

ANTICUERPO BIESPECÍFICO QUE COMPRENDE UN PRIMER DOMINIO DE UNIÓN A CD3 Y UN SEGUNDO DOMINIO DE UNIÓN A BCMA

REFERENCIA CRUZADA

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/394,360, presentada el 14 de septiembre de 2016; y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/491,908, presentada el 28 de abril de 2017, donde estas solicitudes se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia.

10

ANTECEDENTES

El sistema inmunitario del organismo sirve como una defensa contra infecciones, lesiones y cánceres. Dos sistemas separados pero interrelacionados, los sistemas inmunitarios humoral y celular, trabajan juntos para proteger el organismo. El sistema humoral es mediado por factores solubles, denominados «anticuerpos», que neutralizan productos reconocidos como extraños por el organismo. En cambio, el sistema celular involucra a células, tales como los linfocitos T y los macrófagos, que eliminan y neutralizan invasores extraños.

La activación de los linfocitos T es fundamental para la estimulación de respuestas inmunitarias. Los linfocitos T presentan especificidad inmunológica y dirigen la mayoría de las respuestas inmunitarias celulares. Si bien los linfocitos T no secretan anticuerpos, son necesarios para la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. La activación de los linfocitos T requiere la participación de una cantidad de moléculas de la superficie celular, tales como el complejo de receptores de linfocitos T, y las moléculas CD4 o CD8. El receptor de linfocitos T (TcR, por sus siglas en inglés) con especificidad de antígeno está compuesto por un heterodímero enlazado a disulfuro, una glicoproteína de membrana con cadenas alfa y beta (α y β) o gamma y delta (γ y δ). El TcR no está enlazado de manera no covalente con un complejo de proteínas invariantes, denominado «CD3».

Se sabe que los linfocitos T ejercen efectos antitumorales potentes en numerosos contextos de experimentación. Los anticuerpos capaces de reclutar con eficacia linfocitos T contra células tumorales han estado disponibles como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, dirigidos a antígenos asociados a tumores (TAA, por sus siglas en inglés) y proteínas de membrana de linfocitos T de carácter agonista, tales como el complejo TCR/CD3 y CD28. Estos anticuerpos biespecíficos son capaces de activar linfocitos T, sin importar su especificidad con respecto al TCR, lo cual produce una lisis específica de células que portan los respectivos TAA.

Sin embargo, si bien los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 pueden redirigir la lisis mediada por linfocitos T hacia células malignas, ensayos clínicos con bsAb basados en CD3 han mostrado una toxicidad alta en los pacientes. La activación de linfocitos T no específicos por parte de los bsAb puede producirse con independencia del antígeno debido a la interacción Fc/receptor de Fc (FcR), o con dependencia del antígeno cuando este se expresa tanto en células normales como tumorales. Ambos mecanismos pueden haber sido responsables de la toxicidad observada en estudios clínicos anteriores. (Véase, por ejemplo, Kellerman et ál. (1998) *Int. J. Cancer* 77(2):251-6; Durben et ál. *Molecular Therapy* (2015); **23** 4, 648–655). Debido al síndrome de liberación de citocinas resultante, se han encontrado obstáculos significativos para el desarrollo de estos anticuerpos con fines terapéuticos.

La interacción del receptor de linfocito T (TCR) con su ligando peptídico del CMH determina la actividad de un linfocito T. Las características de unión de esta interacción se han estudiado en profundidad y han demostrado que controlan la función del linfocito T. La fuerza y la naturaleza de la interacción del péptido TCR y el CMH determinan si los linfocitos T ejercen funciones efectoras o se inactivan o eliminan. Los anticuerpos contra CD3 activan los linfocitos T mediante el cambio de la conformación de la cadena de CD3 ϵ y dependiendo del epítipo pueden tener efectos agonísticos o antagonísticos en los linfocitos T (Yoon et al., 1994 *Immunity* 1:563-569). En vista de los efectos secundarios significativos de muchos linfocitos agonísticos, puede ser preferible mantener efectos antitumorales potentes al tiempo que se reduce la liberación de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, los anticuerpos anti-CD3 agonistas parciales pueden alterar la cadena de CD3 ϵ de manera subóptima, lo que resulta en una señalización inefectiva, y la mayoría de los anticuerpos anti-CD3 son agonistas completos para ambas vías. No está claro si estas funciones efectoras se pueden separar. Muchos anticuerpos anti-CD3 que existen (por ejemplo SP-34, UCHT1, OKT2) tienen afinidades en el intervalo de 1-50 nM KD, sin embargo, esto puede no ser óptimo para uso terapéutico.

Por ejemplo, Mack et ál. (1995) *PNAS* 92:7021–7025 informaron sobre un anticuerpo monocatenario biespecífico (bssc) con especificidad con respecto a CD3, denominado «captador de linfocitos T biespecífico» (BiTE). Sin embargo, al igual que en estudios anteriores con diferentes anti-CD3 que contenían anticuerpos biespecíficos, el exceso en la activación de linfocitos T y la liberación de citocinas que se induce a partir de la aplicación *in vivo* limita las dosis aplicables de manera segura a menos de 100 μ g/día, lo cual produce concentraciones en suero por debajo de 1 ng/mL.

La invención proporciona anticuerpos específicos con respecto a CD3 y anticuerpos biespecíficos derivados de estos.

Publicaciones

Se describen anticuerpos para CD3, por ejemplo, en las pat. estadounidenses n.º 5,585,097; 5,929,212; 5,968,509; 6,706,265; 6,750,325; 7,381,803; 7,728,114. Se describen anticuerpos biespecíficos con especificidad de unión a CD3, por ejemplo, en las pat. estadounidenses n.º 7,262,276; 7,635,472; 7,862,813; y 8,236,308, cada una de las cuales se incorpora de manera específicamente mediante referencia.

