a las

células MKN-45, con un efecto gancho pronunciado a concentraciones muy altas como se esperaba. Este experimento demuestra que la unión de CEA es funcional en los hemicuerpos.

Para evaluar la capacidad de unión de los hemicuerpos a DOTAM, se unieron a las células en presencia de un control ISO humano o su respectivo compañero de anticuerpo dividido en una proporción 1: 1. Después de su unión a las células MKN-45, las células se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido. Posteriormente, se agregó Pb-DOTAM-FITC (Pb-DOTAM marcado con fluorescencia) para detectar anticuerpos unidos a células competentes que se unen a DOTAM (Figura 6). Como se esperaba, no se observa FITC significativo en estas células cuando uno de los compañeros de anticuerpos divididos se combina con el control ISO humano. Solo una combinación de ambos hemicuerpos en una proporción 1: 1 muestra una señal de FITC dependiente de la dosis. Este experimento muestra que el sitio de unión de DOTAM se vuelve funcional cuando ambos hemicuerpos se unen en una célula.

EJEMPLO 6: ESTUDIOS *IN VIVO*

Ejemplo 6a: Materiales y métodos – General

Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por las autoridades locales (Comité Régional d’Ethique de l’Expérimentation Animale du Limousin [CREEAL], Laboratoire Départemental d’Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne). Se mantuvieron ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Charles River) bajo condiciones específicas y oportunistas libres de patógenos (SOPF) con ciclos diarios de luz y oscuridad (12 h/12 h), en línea con las pautas éticas. No se realizaron manipulaciones durante los primeros 5 días después de la llegada, para permitir que los animales se aclimaten al nuevo entorno. Los animales fueron controlados diariamente por síntomas clínicos y detección de eventos adversos.

Los xenoinjertos sólidos se establecieron mediante inyección subcutánea (SC) de células tumorales que expresan CEA en medios de cultivo celular mezclados 1: 1 con la matriz de membrana basal Corning® Matrigel® (factor de crecimiento reducido; cat No. 354230). Los volúmenes tumorales se estimaron mediante calibrado manual 3 veces por semana, calculado de acuerdo con la fórmula: $volumen = 0,5 \times largo \times ancho^2$. Se realizaron mediciones tumorales adicionales según sea necesario dependiendo de la tasa de crecimiento tumoral.

Los ratones fueron sacrificados antes del punto final programado si mostraban signos de agonía o dolor inevitables debido a la carga tumoral, los efectos secundarios de las inyecciones u otras causas. Las indicaciones de dolor, agonía o incomodidad incluyen, pero no se limitan a, pérdida aguda de peso corporal (BW), pelaje desaliñado, diarrea, postura encorvada y letargo. El BW de los animales tratados se midió 3 veces por semana, con mediciones adicionales según sea necesario según el estado de salud. Se proporcionó alimento húmedo a todos los ratones comenzando el día después de la inyección radiactiva, durante 7 días o hasta que todos los individuos se hubieran recuperado lo suficiente de cualquier pérdida aguda de BW. Los ratones cuya pérdida de peso corporal excedió el 20% de su peso corporal inicial o cuyo volumen tumoral alcanzó los 3000 mm³ fueron sacrificados de inmediato. Otros factores tomados en cuenta para la eutanasia por razones éticas fueron el estado del tumor (por ejemplo, áreas necróticas, fugas de sangre/líquido, signos de automutilación) y la apariencia general del animal (por ejemplo, pelaje, postura, movimiento).

Para minimizar la reingestión de orina/heces radiactivas, todos los ratones de estudio de eficacia se colocaron en jaulas con pisos de rejillas durante 4 horas después de la administración de ²¹²Pb–DOTAM, antes de ser transferidos a nuevas jaulas con base estándar. Todas las jaulas se cambiaron a las 24 horas después de la inyección (p.i.). Este procedimiento no se realizó para ratones sacrificados con fines de biodistribución dentro de las 24 horas posteriores a la inyección radiactiva.

Se recolectó sangre en el momento de la eutanasia del seno venoso utilizando sangrado retroorbital en ratones anestesiados, antes de la terminación por dislocación cervical seguida de recolección de tejido adicional para mediciones radioactivas y/o análisis histológico, según lo estipulado por los protocolos. Se documentaron condiciones inesperadas o anormales. Los tejidos recogidos para la fijación de formalina se pusieron inmediatamente en formalina amortiguada neutra al 10% (4°C) y luego se transfirieron a solución salina amortiguada con fosfato (PBS; 4°C) después de 5 días. Los órganos y los tejidos recolectados con fines de biodistribución se pesaron y midieron para determinar la radiactividad utilizando un contador gamma automático 2470 WIZARD² (PerkinElmer), y el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) se calculó posteriormente, incluidas las correcciones para la descomposición y el fondo.

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) y JMP 12 (SAS Institute Inc.). El análisis de curvas de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se realizó en base a los volúmenes tumorales medios utilizando la fórmula :

$$\text{TGI} = 100 - \frac{V_{\text{tratamiento},d} - V_{\text{tratamiento},0}}{V_{\text{ref},d} - V_{\text{ref},0}} \times 100$$

donde d indica el día de estudio y 0 el valor de referencia. El vehículo fue seleccionado como grupo de referencia. La regresión tumoral (TR) se calculó de acuerdo con:

$$\text{TR} = \frac{V_{\text{tratamiento},0} - V_{\text{tratamiento},d}}{V_{\text{tratamiento},0}}$$

donde los valores positivos indicaron regresión tumoral y valores por debajo de -1 crecimiento más allá del doble valor basal.

Compuestos de ensayo

Los compuestos utilizados en los estudios descritos se presentan en las tablas a continuación, respectivamente para anticuerpos biespecíficos, agentes de eliminación y quelatos radiomarcados.

CEA-DOTAM (RO7198427, PRIT-0213) es un BsAb completamente humanizado dirigido al epítipo T84.66 de CEA, mientras que DIG-DOTAM (RO7204012) es un BsAb sin unión a CEA utilizado como control negativo. P1AD8749, P1AD8592, P1AE4956 y P1AE4957 son anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL dirigidos a los epítopos CH1A1A o A5B7 de CEA. Todos los constructos de anticuerpos se almacenaron a -80°C hasta el día de la inyección cuando se descongelaron y se diluyeron en buffer de vehículo estándar (histidina 20 mM, NaCl 140 mM; pH 6,0) o NaCl al 0,9% a sus respectivas concentraciones finales por vía intravenosa (IV) o administración intraperitoneal (IP).

El Pb-DOTAM-dextrano-500 CA (RO7201869) se almacenó a -20°C hasta el día de la inyección cuando se descongeló y se diluyó en PBS para administración IV o IP.

El quelato DOTAM para el radiomarcaje fue proporcionado por Macrocyclics y mantenido a -20°C antes del radiomarcaje, realizado por Orano Med (Razès, Francia). Se generó ^{212}Pb -DOTAM (RO7205834) por elución con DOTAM de un generador de torio, y posteriormente se inactivó con Ca después del marcado. La solución ^{212}Pb -DOTAM se

diluyó con NaCl al 0,9% para obtener la concentración de actividad ^{212}Pb deseada para inyección IV.

Los ratones en los grupos de control de vehículo recibieron múltiples inyecciones de buffer de vehículo en lugar de BsAb, CA y ^{212}Pb -DOTAM.