10

COMPENDIO

Se proporcionan composiciones y métodos de uso de estas para una familia de anticuerpos estrechamente relacionados que se unen a CD3 y activan la señalización a través de estas, p. ej., la activación de linfocitos T CD3⁺. La familia de anticuerpos comprende un conjunto de secuencias de CDR definidas en la presente. La familia de anticuerpos proporciona una cantidad de beneficios que contribuyen con la utilidad como agente/s clínicamente terapéutico/s. Los anticuerpos dentro de la familia incluyen miembros con una variedad de afinidades de unión, lo cual permite la selección de una secuencia específica con una afinidad deseada. La capacidad de ajustar la afinidad es de particular importancia para controlar el nivel de activación de CD3 en un individuo en tratamiento, y de ese modo reducir la toxicidad.

20

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD3 tienen una afinidad (KD) con respecto a CD3 en el intervalo de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-11} . Los anticuerpos anti-CD3 con afinidades (KD) de 50 nM o más, 100 nM o más, 500 nM o más o 1 μ M o más pueden ser convenientes para imitar mejor la interacción TCR/MHC y minimizar la liberación de citocinas tóxicas, y al mismo tiempo mantener la lisis eficaz de las células tumorales. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD3 se caracterizan o seleccionan por una menor propensión a inducir la liberación de citocinas, al unirse a un linfocito T competente, p. ej., para la liberación de IL-2 e IFN γ . Los anticuerpos pueden seleccionarse para un uso terapéutico que optimice la destrucción de células tumorales y la liberación reducida de citocinas, p. ej., un anticuerpo que, dentro de la familia de secuencias de anticuerpos descritas en la presente, induzca una liberación de citocinas menor que alrededor de la mitad del máximo observado para un miembro de la familia en un ensayo comparativo, y puede ser menor, p. ej., alrededor de 25 % o menos del máximo observado para un miembro de la familia en un ensayo comparativo. En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, que comprenden al menos una región variable de cadena pesada de la familia de anticuerpos y pueden comprender una región de cadena pesada y ligera proporcionada en la

30

35

presente. Los anticuerpos biespecíficos comprenden al menos la región variable de cadena pesada de un anticuerpo específico para una proteína que no sea CD3 y pueden comprender una región variable de cadena pesada y ligera. En algunas de esas modalidades, el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor, un antígeno de selección de dianas, p. ej., integrinas, etc., un antígeno patogénico, una proteína de punto de control y similares. Diversos formatos de anticuerpos biespecíficos se encuentran dentro del ámbito de la invención, lo cual incluye, de modo no taxativo, polipéptidos monocatenarios, polipéptidos bicatenarios, polipéptidos tricatenarios, polipéptidos tetracatenarios, y múltiplos de estos.

Cada uno de los anticuerpos específicos de CD3 comprenden un dominio VH, que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco VH humano. Las secuencias de CDR de familia 2 pueden situarse, a modo de ejemplo, en la región de los residuos de aminoácidos 26-33; 51-58; y 97-112 para la CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de los ejemplos de secuencias de región variable proporcionados que se indican en las SEQ ID NO:1-18. El experto en la técnica comprenderá que las secuencias de CDR pueden encontrarse en una posición diferente si se selecciona una secuencia de marco diferente, aunque por lo general el orden de las secuencias permanecerá igual.

Las secuencias de CDR para un anticuerpo de familia 2 pueden tener las siguientes fórmulas de secuencias. Una X indica un aminoácido variable, que puede ser un aminoácido específico tal como se indicará más adelante.

CDR1

G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

donde:

X₅ puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X₅ es D, A o H; en algunas modalidades, X₅ es D;

X₆ puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X₆ es D o N; en algunas modalidades D₆ es D.

En algunas modalidades, una secuencia de CDR1 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia que se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, residuos 26-33.

CDR2

I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

En algunas modalidades, una secuencia de CDR2 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia que se indica en cualquiera de las SEQ ID NO:1-18, residuos 51-58.

5
CDR3

$A_1'' K_2'' D_3'' S_4'' R_5'' G_6'' Y_7'' G_8'' X_9'' Y_{10}'' X_{11}'' X_{12}'' G_{13}'' G_{12}'' A_{15}'' Y_{16}''$

donde:

5 X_9'' puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X_9'' es D o S; en algunas modalidades X_9'' es D;

X_{11}'' puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X_{11}'' es R o S;

X_{12}'' puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X_{12}'' es L o R

10 En algunas modalidades una secuencia de CDR3 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 tiene la fórmula $A K D S R G Y G D Y X_{11}'' X_{12}'' G G A Y$ donde X_{11}'' y X_{12}'' son los que se definieron anteriormente.

En algunas modalidades una secuencia de CDR3 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia que se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, residuos 97-112. En algunas modalidades, el dominio VH de unión a CD3 de un anticuerpo de familia 2 se empareja con un dominio de región variable de cadena ligera. En algunas de esas modalidades, la cadena ligera es una cadena ligera fija. En algunas modalidades, la cadena ligera comprende un dominio VL con secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco VL humano. Las secuencias de CDR pueden ser aquellas de la SEQ ID NO:19. En algunas modalidades, la secuencia de CDR1 comprende los residuos de aminoácidos 27-32; 50-52; 89-97 para la CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente.

20 En algunas modalidades, las secuencias de CDR de un anticuerpo de la invención son una secuencia con al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia de CDR o un conjunto de secuencias de CDR las SEQ ID NO:1-18. En algunas modalidades, una secuencia de CDR de la invención comprende una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de CDR o un conjunto de secuencias de CDR en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18. En algunas modalidades, dicha o dichas sustituciones de aminoácidos se producen en la posición 5 y/o 10 de la CDR1, la posición 2, 6 y/o 7 de la CDR2, la posición 1, 8, 9 y/o 10 de la CDR3, con respecto a las fórmulas de la familia 2 que se proporcionaron anteriormente.

30 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico de la invención comprende una región variable de unión a CD3 descrita en la presente, emparejada con una cadena ligera. En algunas modalidades, la cadena ligera comprende la secuencia de región variable que se indica en la SEQ ID NO:19, o una región variable que comprende el conjunto de secuencias de CDR en la SEQ ID NO:19 y secuencias de marco. Diversas secuencias de Fc son útiles, lo cual, incluye, de modo no taxativo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 humanas etc. En algunas modalidades, el segundo brazo del anticuerpo biespecífico comprende una región variable que se une específicamente a un

antígeno asociado a un tumor. En algunas modalidades, el segundo brazo del anticuerpo biespecífico comprende una región variable que se une específicamente a BCMA. En algunas modalidades el brazo anti-BCMA es una región variable monocatenaria, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2B. En algunas modalidades, el brazo anti-BCMA comprende la secuencia de
 5 región variable que se indica en la SEQ ID NO:20, o la secuencia de región variable en tándem que se indica en la SEQ ID NO:21. La secuencia Fc del brazo anti-BCMA puede ser, de modo no taxativo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 humanas, etc. Las secuencias de CDR pueden ser aquellas contenidas en la SEQ ID NO:20. En algunas modalidades, la secuencia de CDR comprende los residuos de aminoácidos 26-33; 51-58; 97-108 para la CDR1, CDR2, CDR3,
 10 respectivamente.

En otras modalidades, se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un dominio VH de unión a CD3 de la invención, p. ej., un anticuerpo o una proteína similar a un anticuerpo monoespecífico, biespecífico, etc. que comprende al menos un dominio VH de unión a CD3 de la invención; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede
 15 liofilizarse, suspenderse en solución, etc. y puede proporcionarse en una formulación de dosis unitaria.

En algunas modalidades, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer, donde el método comprende administrar a un individuo que lo necesite una dosis eficaz de un anticuerpo monoespecífico, biespecífico, etc., de la invención. Cuando el anticuerpo es biespecífico, un
 20 segundo sitio de unión al antígeno puede unirse específicamente a un antígeno tumoral, una proteína de punto de control, etc. En diversas modalidades, el cáncer se selecciona dentro del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer pulmonar, leucemia, linfoma, sarcoma, carcinoma, tumores de células neuronales, carcinomas de células escamosas,
 25 tumores de células germinales, metástasis, tumores no diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas y neoplasias malignas provocadas por agentes infecciosos.

En algunas modalidades, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, donde el método comprende administrar a un individuo que lo necesite una dosis eficaz
 30 de un anticuerpo monoespecífico, biespecífico, etc., de la invención. Cuando el anticuerpo es biespecífico, un segundo sitio de unión al antígeno puede unirse específicamente a un antígeno patogénico, p. ej., bacterias, virus o parásitos.

En otras modalidades, se proporciona un método para la producción de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que comprende expresar las secuencias del anticuerpo, p. ej., una o más
 35 secuencias de codificación de cadena ligera, una o más secuencias de codificación de cadena

pesada, en una sola célula hospedadora. En diversas modalidades, la célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota, tal como una célula de un mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La invención se comprende mejor a partir de la descripción detallada que figura más adelante, en conjunto con los dibujos adjuntos. El archivo de la patente o la solicitud contiene al menos un dibujo a color. Si se solicitara, y una vez efectuado el pago de la tasa necesaria, la oficina proporcionará copias de la presente publicación de patente o solicitud de patente con el o los dibujos a color. Se subraya que, de acuerdo con la práctica común, los diversos elementos de los
10 dibujos no se encuentran a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos elementos se expanden o reducen arbitrariamente para lograr claridad. En los dibujos, se encuentran incluidas las siguientes figuras.

Figuras 1A-1C. La **Figura 1A** muestra una alineación de las regiones CDR1, 2 y 3 de miembros de la familia 2 de anticuerpos de las SEQ ID NO: 1-18, que se unen específicamente a un CD3
15 humano, que corresponde a los residuos 26-33; 51-58; y 97-112. La **Figura 1B** muestra las regiones CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera fija (SEQ ID NO:19); y un ejemplo de secuencia anti-BCMA (SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21). La **Figura 1C** proporciona las secuencias de CDR de un anticuerpo anti-CD3 de referencia (SEQ ID NO: 22), ID 304704.

Figuras 2A-2E. Modelos esquemáticos de anticuerpos humanos biespecíficos. **Figura 2A**,
20 anticuerpo biespecífico anti-CD3:antiantígenos tumorales con cadena ligera común (3 cadenas particulares en total). **Figura 2B**, anticuerpo biespecífico anti-CD3:antiantígenos tumorales con 2 cadenas ligeras comunes (4 cadenas particulares en total). **Figura 2C**, anticuerpo biespecífico anti-CD3:antiantígenos tumorales con cadena de dominio de unión al antígeno tumoral solamente de cadena pesada (3 cadenas particulares). **Figura 2D**, anticuerpo biespecífico
25 anti-CD3:antiantígenos tumorales con dominio de unión al antígeno tumoral de scFv (3 cadenas particulares en total). **Figura 2E**, anticuerpo biespecífico anti-CD3:antiantígenos tumorales con dominio de unión anti-CD3 de scFv (3 cadenas particulares en total).