Anticuerpos biespecíficos

Compuesto	Objetivo	Protocolos
CEA-DOTAM (RO7198427, PRIT-0213)	T84.66	144, 158, 160
DIG-DOTAM (RO7204012)	Digoxigenina	160
CEA-dividido-DOTAM-VH P1AD8749	CH1A1A	144, 158
CEA-dividido-DOTAM-VH-AST P1AF0171	CH1A1A	175, 185, 189
CEA-dividido-DOTAM-VL P1AD8592	CH1A1A	144, 158, 175, 185, 189
CEA-dividido-DOTAM-VH P1AE4956	A5B7	158
CEA-dividido-DOTAM-VL P1AE4957	A5B7	158
CEA-dividido-DOTAM-VH-AST P1AF0298	T84.66	185, 189
CEA-dividido-DOTAM-VL P1AF0709	T84.66	185, 189

Agentes de eliminación

Compuesto	Protocolos
Ca-DOTAM-dextrano-500 (RO7201869)	144, 158, 160

Quelatos radiomarcados

Compuesto	Inactivación	Protocolos
^{212}Pb -DOTAM (RO7205834)	Ca	144, 158, 160, 175, 185, 189
^{212}Pb -DOTAM-CEA- DOTAM	Ca	160

Modelos tumorales

La línea celular tumoral utilizada y la cantidad inyectada para la inoculación en ratones se describe en la tabla a continuación. BxPC3 es una línea celular de adenocarcinoma pancreático primario humano, que expresa CEA de forma natural. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640, suplemento GlutaMAX™, HEPES (Gibco, ref. No. 72400-021) enriquecido con suero bovino fetal al 10% (GE Healthcare Hyclone SH30088.03). Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección subcutánea de células en medios RPMI mezclados 1: 1 con matriz de membrana basal Corning® Matrigel® (factor de crecimiento reducido; cat No. 354230), en el flanco derecho.

Líneas celulares tumorales

Línea celular	Células por ratón	Volumen inyectado	Protocolos	Proveedor
BxPC3	5×10^6	100 μL	144, 158, 160, 175, 185, 189	ECACC*

* Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (Salisbury, UK)

EJEMPLO 6b: Protocolo 144

El objetivo del protocolo 144 era proporcionar datos de distribución PK e *in vivo* de ^{212}Pb -DOTAM pre-dirigido en ratones SCID que portaban tumores SC BxPC3 después de PRIT de 2 pasos utilizando CEA-dividido-DOTAM-VH/VL BsAbs.

El PRIT en dos pasos se realizó mediante inyección de CEA-dividido-DOTAM-VH y CEA-dividido-DOTAM-VL (P1AD8749 y P1AD8592), por separado o en conjunto, seguido 7 días después por ^{212}Pb -DOTAM. Los ratones se sacrificaron 6 horas después de la inyección radioactiva, y se extrajeron sangre y órganos para la medición radiactiva. El esquema de 2 pasos se comparó con el PRIT de 3 pasos utilizando el anticuerpo biespecífico

estándar CEA–DOTAM, seguido 7 días después por Ca–DOTAM–dextrano–500 CA y ^{212}Pb –DOTAM 24 horas después de CA.

Los datos de PK de la eliminación CEA–dividido–DOTAM–VH/VL se recogieron mediante muestras repetidas de sangre de 1 hora a 7 días después de la inyección de anticuerpos, y posteriormente se analizaron mediante un ELISA.

El esquema del estudio se muestra en la Figura 7. La Figura 7a muestra el esquema del régimen PRIT de 2 pasos, que incluye el muestreo de sangre para CEA–dividido–DOTAM–VH/VL PK, en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3. La Figura 7b muestra el esquema del régimen PRIT de 3 pasos, realizado en ratones SCID que portan tumores SC BxPC3 (h = horas, d = días).

Diseño del estudio

El curso temporal y el diseño del protocolo 144 se muestran en las tablas a continuación.

Curso temporal del protocolo 144

Día de estudio	Fecha	Procedimiento experimental
0	02–05–2018	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas.
0	02–05–2018	Inyección SC de células BxPC3
14	16–05–2018	Inyección IV de CEA – DOTAM BsAb (grupo D)
15	17–05–2018	Inyección IV de BSA – dividido – DOTAM – VH/VL BsAbs (grupos Aa, Ab, Ba, Bb, Ca, Cb)
15	17–05–2018	Hemorragia retro–orbital (1 y 4 h p.i.; grupos Aa, Ba, Ca y Ab, Bb, Cb, respectivamente)
16	18–05–2018	Sangrado retro–orbital (24 h p.i.; grupos Aa, Ba, Ca)
18	20–05–2018	Sangrado retro–orbital (72 h p.i.; grupos Ab, Bb, Cb)
21	23–05–2018	Inyección IV de CA (grupo D)
21	23–05–2018	Elución de ^{212}Pb – DOTAM y llenado de jeringas
22	24–05–2018	Inyección IV de ^{212}Pb – DOTAM (grupos Aa, Ba, Ca, D)
22	24–05–2018	Sangrado retro–orbital (168 h p.i.) y eutanasia (grupos Ab, Bb, Cb)
22	24–05–2018	Eutanasia y recolección de tejidos, incl. sangrado retro–orbital

		(6 h p.i.) + conteo gamma (grupos Aa, Ba, Ca, D)
--	--	--

Grupos de estudio en protocolo 144

Grupo	P1AD8749 (VH) CH1A1A (μg)	P1AD8592 (VL) CH1A1A (μg)	CEA-DOTAM BsAb (μg)	PK (h p.i.)	CA (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (h p.i.)	n (ratones)
Aa	100	0	0	1, 24, 168	0	10	6	4
Ab	100	0	0	4, 72, 168	0	0	—	4
Ba	0	100	0	1, 24, 168	0	10	6	4
Bb	0	100	0	4, 72, 168	0	0	—	4
Ca	100	100	0	1, 24, 168	0	10	6	4
Cb	100	100	0	4, 72, 168	0	0	—	4
D	0	0	100	—	25	10	6	4

Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 26) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Catorce días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 116 mm^3 . El ^{212}Pb -DOTAM se inyectó el día 22 después de la inoculación; el volumen tumoral promedio fue de 140 mm^3 en el día 21.

Se recogió sangre de ratones en los grupos Aa, Ba y Ca mediante sangrado retroorbital bajo anestesia 1 h (ojo derecho), 24 h (ojo izquierdo) y 168 h (ojo derecho, en la terminación) después de la inyección de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL. Del mismo modo, se tomaron muestras de ratones en los grupos Ab, Bb y Cb 4 h (ojo derecho), 72 h (ojo izquierdo) y 168 h (ojo derecho, al final) después de la inyección de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL.

Los ratones de los grupos Aa, Ba, Ca y D se sacrificaron y se les realizó una autopsia 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, y se recolectaron los siguientes órganos y tejidos para medir el contenido radiactivo: sangre, piel, vejiga, estómago, intestino delgado, colon, bazo, páncreas, riñones, hígado, pulmón, corazón, hueso femoral, músculo, cerebro, cola, orejas y tumor.

Resultados

La acumulación y eliminación promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 6 horas después de la inyección se muestra en la Figura 8. La segmentación previa con CEA-

dividido-DOTAM-VH o CEA-dividido-DOTAM-VL solo no produjo acumulación de radiactividad en los tumores. Combinados, los dos anticuerpos complementarios resultaron en una absorción tumoral después de un PRIT de 2 pasos de $65 \pm 12\%$ ID/g, para compararlo con $87 \pm 15\%$ de ID/g para el régimen PRIT estándar de 3 pasos. El análisis de varianza bidireccional (ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que la diferencia en la captación tumoral entre los dos tratamientos PRIT fue significativa, al igual que la diferencia en la vejiga ($1 \pm 2\%$ ID/g y $38 \pm 17\%$ ID/g para PRIT de 2 y 3 pasos, respectivamente); ninguna otra diferencia en la acumulación de tejido fue estadísticamente significativa con esta prueba ($p = 0,05$).

En la Figura 9 se muestra la eliminación de los constructos de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL inyectados IV según se analizó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Eventos adversos y toxicidad

No hubo eventos adversos o toxicidad asociados con este estudio.

Conclusión

Los resultados del estudio demostraron la prueba de concepto de pre-direccionamiento de 2 pasos independiente de CA utilizando anticuerpos complementarios CEA-dividido-DOTAM-VH/VL. Se logró una captación tumoral alta y específica de ^{212}Pb -DOTAM utilizando PRIT de 2 pasos y PRIT estándar de 3 pasos, con muy poca acumulación de radiactividad en tejidos normales utilizando los anticuerpos complementarios CEA-dividido-DOTAM-VH/VL.

Ejemplo 6c: Protocolo 158

El objetivo del protocolo 158 era evaluar la asociación de ^{212}Pb -DOTAM con tumores BxPC3 subcutáneos en ratones pre-dirigidos por pares bi-paratópicos (CH1A1A y A5B7) de anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL para la eliminación de dos pasos independientes del agente CEA-PRIT. La captación tumoral se comparó con la de CEA-PRIT estándar de 3 pasos.

Los ratones que portaban tumores subcutáneos de BxPC3 fueron inyectados con

- Anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL seguidos 7 días después por el ^{212}Pb -DOTAM radiomarcado (PRIT de 2 pasos), o

- CEA–DOTAM BsAb seguido 7 días después por el CA, y finalmente el ^{212}Pb –DOTAM radiomarcado 24 horas después (PRIT de 3 pasos).

La distribución *in vivo* de ^{212}Pb –DOTAM se evaluó 6 horas después de la inyección radioactiva. El esquema del estudio se muestra en la Figura 10.

Diseño del estudio

El curso temporal y el diseño del protocolo 158 se muestran en las tablas a continuación.

Curso temporal del protocolo 158

Día de estudio	Fecha	Procedimiento experimental
0	26/11/2018	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas
0	26/11/2018	Inyección SC de células BxPC3
15	11/12/2018	Inyección IV de CEA – DOTAM BsAb (grupo C)
16	12/12/2018	Inyección IV de CEA–dividido–DOTAM–VH/VL BsAbs (grupos A, B)
22	18/12/2018	Inyección IV de CA (grupo C)
22	18/12/2018	Elución de ^{212}Pb – DOTAM y llenado de jeringas
23	19/12/2018	Inyección IV de ^{212}Pb – DOTAM (todos)
23	19/12/2018	Eutanasia y recolección de tejidos, incl. sangrado retro-orbital (6 h p.i.) + conteo gamma (todos)

Grupos de estudio en protocolo 158

Group	P1AD8749 (VH) CH1A1A (µg)	P1AD8592 (VL) CH1A1A (µg)	P1AE4956 (VH) A5B7 (µg)	P1AE4957 (VL) A5B7 (µg)	CEA–DOTAM BsAb (µg)	CA (µg)	^{212}Pb (µCi)	n (ratones)
A	154*	0	0	100	0	0	10	4
B	0	100	167**	0	0	0	10	4
C	0	0	0	0	100	25	10	4

* La dosis de P1AD8749 se ajustó a 154 µg para compensar una impureza de ojal/oyal del 35%

** P1AD8592 dosis ajustada a 167 µg para compensar un 40% de impureza ojal/oyal.

Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 27) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Catorce días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 177 mm^3 . El ^{212}Pb -DOTAM se inyectó el día 20 después de la inoculación; el volumen tumoral promedio fue de 243 mm^3 en el día 21.

Los ratones de todos los grupos se sacrificaron y se les realizó una autopsia 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, y se extrajeron los siguientes órganos y tejidos para medir el contenido radiactivo: sangre, piel, vejiga, estómago, intestino delgado, colon, bazo, páncreas, riñones, hígado, pulmón, corazón, hueso femoral, músculo, cerebro, cola y tumor.

Resultados

La distribución promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 6 horas después de la inyección se muestra en la Figura 11. El ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que no hubo una diferencia significativa en la absorción de tejido normal de ^{212}Pb entre los tres tratamientos, excepto en la vejiga, donde ambos pares bi-paratópicos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL produjeron una acumulación menor que el PRIT estándar de 3 pasos. La captación renal fue de 3–4% ID/g para los tres tratamientos. Cualquiera de las combinaciones bi-paratópicas resultó en una acumulación tumoral de aproximadamente 56% ID/g, en comparación con 67% ID/g para PRIT de 3 pasos; La diferencia entre PRIT de 2 y 3 pasos fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

Eventos adversos y toxicidad

No hubo eventos adversos o toxicidad asociados con este estudio.

Conclusión

Este estudio evaluó la asociación de ^{212}Pb -DOTAM con tumores SC BxPC3 en ratones pre-dirigidos por pares bi-paratópicos de anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL para CEA-PRIT independiente de CA de 2 pasos, en comparación con PRIT estándar de 3 pasos. La distribución de ^{212}Pb 6 horas después de la inyección fue comparable para PRIT de 2 y 3 pasos, con alta acumulación en el tumor y muy poca radiactividad en tejidos sanos. Esto demostró la prueba del concepto de pretratamiento bi-paratópico de tumores que

expresan CEA para CEA-PRIT de 2 pasos utilizando anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL.

Ejemplo 6d: Protocolo 160

El objetivo del protocolo 160 era comparar la eficacia terapéutica después de 3 ciclos de CEA-PRIT independiente de CA de 2 pasos utilizando anticuerpos complementarios CEA-dividido-DOTAM-VH/VL, con la de CEA-PRIT estándar de 3 pasos en ratones con tumores SC BxPC3. También se realizó una comparación con CEA-RIT de 1 paso, utilizando BsAbs que se incubaron previamente con ^{212}Pb -DOTAM antes de la inyección.

Los ratones que portaban tumores SC BxPC3 fueron inyectados con

- CEA-DOTAM BsAb seguido 7 días después por el CA, y finalmente el ^{212}Pb -DOTAM radiomarcado 24 horas después (PRIT de 3 pasos),
- Anticuerpos CEA-dividido-DOTAM-VH/VL seguidos 7 días después por el ^{212}Pb -DOTAM radiomarcado (PRIT de 2 pasos), o
- ^{212}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM BsAb (preincubado; RIT de 1 paso).

La terapia se administró en 3 ciclos repetidos de 20 μCi de ^{212}Pb -DOTAM, que también incluye la comparación con un anticuerpo de control de unión no CEA (DIG-DOTAM), y ningún tratamiento (vehículo). Se sacrificaron ratones dedicados con fines de biodistribución para confirmar la selección y eliminación de ^{212}Pb -DOTAM en cada ciclo de tratamiento. La eficacia del tratamiento se evaluó en términos de TGI y TR, y los ratones se monitorizaron cuidadosamente durante la duración del estudio para evaluar la tolerabilidad del tratamiento. El esquema del estudio se muestra en la Figura 12.

El curso temporal y el diseño del protocolo 160 se muestran en las tablas a continuación.