Figura 3. La tabla de información de los anti-CD3 de familia 2 resume el comportamiento de anticuerpos anti-CD3 en formato monoespecífico y biespecífico. La columna 1 muestra la ID de
30 secuencia para la secuencia de VH anti-CD3. La columna 2 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anti-CD3 monoespecífico original. La columna 3 muestra el valor de MFI para la unión a linfocitos T de cyno del anti-CD3 monoespecífico original. La columna 4 muestra el nombre del anticuerpo biespecífico aCD3:aBCMA. La columna 5 muestra los picogramas de IL-2 liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína
35 BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 6 muestra los picogramas de IL-6

liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 7 muestra los picogramas de IL-10 liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 8 muestra los picogramas de IFN- γ liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 9 muestra los picogramas de TNF α liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 10 muestra la EC50 de la lisis de células tumorales U266 mediada por el anticuerpo biespecífico en presencia de linfocitos pan T humanos. La columna 11 muestra el porcentaje de lisis de células tumorales U266 en presencia del anticuerpo biespecífico y linfocitos pan T humanos en una dosis de 333 ng/mL del anticuerpo biespecífico. La columna 12 muestra la afinidad de unión con la proteína del brazo anti-CD3 del anticuerpo biespecífico, según se midió mediante Octet. La columna 13 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anticuerpo biespecífico.

Figura 4. Lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico. Se evaluaron siete anticuerpos biespecíficos α CD3_fam2:aBCMA, cada uno con un brazo anti-CD3 particular y un brazo anti-BCMA común, para determinar su capacidad de destruir células tumorales U266 BCMA+ a través del redireccionamiento de linfocitos T primarios activados. En este experimento, se mezclaron células U266 que expresaban BCMA con linfocitos pan T activados en una relación E:T 10:1 junto con la adición del anticuerpo biespecífico. El eje x muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje y muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

Figura 5. Actividad de destrucción de U266 biespecífica correlacionada con la liberación de IL-2. En la gráfica de dispersión, se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico con la liberación de la citocina IL-2. La correlación entre la producción de IL-2 y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0.37$.

Figura 6. Actividad de destrucción de U266 biespecífica correlacionada con la liberación de IFN- γ . En la gráfica de dispersión, se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico con la liberación de la citocina IFN- γ . La correlación entre la producción de IFN- γ y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0.53$.

Figura 7. Actividad de destrucción de U266 biespecífica correlacionada con la afinidad de unión anti-CD3. En la gráfica de dispersión, se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales U266 mediada por el anticuerpo biespecífico con la afinidad de unión anti-CD3. La correlación entre la EC50 de destrucción de U266 y la afinidad de unión a la proteína es $R^2 = 0.93$.

Figuras 8A-8D. Lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos α CD3_F1F:aBCMA se sometieron a ensayos para determinar la capacidad de destruir tres células tumorales BCMA+ diferentes y una línea celular BCMA-negativa a través del redireccionamiento de linfocitos T primarios activados. En este experimento, se mezclaron células tumorales con linfocitos pan T activados en una relación E:T 10:1 junto con la adición del anticuerpo biespecífico. La **Figura 8A** muestra la destrucción de células RPMI-8226, la **Figura 8B** muestra la destrucción de células NCI-H929, la **Figura 8C** muestra la destrucción de células U-266 y la **Figura 8D** muestra la destrucción de células K562, un control negativo. El eje x muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje y muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

Figuras 9A-9D. Liberación de IL-2 mediada por el anticuerpo biespecífico. Se midió el nivel de liberación de la citocina IL-2 después de que se cultivaron linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas de células tumorales y dosis en aumento del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F:aBCMA. La **Figura 9A** muestra la liberación de IL-2 estimulada por células RPMI-8226, la **Figura 9B** muestra la liberación de IL-2 estimulada por células NCI-H929, la **Figura 9C** muestra la liberación de IL-2 estimulada por células U-266 y la **Figura 9D** muestra la liberación de IL-2 estimulada por células K562, un control negativo.

Figuras 10A-10D. Liberación de IFN- γ mediada por el anticuerpo biespecífico. Se midió el nivel de liberación de la citocina IFN- γ después de que se cultivaron linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas de células tumorales y dosis en aumento del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F:aBCMA. La **Figura 10A** muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células RPMI-8226, la **Figura 10B** muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células NCI-H929, la **Figura 10C** muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células U-266 y la **Figura 10D** muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células K562, un control negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definirán diversos términos.

Antes de que se describan los agentes activos y métodos de la presente, se ha de comprender que la presente invención no se limita a la metodología, los productos, aparatos y factores particulares descritos, ya que esos métodos, aparatos y formulaciones pueden, desde luego, variar. También se ha de comprender que la terminología usada en la presente tiene el fin solamente de describir modalidades particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones anexas.

Debe señalarse que, tal como se usan en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular «un/una» y «el/la» incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto determine claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a «un candidato farmacológico» hace referencia a un candidato o una mezcla de candidatos, y la referencia a «el método» incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que le asigna comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan a esta mediante referencia con el fin de describir y divulgar dispositivos, formulaciones y metodologías que se describen en la publicación y que podrían usarse en conexión con la invención que se describe en la presente.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se comprende que cada valor intermedio, hasta una décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto determine claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor intermedio o establecido en ese intervalo indicado se encuentran comprendidos dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen alguno de los dos límites incluidos.

En la siguiente descripción, se indican numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más exhaustiva de la presente invención. Sin embargo, resultará evidente para el experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito los elementos y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica con el fin de evitar confusiones con respecto a la invención.

En términos generales, se emplean en la presente descripción métodos convencionales de síntesis de proteínas, cultivo de células recombinantes y aislamiento de proteínas y técnicas de ADN recombinante dentro de los conocimientos de la técnica. Esas técnicas se encuentran explicadas plenamente en la bibliografía (véase, p. ej., Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Sambrook, Russell y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); Harlow, Lane y Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Definiciones

5 «Que comprende/n» significa que los elementos mencionados son necesarios en la composición/el método/el kit, pero que pueden incluirse otros elementos para formar la composición/el método/el kit, etc. dentro del alcance de la reivindicación.

«Que consiste esencialmente en» implica una limitación del alcance de la composición o el método que se describe a los materiales o las etapas que se especifican que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la presente invención.