Curso temporal del protocolo 160

Día de estudio	Fecha	Procedimiento experimental
0	29-01-2019	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas
0	29-01-2019	Inyección SC de células BxPC3

15	13-02-2019	Inyección IP de BsAb o buffer de histidina (grupos A, B, C, F, G, H, I)
16	14-02-2019	Inyección IP de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL o buffer histidina (grupos D, J, K, L)
22	20-02-2019	Inyección IP de CA o PBS (grupos A, B, C, F, G, H, I)
23	21-02-2019	Elución de ^{212}Pb -DOTAM y llenado de jeringas
23	21-02-2019	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM o buffer histidina (grupos E, M)
23	21-02-2019	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM o 0,9% NaCl (grupos B, C, D, F, G, H, I, J, K, L)
24	22-02-2019	Eutanasia y recolección de tejidos (24 h p.i.) + conteo gamma (grupos F, G, J, M)
29	27-02-2019	Inyección IP de PRIT BsAb o PBS (grupos A, B, C, H, I)
30	28-02-2019	Inyección IP de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL o buffer histidina (grupos D, K, L)
36	06-03-2019	Inyección IP de CA o PBS (grupos A, B, C, H, I)
37	07-03-2019	Elución de ^{212}Pb -DOTAM y llenado de jeringas
37	07-03-2019	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM o 0,9% de NaCl (grupos B, C, D, H, I, K, L)
38	08-03-2019	Eutanasia y recolección de tejidos (24 h p.i.) + conteo gamma (grupos H, K)
43	13-03-2019	Inyección IP de PRIT BsAb o PBS (grupos A, B, C, I)
44	14-03-2019	Inyección IP de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL o buffer de histidina (grupos D, L)
50	20-03-2019	Inyección IP de CA o PBS (grupos A, B, C, I)
51	21-03-2019	Elución de ^{212}Pb -DOTAM y llenado de jeringas
51	21-03-2019	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM o 0,9% de NaCl (grupos B, C, D, I, L)
52	22-03-2019	Eutanasia y recolección de tejidos (24 h p.i.) + conteo gamma (grupos I, L)

Grupos de estudio en protocolo 160

Grupo	BsAb	BsAb por ciclo (μg)	CA por ciclo (μg)	^{212}Pb – DOTAM por ciclo (μCi)	Ciclos (#)	n (ratones)
A	—	0	0	0	3	10
B	DIG–DOTAM	100	25	20	3	10
C	CEA–DOTAM	100	25	20	3	10
D	CEA–dividido– DOTAM	154* 100**	+ 0	20	3	10
E	^{212}Pb – DOTAM– CEA–DOTAM	100	0	20	1***	10
F	DIG–DOTAM	100	25	20	1	3
G	CEA–DOTAM	100	25	20	1	3
H	CEA–DOTAM	100	25	20	2	3
I	CEA–DOTAM	100	25	20	3	3
J	CEA–dividido– DOTAM	154* 100**	+ 0	20	1	3
K	CEA–dividido– DOTAM	154* 100**	+ 0	20	2	3
L	CEA–dividido– DOTAM	154* 100**	+ 0	20	3	3
M	^{212}Pb – DOTAM– CEA–DOTAM	100	0	20	1	3

*P1AD8749: dosis ajustada a 154 μg para compensar una impureza de 35% ojal/oyal en la solución de stock; ** P1AD8592; *** Ajustado de 3 ciclos a 1 ciclo debido a la toxicidad aguda inducida por la radiación en el primer ciclo de tratamiento.

Se establecieron xenoinjertos sólidos en ratones SCID el día del estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 24) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Quince días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 122 mm^3 . El ^{212}Pb –DOTAM se inyectó el día 23 después de la inoculación; el volumen tumoral promedio fue de 155 mm^3 el día 22.

Los anticuerpos CEA–DOTAM y DIG–DOTAM se diluyeron en el buffer del vehículo hasta una concentración final de 100 μg por 200 μL para la administración de IP de acuerdo con la tabla anterior (Grupos de estudio en el protocolo 160). Los anticuerpos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL se mezclaron en una única solución de inyección para administración IP, que contenía 100 μg de cada constructo por 200 μL . Para P1AD8749, la dosificación se ajustó a 154 μg para compensar un 35% de impureza de ojal/oyal en la solución de stock (el lado de la molécula que no porta el VH/VL). El Ca–DOTAM–dextrano–

500 CA se administró IP (25 µg por 200 µL de PBS) 7 días después de la inyección de BsAb, seguido 24 horas después por ^{212}Pb -DOTAM (RO7205834) de acuerdo con el programa experimental en la Figura 12. Los ratones tratados con PRIT (2 y 3 etapas) se inyectaron por vía intravenosa con 100 µl de la solución ^{212}Pb -DOTAM inactivada con Ca (20 µCi en 100 µl de NaCl al 0,9%).

Los ratones tratados con RIT de 1 paso recibieron solo una inyección: ^{212}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM previamente unido (20 µCi/20 µg BsAb en 100 µL NaCl al 0,9% para inyección IV). El anticuerpo marcado directamente se preparó incubando el ^{212}Pb -DOTAM con el CEA-DOTAM BsAb durante 10 minutos a 37°C.

Los siguientes órganos y tejidos se extrajeron de ratones en los grupos A-E en el momento de la eutanasia: suero, hígado, bazo, riñones, páncreas y tumor. Antes de la eutanasia, el ratón vivo fue anestesiado para la recolección de sangre retroorbital. Las muestras de sangre recogidas se centrifugaron a 10 000 rcf durante 5 minutos y las fracciones de suero resultantes se aislaron, congelaron y almacenaron a -20°C. Los tejidos extirpados se pusieron inmediatamente en formalina amortiguada neutra al 10% (4°C) y luego se transfirieron a 1X PBS (4°C) después de 24 horas. Las muestras fijadas en formalina se enviaron a Roche Pharma Research and Early Development, Roche Innovation Center Basel, para su posterior procesamiento y análisis.

Los ratones de los grupos F, G, J y M se sacrificaron y se les realizó una autopsia 24 horas después de su primera y única inyección de ^{212}Pb -DOTAM o ^{212}Pb -DOTAM-BsAb; los grupos H y K fueron sacrificados y necropsiados 24 horas después de su segunda inyección de ^{212}Pb -DOTAM; Los grupos I y L se sacrificaron y se les realizó una autopsia 24 horas después de su tercera inyección de ^{212}Pb -DOTAM. Se recogió sangre en el momento de la eutanasia del seno venoso utilizando sangrado retroorbital en ratones anestesiados, antes de la terminación por dislocación cervical. Los siguientes órganos y tejidos también se recolectaron con fines de biodistribución: vejiga, bazo, riñones, hígado, pulmón, músculo, cola, piel y tumor.

Resultados

La acumulación y eliminación promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 24 horas después de la inyección se muestra para cada terapia y ciclo de tratamiento en la Figura 13. El control negativo no produjo absorción (0,4% ID/g) en el tumor. El análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que las distribuciones no fueron significativamente diferentes en ningún ciclo para el PRIT de 2 y 3

pasos; sin embargo, las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los ciclos en comparación con el control negativo y el RIT de 1 paso ($p < 0,05$). La captación tumoral fue de 25–45% ID/g para PRIT de 3 pasos y 25–30% ID/g para PRIT de 2 pasos, sin ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento o el ciclo. Para RIT de 1 paso, la captación del tumor fue del 99% en el único ciclo de tratamiento. La absorción en los tejidos normales fue muy baja para ambos regímenes PRIT, pero significativamente mayor en todos los órganos y tejidos después de la RIT de 1 paso, debido al tiempo de circulación mucho más prolongado del anticuerpo preincubado en comparación con el pequeño quelato DOTAM radiomarcado.

El desarrollo tumoral promedio y las curvas de crecimiento tumoral individuales se muestran en la Figura 14 y la Figura 15, respectivamente. Los tumores en el grupo de vehículos no tratados y el grupo DIG–DOTAM crecieron de manera constante, aunque con una tasa de duplicación ligeramente menor en el último después del tercer tratamiento. En contraste, los tumores en los grupos PRIT y RIT disminuyeron de tamaño después del primer ciclo de tratamiento, y mantuvieron el control del tumor hasta aproximadamente 10 semanas después de la inoculación, cuando los tumores comenzaron a aumentar de tamaño. Los tratamientos PRIT de 2 y 3 pasos resultaron en un control tumoral casi idéntico. Ningún tumor retrocedió por completo.

En el día de estudio 83, el último día en donde se pudieron analizar todos los grupos de tratamiento con base en los medios, el TGI fue 91,7% y 88,4% para PRIT utilizando CEA–DOTAM (3 pasos) y CEA–dividido–DOTAM–VH/VL (2 pasos), respectivamente, en comparación con el control del vehículo. El número correspondiente para RIT de 1 paso fue del 72,6%, mientras que el TGI fue del –59,7% para el control no específico DIG–DOTAM. El mismo día, el TR basado en los medios fue –1,9 para CEA–DOTAM PRIT de 3 pasos, –2,9 para CEA–dividido–DOTAM–VH/VL PRIT de 2 pasos, –4,7 para RIT de 1 paso, –28,8 para DIG–DOTAM PRIT, y –39,3 para el control del vehículo.

Debido a los eventos adversos descritos a continuación, el análisis de supervivencia no se consideró estadísticamente relevante.

Eventos adversos y toxicidad

El desarrollo de BW en todos los grupos de terapia se muestra en la Figura 16. Los múltiples ciclos de PRIT de 2 y 3 pasos con 20 μCi de ^{212}Pb –DOTAM fueron bien tolerados,

pero se produjo una pérdida aguda de BW en ratones que recibieron RIT de 1 paso, con 8/10 ratones en el grupo E sacrificados después del primer ciclo RIT (6–11 días después de la irradiación de ^{212}Pb) debido a una caída en el peso corporal del 20% o más. Los 2 ratones RIT restantes no recibieron ninguna inyección adicional de ^{212}Pb –DOTAM–CEA–DOTAM, pero se les dio seguimiento continuo para evaluar el crecimiento tumoral.

Además, se sacrificaron varios ratones por razones éticas debido a la disminución del estado del tumor, es decir, tumores que se abren o tienen fugas. En el grupo DIG–DOTAM, se sacrificaron 9/10 ratones antes de alcanzar un volumen tumoral de 3000 mm^3 por este motivo; para el control del vehículo no tratado, el número correspondiente fue 5/10. El problema fue menos pronunciado en los grupos PRIT y RIT, con 1/10, 2/10 y 2/10 ratones sacrificados por esta razón en los grupos PRIT de 3 pasos, PRIT de 2 pasos y RIT de 1 paso, respectivamente. Esto se refleja en las curvas de crecimiento tumoral individuales en la Figura 15.

Finalmente, 1 ratón en el grupo C fue sacrificado debido a una herida degradante debajo del ano.

Todos los eventos adversos se enumeran en la tabla a continuación.

Eventos adversos en el protocolo 160

Grupo	Ratones sacrificados (n por grupo)	Día de estudio	Razón de terminación
A: Vehículo	5(10)	53, 71, 71, 73, 75	Disminución del estado del tumor
B : DIG–DOTAM	9(10)	55, 55, 55, 55, 61, 73, 73, 73, 74	Disminución del estado del tumor
C : CEA –DOTAM	1(10)	83	Herida debajo del ano
C : CEA –DOTAM	1(10)	85	Disminución del estado del tumor
D : CEA–dividido–DOTAM	2(10)	83, 83	Disminución del estado del tumor
E : ^{212}Pb –DOTAM–CEA–DOTAM	8(10)	29, 29, 30, 31, 31, 32, 32, 34	Pérdida de peso corporal $\geq 20\%$
E : ^{212}Pb –DOTAM–CEA–DOTAM	2(10)	83, 83	Disminución del estado del tumor

Se realizó una irradiación de ^{212}Pb el día 23 del estudio (ciclo 1), 37 (ciclo 2) y 51 (ciclo 3).

Conclusión

No se observó diferencia entre CEA–PRIT utilizando el esquema de 3 pasos (CEA–DOTAM BsAb, CA y ^{212}Pb –DOTAM) y el esquema de 2 pasos (anticuerpos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL y ^{212}Pb –DOTAM); el TGI fue significativo y casi idéntico para los dos tratamientos, y 3 ciclos de 20 μCi se pudieron administrar de forma segura en ambos casos. En contraste, 20 μCi de ^{212}Pb –DOTAM previamente unido a CEA–DOTAM antes de la inyección (RIT de 1 paso) no fue tolerado por una gran mayoría de los ratones tratados.

El estudio demostró así la tolerabilidad y la eficacia terapéutica del PRIT de 2 pasos independiente de CA utilizando los constructos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL desarrollados.

EJEMPLO 7: Protocolo 175

El objetivo del protocolo 175 era evaluar el impacto del aumento de la cantidad de anticuerpos inyectados antes del direccionamiento en la acumulación posterior de ^{212}Pb en tumores y tejidos sanos. Se compararon dos dosis diferentes de anticuerpos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL: la cantidad estándar (100 μg) y la dosis 2,5 veces mayor (250 μg). Además, se realizó una modificación en el constructo CEA–dividido–DOTAM–VH para extender su VH para evitar la formación de anticuerpos anti-fármaco (ADA) (esto se utilizó junto con un constructo CEA–dividido–DOTAM–VL previamente probado). El VH se extendió para comprender los primeros tres aminoácidos del dominio CH1 del anticuerpo: alanina, serina y treonina (AST), y el constructo en lo sucesivo denominado CEA–dividido–DOTAM–VH–AST.

El anticuerpo P1AD8592 ya se ha descrito anteriormente, en el ejemplo 4. P1AF0171 es el mismo que P1AD8749, excepto que la fusión HC se extiende por los residuos AST; por lo tanto, el anticuerpo P1AD0171 consiste en la cadena ligera D1AA3384 como se describió anteriormente (SEC. ID. NO: 34), la primera cadena pesada D1AC4022 como se describió anteriormente (SEC. ID. NO: 28), y una segunda cadena pesada D1AE3669 como se muestra a continuación:

D1AE3669 (HCbotón <CEA> CH1A1A Dotam–VH–AST)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWI
 NTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYY
 VEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL
 STYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTM
 TNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSAST (SEC. ID. NO.:
 147)

Los ratones que portaban tumores SC BxPC3 fueron inyectados con

- 1 × la dosis estándar de CEA–dividido–DOTAM–VH/VL BsAb seguido 7 días después por el ^{212}Pb –DOTAM radiomarcado, o
- 2,5 × la dosis estándar de CEA–dividido–DOTAM–VH/VL BsAb seguido 7 días después por el ^{212}Pb –DOTAM radiomarcado.

La distribución *in vivo* de ^{212}Pb –DOTAM se evaluó 24 horas después de la inyección radioactiva. El esquema del estudio se muestra en la figura 17.

Diseño del estudio

El curso de tiempo y el diseño del protocolo 175 se muestran a continuación.

Curso temporal del protocolo 175

Día de estudio	Procedimiento experimental
0	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas
0	Inyección SC de células BxPC3
22	Inyección IP * de BsAbs CEA–dividido–DOTAM–VH/VL
29	Elución de ^{212}Pb –DOTAM y llenado de jeringas
29	Inyección IV de ^{212}Pb –DOTAM
30	Eutanasia y recolección de tejidos (24 h p.i.) + conteo gamma

* Se requiere inyección IP debido a la baja concentración de compuesto (200 μL por constructo = 400 μL en total)

Grupos de estudio en protocolo 175

Grupo	P1AF0171 (VH-AST) (μg)	P1AD85 92 (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (h p.i.)	n (ratones)
A	143*	100	10	24	4
B	357*	250	10	24	4

* P1AF0171 dosis ajustada a 143 y 357 μg para compensar un $\sim 30\%$ de impureza de ojal/ojal.

Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 24) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Veintiún días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 310 mm^3 . El ^{212}Pb -DOTAM se inyectó el día 29 después de la inoculación; el volumen tumoral promedio fue de 462 mm^3 el día 30.

Todos los ratones fueron sacrificados y sometidos a necropsia 24 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, y los siguientes órganos y tejidos se recolectaron para medir el contenido radiactivo: sangre, piel, bazo, páncreas, riñones, hígado, músculo, cola y tumor.

Resultados

La distribución promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 24 horas después de la inyección se muestra en la Figura 18. No hubo diferencias significativas en la absorción de tejido tumoral o normal de ^{212}Pb entre los dos niveles de dosis. La acumulación de tumor fue $30\text{--}31\%$ ID/g para ambos grupos de tratamiento, con una captación renal de $<2\%$ ID/g en este momento. Un ratón tenía $\sim 1\%$ ID/g en la cola debido a problemas de inyección de ^{212}Pb -DOTAM, pero ningún otro tejido sano recogido mostró una acumulación apreciable de ^{212}Pb .

Eventos adversos y toxicidad

No hubo eventos adversos o toxicidad asociados con este estudio.

Conclusión

El aumento de la dosis de los anticuerpos de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL de pre-direccionamiento en 2,5 veces no mejoró la acumulación tumoral de ^{212}Pb -DOTAM administrado posteriormente en este modelo *in vivo*. Sin embargo, tampoco aumentó la acumulación de radiactividad en los tejidos normales, lo que destaca la fuerte especificidad lograda con este régimen de pre-direccionamiento de 2 pasos. Finalmente, los resultados verificaron la función del constructo extendido VH CEA-dividido-DOTAM-VH-AST.

EJEMPLO 8: Protocolo 185

El objetivo del protocolo 185 era evaluar un CEA-dividido-DOTAM-VH/VL dirigido al epítipo T84.66. Las secuencias de P1AF0709 y P1AF0298 se proporcionan en este documento. P1AF0709 tiene una primera cadena pesada de D1AE4688 (SEC. ID. NO: 83) y una segunda cadena pesada de D1AA4920 (SEC. ID. NO: 84). P1AF0298 tiene una primera cadena pesada de D1AE4687 (SEC. ID. NO: 86) y una segunda cadena pesada de D1AE3668 (SEC. ID. NO: 87). Ambos tienen la cadena ligera de D1AA4120 (SEC. ID. NO: 89).

Los ratones que portaban tumores SC BxPC3 fueron inyectados con la dosis estándar de CEA-dividido-DOTAM-VH/VL BsAb (100 μg por anticuerpo) seguido 6 días después por el ^{212}Pb -DOTAM radiomarcado. La distribución *in vivo* de ^{212}Pb -DOTAM se evaluó 6 horas después de la inyección radioactiva. El esquema del estudio se muestra en la figura 19.

Diseño del estudio

El curso de tiempo y el diseño del protocolo 185 se muestran a continuación.

Curso temporal del protocolo 185

Día de estudio	Fecha	Procedimiento experimental
0	04-03-2020	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas
0	04-03-2020	Inyección SC de células BxPC3
22	26-03-2020	Inyección IV de BsAbs CEA-dividido-DOTAM-VH/VL
27	31-03-2020	Elución de ^{212}Pb -DOTAM y llenado de jeringas

28	01-04-2020	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM
28	01-04-2020	Eutanasia y recolección de tejidos (6 h p.i.) + conteo gamma

Grupos de estudio en protocolo 185

Grupo	P1AF0298 T84.66 (VH-AST) (μg)	P1AF0709 T84.66 (VL) (μg)	P1AF0171 CH1A1A (VH-AST) (μg)	P1AD8592 CH1A1A (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (h p.i.)	n (ratones)
A	100	100	0	0	10	6	5
B	0	0	143*	100	10	6	5

* P1AF0171 dosis ajustada a 143 μg para compensar un $\sim 30\%$ de impureza ojal/oyal.

Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 27) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Veintidós días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 224 mm^3 . El ^{212}Pb -DOTAM se inyectó el día 28 después de la inoculación, momento en el cual el volumen tumoral promedio había alcanzado 385 mm^3 .

Todos los ratones fueron sacrificados y sometidos a necropsia 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, y los siguientes órganos y tejidos se recolectaron para medir el contenido radiactivo: sangre, piel, bazo, páncreas, riñones, hígado, músculo, cola y tumor. Los tumores recolectados se dividieron en dos partes: una se midió para determinar el contenido radiactivo y la otra se colocó en un criomolde que contenía medio de inclusión de temperatura de corte óptima (OCT) Tissue-Tek®, y se colocó en hielo seco para congelación rápida. Las muestras congeladas en OCT se mantuvieron a -80°C antes de la criosección, tinción de inmunofluorescencia y análisis utilizando un microscopio modular Zeiss Axio Scope.A1.

Resultados

La distribución promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 6 horas después de la inyección se muestra en la Figura 20. La acumulación de tumor fue 40% ID/g (CH1A1A) o 44% ID/g (T84.66). La única otra acumulación apreciable de radiactividad se encontró en los riñones: 3–5% ID/g a las 6 h p.i. para los dos grupos

En la Figura 21 se muestran ejemplos de la distribución intratumoral de pares CEA–dividido–DOTAM–VH/VL dirigidos a T84.66 (grupo A) o CH1A1A (grupo B). Los paneles A y C muestran que la expresión de CEA es alta y homogénea en tumores BxPC3, y los paneles B y D demuestran que la distribución de anticuerpos 7 días después de la inyección se distribuye de manera similar. Sin embargo, las muestras del grupo A mostraron una señal más fuerte en general, en comparación con las muestras tumorales del grupo B, lo que proporciona evidencia de que T84.66 es un aglutinante más fuerte que CH1A1A.

Eventos adversos y toxicidad

No hubo eventos adversos o toxicidad asociados con este estudio.

Conclusión

Los resultados verificaron la función de los constructos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL dirigidos al epítipo T84.66 de CEA. La acumulación resultante de ^{212}Pb en tumores que expresaron CEA pre–dirigidos fue alta y específica, y los pares CEA–dividido–DOTAM–VH/VL dirigidos al epítipo CH1A1A o T84.66 se distribuyeron homogéneamente dentro de los tumores que expresan CEA.

EJEMPLO 9: protocolo 189

El objetivo del protocolo 189 era evaluar los pares de anticuerpos bi–paratópicos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL dirigidos a T84.66 VH–AST/CH1A1A VL y T84.66 VL/CH1A1 VH–AST, en comparación con el par de control positivo que se dirige a CH1A1A VH–AST/VL. Esta combinación bi–paratópica impide la formación del aglutinante Pb–DOTAM completo en CEA soluble que solo expresa uno de los dos epítipos (por ejemplo, T84.66), mitigando así los posibles efectos adversos del mismo, como el aumento de la radiactividad circulante y la toxicidad inducida por la radiación asociada, y disminución de la eficacia de la competencia con objetivos fuera del tumor.