10 «Que consiste en» implica la exclusión de la composición, el método o el kit de cualquier elemento, etapa o ingrediente que no se especifique en la reivindicación.

Las expresiones «tratamiento», «que trata/n» y similares se usan en la presente para hacer referencia en términos generales a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a la prevención total o parcial de una enfermedad o un síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o total de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. «Tratamiento», tal como se usa en la presente, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero e incluye: (a) prevenir que la enfermedad tenga lugar en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no tiene un diagnóstico de que la padece; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar el retroceso de la enfermedad. El agente terapéutico puede administrarse antes, durante o después de la aparición de la enfermedad o lesión. Es de interés particular el tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento establezca o reduzca los síntomas clínicos no convenientes del paciente. Ese tratamiento se lleva a cabo, preferentemente, antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. La terapia en cuestión se administrará durante la etapa sintomática de la enfermedad y, en algunos casos, después de la etapa sintomática de la enfermedad.

Una «cantidad con eficacia terapéutica» hace referencia a una cantidad de agente activo necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una «cantidad con eficacia terapéutica» es una cantidad que induce, mejora o provoca de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o condiciones fisiológicas asociadas a una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

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

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

- 5 Las expresiones «cáncer», «neoplasia maligna» y «tumor» se usan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a células que presentan un desarrollo autónomo y no regulado, de forma tal que presentan un fenotipo de desarrollo anómalo caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Las células de interés para la detección, el análisis o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (p. ej., benignas),
- 10 malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres prácticamente de cualquier tejido. La expresión «carga tumoral» hace referencia a la cantidad de células cancerosas o el volumen del cáncer en un sujeto. La reducción de la carga tumoral hace referencia, por consiguiente, a la reducción de la cantidad de células cancerosas o el volumen del cáncer en un sujeto. La expresión «célula cancerosa», tal como se usa en la presente, hace
- 15 referencia a cualquier célula que sea una célula cancerosa o derive de una célula cancerosa, p. ej., el clon de una célula cancerosa. Los expertos en la técnica conocen muchos tipos de cánceres, que incluyen tumores sólidos tales como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres en circulación tales como leucemias, lo cual incluye específicamente leucemias de linfocitos B, leucemias de linfocitos T, etc. Los ejemplos de
- 20 cánceres incluyen, de modo no taxativo, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pulmonar, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer cerebral.
- 25 La «citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos» y «ADCC» hacen referencia a una reacción con mediación celular en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc, tales como linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos y macrófagos, reconocen los anticuerpos unidos a una célula diana y provocan la lisis de la célula diana. La actividad de ADCC puede evaluarse mediante el uso de métodos tales como los que se describen en la pat.
- 30 estadounidense n.º 5,821,337. La «ADCP» hace referencia a la fagocitosis con mediación celular dependiente de anticuerpos.

Las «células efectoras» son leucocitos que expresan uno o más receptores de regiones constantes y realizan funciones efectoras.

- Una «citocina» es una proteína liberada por una célula para actuar sobre otra célula como
- 35 mediador intercelular. Las citocinas de interés incluyen, de modo no taxativo, citocinas liberadas de

linfocitos T activados, por ejemplo IL-2, IFN γ , etc.

«No inmunogénico» hace referencia a un material que no inicia, provoca ni potencia una respuesta inmunitaria, donde la respuesta inmunitaria incluye las respuestas inmunitarias adaptativas y/o innatas.

- 5 El término «aislado» significa que el material se retira de su entorno original (p. ej., el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no se encuentra aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o la totalidad de los materiales coexistentes en el sistema natural, se encuentra aislado. Esos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o esos polinucleótidos o polipéptidos
10 podrían ser parte de una composición, y aun así encontrarse aislados en ese vector o composición que no es parte de su entorno natural.

Un «excipiente farmacéuticamente aceptable» hace referencia a un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que en términos generales sea segura, no tóxica y conveniente, e incluye excipientes aceptables tanto para uso veterinario como para uso
15 farmacéutico en seres humanos. Esos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

«Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables» hace referencia a sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Esas sales incluyen las que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes en los compuestos son
20 capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las que se forman con los metales alcalinos, p. ej., sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las que se forman con bases orgánicas tales como las bases amina, p. ej., etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Esas sales también incluyen sales de adición de ácidos formadas
25 con ácidos inorgánicos (p. ej., ácido clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y ácidos alcano y arenosulfónico tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en los compuestos, p. ej., ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o un éster
30 farmacéuticamente aceptable puede ser un monoácido-monosal o éster o una disal o éster; y, de manera similar, si hay más de dos grupos ácidos, parte o la totalidad de esos grupos pueden encontrarse salificados o esterificados. Los compuestos mencionados en la presente invención pueden encontrarse presentes en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y se pretende que la mención de esos compuestos incluya tanto el compuesto original
35 (no salificado y no esterificado) como sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, determinados compuestos mencionados en la presente invención pueden encontrarse presentes en más de una forma estereoisomérica, y se pretende que la mención de esos compuestos incluya todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (racémicas o de otro tipo) de esos estereoisómeros.

- 5 Las expresiones «farmacéuticamente aceptable», «fisiológicamente tolerable» y variantes gramaticales de estas, en la medida en que hagan referencia a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se usan de manera intercambiable y representan que los materiales son pasibles de administración a un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos no convenientes en un grado que prohíba la administración de la composición.
- 10 La «homología» entre dos secuencias es determinada por la identidad de secuencia. Si dos secuencias, que hayan de compararse entre sí, difieren en su longitud, preferentemente la identidad de secuencia hace referencia al porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse de manera convencional con el uso de programas
- 15 informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711). El Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el mejor segmento con la identidad de secuencia más alta entre dos secuencias. Cuando se usa el Bestfit u otro programa de
- 20 alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, un 95 % de identidad con respecto a una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferentemente de forma tal que el porcentaje de identidad se calcule con respecto a la longitud total de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permitan huecos de homología de hasta un 5 % de la cantidad total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa
- 25 el Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferentemente en sus valores preestablecidos («por defecto»). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia determinada y las secuencias descritas anteriormente de la invención pueden ser provocadas, por ejemplo, por la adición, eliminación, sustitución, inserción o recombinación. Una comparación de secuencias de ese tipo también puede llevarse a cabo preferentemente con el
- 30 programa «fasta20u66» (versión 2.0u66, septiembre de 1998, de William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, los ejemplos anexos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Con este fin, pueden usarse los ajustes de parámetros «por defecto».