Los ratones que portaban tumores SC BxPC3 fueron inyectados con la dosis estándar de CEA–dividido–DOTAM–VH/VL BsAb (100 μg por anticuerpo) seguido 7 días después

por el ^{212}Pb -DOTAM radiomarcado. La distribución *in vivo* de ^{212}Pb -DOTAM se evaluó 6 horas después de la inyección radioactiva. El esquema del estudio se muestra en la Figura 22.

Diseño del estudio

El curso temporal y el diseño del protocolo 189 se muestran a continuación.

Curso temporal del protocolo ARCoLab 189

Día de estudio	Procedimiento experimental
0	Preparación de células BxPC3 y llenado de jeringas
0	Inyección SC de células BxPC3
15	Inyección IV de BsAbs CEA-dividido-DOTAM-VH/VL
21	Elución de ^{212}Pb -DOTAM y llenado de jeringas
22	Inyección IV de ^{212}Pb -DOTAM
22	Eutanasia y recolección de tejidos (6 h p.i.) + conteo gamma

Grupos de estudio en el protocolo ARCoLab 189

Grupo	P1AF0298 T84.66 (VH-AST) (μg)	P1AF0709 T84.66 (VL) (μg)	P1AF0171 CH1A1A (VH-AST) (μg)	P1AD8592 CH1A1A (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (h p.i.)	n (ratones)
A	100	0	0	100	10	6	5
B	0	100	143*	0	10	6	5
C	0	0	143*	100	10	6	3

* La dosis de P1AF0171 se ajustó a 143 μg para compensar un $\sim 30\%$ de impureza ojal/oyal.

Se establecieron xenoinjertos sólidos en cada ratón SCID en el día de estudio 0 mediante inyección SC de 5×10^6 células (paso 31) en RPMI/Matrigel en el flanco derecho. Catorce días después de la inyección de células tumorales, los ratones se clasificaron en grupos experimentales con un volumen tumoral promedio de 343 mm^3 . El ^{212}Pb -DOTAM se inyectó el día 22 después de la inoculación; el volumen tumoral promedio había alcanzado 557 mm^3 en el día 21.

Todos los ratones fueron sacrificados y sometidos a necropsia 6 horas después de la inyección de ^{212}Pb -DOTAM, y los siguientes órganos y tejidos se recolectaron para medir el contenido radiactivo: sangre, piel, bazo, páncreas, riñones, hígado, músculo, cola y tumor.

Resultados

La distribución promedio de ^{212}Pb en todos los tejidos recolectados 6 horas después de la inyección se muestra en la Figura 23. La acumulación tumoral de las variaciones bi-

paratópicas fue de 71% ID/g y 46% ID/g para T84.66 VH–AST + CH1A1A VL y T84.66 VL + CH1A1A VH–AST, respectivamente. El control positivo de CH1A1A resultó en 37% ID/g. El ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que los tres grupos eran significativamente diferentes entre sí en términos de absorción tumoral ($p < 0,0001$ para T84.66 VH–AST + CH1A1A VL versus los otros dos grupos; $p = 0,0020$ para T84.66 VL + CH1A1A VH–AST versus CH1A1A solamente). Ningún otro órgano mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque se indicó una retención ligeramente mayor en la sangre para la combinación T84.66 VH–AST + CH1A1A VL en comparación con los otros dos grupos: 2% ID/g en comparación con $<1\%$ ID/g. La captación renal fue similarmente ligeramente superior, aunque no estadísticamente significativa: 4,5% ID/g para T84.66 VH–AST + CH1A1A en comparación con 3% ID/g para los otros dos.

Eventos adversos y toxicidad

No hubo eventos adversos o toxicidad asociados con este estudio. Sin embargo, el crecimiento del tumor BxPC3 fue significativamente más rápido y con mayor variabilidad en este estudio en comparación con la tasa de crecimiento estándar. En la necropsia, se concluyó que los tumores grandes (la mayoría) se llenaron de líquido, que se vació cuando los tumores se cortaron por la mitad antes de la medición radiactiva; este líquido probablemente causó la tasa de crecimiento acelerada, pero no afectó el % IA/g en gran medida dado que los tumores se pesaron y midieron después de abrirse.

Conclusión

Los resultados verificaron la función del direccionamiento bi-paratópico de los epítomos T84.66 y CH1A1A de CEA utilizando los constructos CEA–dividido–DOTAM–VH/VL probados y demostraron una eficacia sorprendentemente alta para esta combinación en comparación con el control CH1A1A positivo. La acumulación resultante de ^{212}Pb en tumores que expresan CEA previamente dirigidos fue alta y específica, con indicaciones de una ventaja particular para el par T84.66 VH–AST + CH1A1A VL.

EJEMPLO 10

Estos ejemplos investigan el reclutamiento de Pb–DOTA a las células por anticuerpos divididos como se describe en el presente documento.

P1AF0712 tiene una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 97, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 98 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 103. P1AF0713 tiene una primera cadena pesada de SEC. ID. NO: 100, una segunda cadena pesada de SEC. ID. NO: 101 y una cadena ligera de SEC. ID. NO: 103.

Las células MKN-45 se separaron de la botella de cultivo utilizando tripsina y se contaron utilizando un contador de células Casy. Después de sedimentar a 4°C, 300 g las células se resuspendieron en buffer FACS (FCS al 2,5% en PBS), se ajustaron a $2,0 \times 10^6$ células/ml distribuidas en Placa inferior en V PP de 96 pocillos ($25 \mu\text{l/pocillo} = 5,0 \times 10^4$ Zellen/pocillo).

Tinción de FACS utilizando DOTA-FITC

Los anticuerpos SPLIT específicos de CEA (P1AF0712 o P1AF0713 respectivamente) se ajustaron a 40 $\mu\text{g/ml}$ en buffer FACS, dando como resultado una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Ambos anticuerpos se agregaron a las células combinadas o separadas y seguidas por buffer e incubadas a 4°C durante 1 h. Posteriormente, se agregó Pb-DOTA marcado con FITC a las células en una relación equimolar con respecto a los anticuerpos y se incubó durante 1 h a 4°C. Las células luego se lavaron dos veces en buffer FACS y se resuspendieron en buffer FACS 70 $\mu\text{l/pocillo}$ para medición utilizando un FACS Canto (BD, Pharmingen). Se mostró (Fig. 24) que ninguna de las mitades SPLIT estaba dando lugar a una señal de fluorescencia, lo que indica una falta de capacidad de unión de Pb-DOTA. Solo una combinación de ambas mitades SPLIT fue capaz de reclutar Pb-DOTAM-FITC para las células objetivo (Fig. 24).

Tinción de FACS utilizando <huIgG (H + L) A488>

Los anticuerpos SPLIT específicos de CEA (P1AF0712 o P1AF0713 respectivamente) se ajustaron a 40 $\mu\text{g/ml}$ en buffer FACS, dando como resultado una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Ambos anticuerpos se agregaron a las células separadas o seguidas por buffer o combinadas e incubadas a 4°C durante 1 h. Las células luego se lavaron dos veces en buffer FACS. Después del lavado, las células se resuspendieron en 50 μl de buffer FACS que contenía anticuerpo secundario (<huIgG (H + L)> – Alexa488, c = 10 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron 1 hora a 4°C. Las células luego se lavaron dos veces en buffer FACS y se resuspendieron en buffer FACS de 70 $\mu\text{l/pocillo}$ para medición utilizando un FACS Canto

(BD, Pharmingen). La EC50 para ambos anticuerpos SPLIT fue comparable, lo que indica la unión celular específica de CEA de ambos anticuerpos SPLIT. Debido a la mayor cantidad de anticuerpo en la mezcla, se obtuvo una EC50 más baja en estas circunstancias, como se muestra en la tabla a continuación.