«Variante» hace referencia a polipéptidos con secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia natural. Comúnmente, las variantes de secuencias de

aminoácidos poseerán al menos alrededor de un 80 % de identidad de secuencia, más preferentemente, al menos alrededor de un 90 % de homología en su secuencia. Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden poseer sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

- 5 Tal como se usa en la presente, se pretende que el término «vector» haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se haya enlazado. Un tipo de vector es un «plásmido», que hace referencia a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde los segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Determinados vectores son
- 10 pasibles de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora a partir de la introducción en la célula huésped y, de ese modo, se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces
- 15 de dirigir la expresión de genes a los que se enlazan de manera operativa. En la presente, se hace referencia a esos vectores como «vectores de expresión recombinante» (o, simplemente, «vectores recombinantes»). Por lo general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen encontrarse en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, «plásmido» y «vector» pueden usarse de manera intercambiable, ya que el plásmido
- 20 es la forma de vector de uso más común.

Se pretende que la expresión «célula hospedadora» (o «célula hospedadora recombinante»), tal como se usa en la presente, haga referencia a una célula con alteraciones genéticas o pasible de alteraciones genéticas mediante la introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un vector o plásmido recombinante. Se debería comprender que se pretende que esos términos hagan

25 referencia no solamente a la célula en cuestión particular sino a la progenie de esa célula. Dado que se pueden producir determinadas modificaciones en generaciones posteriores, debido a una mutación o a influencias ambientales, esa progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula original, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión «célula hospedadora», tal como se usa en la presente.

- 30 La «afinidad de unión» hace referencia, en términos generales, a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo u otra molécula de unión) y su compañero de unión (p. ej., un antígeno o receptor). La afinidad de una molécula X con respecto a su compañera Y puede ser representada de manera general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos
- 35 en la técnica, que incluyen aquellos que se describen en la presente. Los anticuerpos de afinidad

baja se unen de manera insuficiente al antígeno (o receptor) y tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de afinidad alta se unen al antígeno (o receptor) con mayor firmeza y permanecen unidos durante más tiempo.

- A menos que se indique específicamente lo contrario, el término «conjugado», tal como se describe y reivindica en la presente, se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpos a una o más moléculas poliméricas, donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir, soluble en fluidos fisiológicos tales como la sangre, y donde la molécula heterogénea se encuentra libre de cualquier acumulación estructurada. Un conjugado de interés es el PEG. En el contexto de la definición anterior, la expresión «acumulación estructurada» hace referencia a (1) cualquier acumulación de moléculas en solución acuosa con una estructura esferoide o de cubierta esferoide, de forma tal que la molécula heterogénea no se encuentre en una micela u otra estructura de emulsión y no se encuentre anclada a una bicapa lipídica, una vesícula o un liposoma, y (2) cualquier acumulación de moléculas en forma sólida o insolubilizada, tal como una matriz de esfera de cromatografía, que no libere la molécula heterogénea en solución a partir del contacto con una fase acuosa. Por consiguiente, la expresión «conjugado», tal como se define en la presente, comprende la molécula heterogénea mencionada anteriormente en un precipitado, un sedimento, una matriz bioerosionable u otro sólido capaz de liberar la molécula heterogénea en solución acuosa a partir de la hidratación del sólido.
- El término «etiqueta», cuando se usa en la presente, hace referencia a una composición o un compuesto detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. La etiqueta puede ser detectable en sí misma (p. ej., etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición de sustrato que sea detectable.
- Una «fase sólida» hace referencia a una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente incluyen aquellas formadas parcial o totalmente por vidrio (p. ej., vidrio de poro controlado), polisacáridos (p. ej., agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas modalidades, según el contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía por afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la pat. estadounidense n.º 4,275,149.

Los anticuerpos, a los que también se hace referencia como «inmunoglobulinas», comprenden de manera convencional al menos una cadena pesada y una ligera, donde el dominio de extremo amino de las cadenas pesada y ligera es de secuencia variable, por lo que se denomina

comúnmente «dominio de región variable», o «dominio variable pesado» (VH) o «variable ligero» (VL). Los dos dominios se asocian de manera convencional para formar una región de unión específica, aunque como se describirá en la presente también se puede obtener una unión específica con secuencias variables solamente de cadena pesada, y en la técnica se conoce y usa

5 una variedad de configuraciones no naturales de anticuerpos.

Un anticuerpo o molécula de unión al antígeno (lo cual incluye anticuerpos solamente de cadena pesada y moléculas similares a anticuerpos tricatenarios biespecíficos (TCA)) «funcional» o «biológicamente activo/a» es capaz de ejercer una o más de sus actividades naturales en sucesos estructurales, reguladores, bioquímicos o biofísicos. Por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula de unión, p. ej., un TCA, funcional puede tener la capacidad de unirse de manera específica a un antígeno y la unión puede, a su vez, provocar o alterar un suceso celular o molecular tal como la transducción de señalización o actividad enzimática. Un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, p. ej., un TCA, también puede bloquear la activación del ligando de un receptor o actuar como un agonista o antagonista. La capacidad de un anticuerpo u otra molécula de unión, p. ej., un

10

15 TCA, de ejercer una o más de sus actividades naturales depende de varios factores, lo cual incluye un plegamiento y ensamblaje correcto de las cadenas de polipéptidos.