Determinación EC50 de anticuerpos SPLIT

		EC50 µg/ml absoluta
<hu>A488	P1AF0712+ PBS	2,7
	P1AF0713+ PBS	2,3
	P1AF0712+ P1AF0713	0,9
	hu ISO + PBS	
DOTA-FITC	P1AF0712+ PBS	na
	P1AF0713+ PBS	na
	P1AF0712+ P1AF0713	2,4
	hu ISO + PBS	

Se determinó la EC50 para los anticuerpos SPLIT utilizando detección secundaria basada en anticuerpos (<hu> 488, panel superior) o Pb-DOTA-FITC (DOTA-FITC, panel inferior)

EJEMPLO 11: Experimentos de unión de Biacore

Este ejemplo prueba la unión de TA-dividido-DOTAM-VH y TA-dividido-DOTAM-VL individualmente a DOTAM, en comparación con el anticuerpo de referencia CEA-DOTAM (RO7198427, PRIT-0213). Además prueba la unión de DOTAM a los pares TA-dividido-DOTAM-VH/VL, en comparación con el anticuerpo de referencia.

A continuación se muestra la correspondencia entre la codificación utilizada en estos ejemplos y los números de proteínas utilizados en otras partes de la presente solicitud. También se proporcionan secuencias. El anticuerpo de referencia se codifica como "PRIT_RS" en este ejemplo.

Aglutinante objetivo	Código SPR (Profármaco A+B)	Código SPR	DOTAM	Proteína	LC (SEC. ID. NO)	HC (SEC. ID. NO)	Fusión HC (SEC. ID. NO)
<CEA> CH1A1A	P1_AB	P1_A	VL	P1AD8592	34	30	33
		P1_B	VH	P1AD8749	34	28	32
<CEA> CH1A1A	P2_AB	P2_A	VL	P1AD8592	34	30	33
		P2_B	VH	P1AF0171	34	28	147
<CEA> T84.66	P3_AB	P3_A	VL	P1AF0709	89	83	84
		P3_B	VH	P1AF0298	89	86	89
<CEA> 28A9	P4_AB	P4_A	VL	P1AF0710	96	90	91
		P4_B	VH	P1AF0711	96	93	94
<CEA> A5H1EL1(G54A)	P5_AB	P5_A	VL	P1AE4957	58	55	56
		P5_B	VH	P1AE4956	54	51	52
<CEA> CH1A1A	P6_AB	P6_A	VL	P1AF0712	103	97	98
		P6_B	VH	P1AF0713	103	100	101
<GPCR5D>	P7_AB	P7_A	VL	P1AF8284	107	104	105
		P7_B	VH	P1AF8285	107	104	106

Para estos experimentos, los anticuerpos PRIT SPLIT se purificaron mediante un primer paso de MabSelect Sure (cromatografía de afinidad) y un segundo paso de cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, POROS XS), y luego se pulieron mediante Superdex 200 (cromatografía de exclusión por tamaño).

Los experimentos se realizaron con Biacore T200 a una temperatura de medición de 25°C. Todos los experimentos de Biacore T200 se llevaron a cabo en buffer de ejecución HBS-P + (GE Healthcare, Br-1008-27) pH 7,4. Se realizaron dos experimentos para cada par de anticuerpo/anticuerpo de prueba, utilizando diferentes fracciones DOTAM.

1. En un primer experimento, se evaluó la unión de los anticuerpos individuales TA-dividido-DOTAM-VH y TA-dividido-DOTAM-VL a DOTAM biotinilado capturado en un chip, en relación con el anticuerpo de referencia.

DOTAM (solución 120 nM en HBS-P +) se capturó en alta densidad en la superficie del chip CAP (10 μ l/min, 60 segundos). Luego, las soluciones 600 nM en HBS-P + de Profármaco_A o Profármaco_B se inyectaron sobre la superficie DOTAM (10 μ l/min, 90 segundos). La disociación se controló durante 240 segundos a un caudal de 10 μ l/min. La determinación de la respuesta máxima relativa se evaluó utilizando el software de evaluación T200.

Los resultados se muestran en la figura 26. Ninguno de los anticuerpos individuales mostró unión a DOTAM capturado.

2. En un segundo experimento, los anticuerpos individuales TA-dividido-DOTAM-VH y TA-dividido-DOTAM-VL se capturaron primero en un chip utilizando un anti-hFab inmovilizado, y luego se evaluó la unión de un complejo DOTAM-monoEstreptavidina (DOTAM + monoEstreptavidina acoplamiento de 600 nM, 1: 1 mol, 1 h a TA).

La solución 600 nM en HBS-P + de Profármaco_A o Profármaco B se inyectó sobre la superficie del chip CM5 anti hFab (GE Healthcare, BR-1008-27) (10 μ l/min, 120 segundos). Después de la captura de alta densidad de la solución Profármaco A o B, se inyectó el complejo DOTAM-monoEstreptavidina (20 μ l/min, 90 segundos). La disociación se controló durante 180 segundos a un caudal de 20 μ l/min. Para el nuevo ciclo, la superficie se regeneró utilizando Glicina 2,1 y 75 segundos de tiempo de regeneración con 10 μ l/min. La determinación de la respuesta máxima relativa se evaluó utilizando el software de evaluación T200.

Los resultados se muestran en la figura 27. Se cree que las respuestas máximas de porcentaje bajo (marcadas con * en la figura) son "trazas" o interacciones inespecíficas con DOTAM-SA, y reflejan la necesidad de optimizar el ensayo.

3. En un tercer experimento, se evalúa la unión de los pares TA-dividido-DOTAM-VH/VL a DOTAM, en comparación con el anticuerpo de referencia. Los anticuerpos se capturaron primero en un chip utilizando un anti-hFab inmovilizado, y luego se evaluó la

unión de un complejo DOTAM–monoEstreptavidina (DOTAM + monoEstreptavidina acoplamiento 600nM, 1: 1 mol, 1 hora a temperatura ambiente).

La solución de 300 nM en HBS–P + de Profármaco_A y Profármaco B se inyectó sobre la superficie del chip CM5 anti hFab (GE Healthcare, BR–1008–27) (10 µl/min, 120 segundos). Después de la captura de alta densidad de la solución Profármaco A y B, se inyectó el complejo DOTAM–monoEstreptavidina (20 µl/min, 90 segundos). La disociación se controló durante 180 segundos a un caudal de 20 µl/min. Para el nuevo ciclo, la superficie se regeneró utilizando Glicina 2,1 y 75 segundos de tiempo de regeneración con 10 µl/min. La determinación de la respuesta máxima relativa se evaluó utilizando el software de evaluación T200.

Los resultados se muestran en la figura 28. Todos los pares TA–dividido–DOTAM–VH/VL mostraron una cantidad significativa de unión para DOTAM, excepto para el par P6_AB (P1AF0712/P1AF0713), que son aglutinantes DOTA.

También se han obtenido resultados similares que muestran una cantidad significativa de unión DOTAM para el par TA-split-DOTAM-VH / VL pero no para los miembros individuales del par para los aglutinantes FAP P1AF8286 y P1AF8287. P1AF8286 se compone de una primera cadena pesada de SEQ ID NO: 108, una segunda cadena pesada de SEQ ID NO: 109 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 111, y P1AF8287 se compone de una primera cadena pesada de SEQ ID NO: 108, una segunda cadena pesada de SEQ ID NO: 110 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 111. Sin embargo, este ensayo todavía necesita optimizarse.

A pesar de que la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Las descripciones de toda la literatura científica y de patentes citadas en este documento se incorporan expresamente en su totalidad como referencia.