El término «anticuerpo» se usa en la presente en su sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, monómeros, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos solamente de cadena pesada, anticuerpos tricatenarios, Fv monocatenarios, nanocuerpos, etc. y también incluye fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Miller et ál. (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

20

El término «anticuerpo» puede hacer referencia a una cadena pesada de longitud completa, una cadena ligera de longitud completa, una molécula de inmunoglobulina intacta; o una parte inmunológicamente activa de cualquiera de estos polipéptidos, es decir, un polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno que se una con inmunoespecificidad a un antígeno de una diana de interés o parte suya, donde esas dianas incluyen, de modo no taxativo, una o más células cancerosas que produzcan anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina que se describe en la presente puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD y IgA), clase (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina de seres humanos u otros mamíferos, p. ej., cynomolgus, lo cual incluye subclases diseñadas con partes de Fc alteradas que proporcionan una actividad celular efectora reducida o mejorada. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie. En un

25

30

35 aspecto, la inmunoglobulina es de origen ampliamente humano.

El término «variable» hace referencia al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular con respecto a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados «regiones hipervariables» en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las partes más ampliamente conservadas de los dominios variables se denominan «regiones marco» (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos integran, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et ál. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Md.). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

La expresión «región hipervariable», cuando se usa en la presente, hace referencia a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos aminoácidos de una «región de determinación de la complementariedad» o «CDR» y/o aquellos residuos de un «bucle hipervariable». Los residuos de «región marco» o «FR» son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable tal como se define en la presente.

Las regiones variables de interés incluyen al menos una secuencia de CDR de las regiones variables de familia 2 que se proporcionan en la presente, habitualmente al menos 2 secuencias de CDR y más habitualmente 3 secuencias de CDR. En la presente se muestran ejemplos de designaciones de CDR; sin embargo, el experto en la técnica comprenderá que comúnmente se usa una cantidad de definiciones de las CDR, que incluyen la definición de Kabat (véase «Zhao et ál. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions». *Mol Immunol.* 2010;47:694–700), que se basa en la variabilidad de las secuencias y es la que más se usa comúnmente. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales (Chothia et ál. «Conformations of immunoglobulin hypervariable regions». *Nature.* 1989;342:877–883). Las definiciones de CDR alternativas de interés incluyen, de modo no taxativo, aquellas descritas por Honegger, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and

analysis tool». J Mol Biol. 2001;309:657–670; Ofra et ál. «Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes». J Immunol. 2008;181:6230–6235; Almagro «Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires». J Mol Recognit. 2004;17:132–143; y Padlan et ál. «Identification of specificity-determining residues in antibodies». Faseb J. 1995;9:133–139, cada una de los cuales se incorpora específicamente mediante referencia.

La expresión «anticuerpo monoclonal», tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen a un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos hacia diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige hacia un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que se pueden sintetizar sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador «monoclonal» indica que el anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo a través de ningún método particular.

Los anticuerpos en la presente incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de esos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (pat. estadounidense n.º 4,816,567; y Morrison et ál., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos «primatizados» que comprenden secuencias de unión a antígenos de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

Una «cadena de anticuerpo intacta», tal como se usa en la presente, es aquella que comprende una región variable de longitud completa y una región constante de longitud completa (Fc). Un anticuerpo «convencional» intacto comprende una cadena ligera intacta y una cadena pesada intacta, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, bisagra, CH2 y CH3 para la IgG secretada. Otros isotipos, tales como IgM o IgA,

pueden tener dominios CH diferentes. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de una secuencia natural (p. ej., dominios constantes de una secuencia natural humana) o variantes de secuencias de aminoácidos de estos. El anticuerpo intacto puede tener una o más «funciones efectoras» que hacen referencia a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región constante Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento, la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis y la regulación negativa de los receptores de la superficie celular. Las variantes de región constante incluyen aquellas que alteran el perfil efector, la unión a receptores de Fc, y similares.

En virtud de la secuencia de aminoácidos del Fc (dominio constante) de sus cadenas pesadas, se pueden proporcionar los anticuerpos y diversas proteínas de unión al antígeno como diferentes «clases». Existen cinco clases principales de regiones de Fc de cadena pesada: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse de manera adicional en «subclases» (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de Fc que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se pueden denominar α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Son conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. Las formas de Ig incluyen modificaciones de bisagra o formas sin bisagra (Roux et ál. (1998) J. Immunol. 161:4083-4090; Lund et ál. (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256, US 2005/0048572, US 2004/0229310). Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos, denominados κ y λ , en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Una «región Fc funcional» posee una «función efectora» de una región Fc de secuencia natural. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen la unión a C1q, la CDC, la unión al receptor de Fc, la ADCC, la ADCP, la fagocitosis, la regulación negativa de los receptores de la superficie celular (p. ej., receptores de linfocitos B), etc. Por lo general, esas funciones efectoras requieren que la región Fc interactúe con un receptor, p. ej., los receptores Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB y el receptor FcRn de afinidad baja; y pueden evaluarse mediante el uso de diversos ensayos tal como se describe, por ejemplo, en las definiciones en la presente. Una Fc «muerta» se ha sometido a mutagénesis para conservar la actividad, por ejemplo, con respecto a la prolongación de la semivida en suero, pero no activa un receptor de Fc de afinidad alta.

Una «región Fc de secuencia natural» comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen, por ejemplo, una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; región Fc de IgG3

humana de secuencia natural; y región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes de origen natural de estas.

Una «región Fc variante» comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, p. ej., de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en la presente tendrá preferentemente al menos alrededor de 80 % de homología con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original y, más preferentemente, al menos alrededor de 90 % de homología con estas y, más preferentemente, al menos alrededor de 95 % de homología con estas.

Las secuencias de Fc variante pueden incluir tres secuencias de aminoácidos en la región CH2 para reducir la unión a Fc γ RI en las posiciones 234, 235 y 237 según el índice EU (véase Duncan et ál., (1988) Nature 332:563). Dos sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a C1q del complemento en las posiciones 330 y 331 según el índice EU reducen la fijación del complemento (véase Tao et ál., J. Exp. Med. 178:661 (1993) y Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). La sustitución en la IgG1 humana de residuos de IgG2 en las posiciones 233-236 y los residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducen en gran medida la ADCC y CDC (véase, por ejemplo, Armour KL. et Ál., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; y Shields RL. et ál., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Otras variantes de Fc son posibles, lo cual incluye, de modo no taxativo, una en la que se elimine una región capaz de formar un enlace disulfuro, o en la que se eliminen determinados residuos de aminoácidos en el extremo N de una forma de Fc natural o se agregue un residuo de metionina a este. Por lo tanto, en una modalidad de la invención, una o más partes de Fc de la molécula scFc pueden comprender una o más mutaciones en la región bisagra para eliminar los enlaces disulfuro. En aun otra modalidad, la región bisagra de una Fc puede retirarse por completo. En incluso otra modalidad, la molécula puede comprender una variante de Fc.

Además, se puede construir una variante de Fc para retirar o reducir sustancialmente las funciones efectoras mediante la sustitución, eliminación o adición de residuos de aminoácidos para efectuar la unión al complemento o la unión al receptor de Fc. A modo de ejemplo no taxativo, se puede producir una eliminación en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q. Las técnicas de preparación de esos derivados de secuencias del fragmento Fc de inmunoglobulina se describen en las publicaciones de patentes internacionales n.º WO 97/34631 y

WO 96/32478. Además, el dominio Fc puede modificarse mediante fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

La Fc puede encontrarse en una forma que tenga cadenas de azúcares naturales, mayor cantidad de cadenas de azúcares en comparación con una forma natural o menor cantidad de cadenas de azúcares en comparación con la forma natural, o puede encontrarse en forma aglicosilada o desglicosilada. El aumento, la disminución, la eliminación u otra modificación de las cadenas de azúcares puede lograrse mediante métodos comunes en la técnica, tales como un método químico, un método enzimático o mediante su expresión en una línea celular de producción con modificaciones genéticas. Esas líneas celulares pueden incluir microorganismos, p. ej., *Pichia* 5 *Pastoris*, y una línea celular mamífera, p. ej., células CHO, que expresen naturalmente enzimas de glicosilación. Además, los microorganismos o las células pueden modificarse para que expresen enzimas de glicosilación, o se puede imposibilitar que expresen enzimas de glicosilación (véase, p. ej., Hamilton, et ál., *Science*, 313:1441 (2006); Kanda, et ál., *J. Biotechnology*, 130:300 (2007); Kitagawa, et ál., *J. Biol. Chem.*, 269(27): 17872 (1994); Ujita-Lee et ál., *J. Biol. Chem.*, 264(23): 13848 (1989); Imai-Nishiya, et ál., *BMC Biotechnology* 7:84 (2007); y WO 07/055916). Como 10 ejemplo de una célula modificada para tener una actividad de sialilación alterada, se ha modificado el gen de alfa-2,6-sialiltransferasa 1 en células de ovario de hámsteres chinos y en células sf9. Por lo tanto, los anticuerpos expresados por estas células modificadas son sialilados por el producto génico exógeno. Un método adicional para obtener moléculas de Fc con una cantidad modificada de residuos de azúcares en comparación con múltiples moléculas naturales incluye la separación 20 de dichas múltiples moléculas en fracciones glicosiladas y no glicosiladas, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad de lectina (véase, p. ej., WO 07/117505). Se ha demostrado que la presencia de restos de glicosilación particulares altera la función de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, la eliminación de las cadenas de azúcares de una molécula de Fc produce una disminución pronunciada en la afinidad de unión con respecto a la parte de C1q del primer 25 componente del complemento C1 y una disminución o pérdida de la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y de ese modo no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. Otras modificaciones importantes incluyen la sialilación y fucosilación: la presencia de ácido siálico en la IgG se ha correlacionado con una actividad antiinflamatoria (véase, p. ej., Kaneko, et ál., *Science* 313:760 (2006)), mientras que la eliminación de la fucosa de la IgG conduce a una mejora de la actividad de ADCC (véase, p. ej., Shoj-Hosaka, et ál., *J. Biochem.*, 140:777 (2006)).

En modalidades alternativas, los anticuerpos de la invención pueden tener una secuencia de Fc con funciones efectoras mejoradas, p. ej., mediante el aumento de sus capacidades de unión a 35 FcγRIIIA y disminución de la actividad de ADCC. Por ejemplo, la fucosa unida al glicano enlazado

a N en Asn-297 de la Fc es un impedimento estérico para la interacción de la Fc con el FcγRIIIA, y la eliminación de la fucosa mediante glicosmodificación puede aumentar la unión al FcγRIIIA, lo cual se traduce en una actividad de ADCC >50 veces mayor en comparación con los controles de IgG1 de tipo salvaje. La modificación de proteínas, a través de mutaciones de aminoácidos en la parte de Fc de la IgG1, ha generado múltiples variantes que aumentan la afinidad de unión de la FC al FcγRIIIA. Cabe destacar que el mutante de alanina triple S298A/E333A/K334A presenta un aumento de 2 veces en la unión al FcγRIIIA y la función de ADCC. Las variantes S239D/I332E (2X) y S239D/I332E/A330L (3X) tienen un aumento significativo en la afinidad de unión con respecto al FcγRIIIA y el aumento de la capacidad de ADCC *in vitro* e *in vivo*. Otras variantes de Fc identificadas por la expresión de levadura también mostraron una mejora en la unión al FcγRIIIA y en la destrucción de células tumorales en modelos de ratones con xenoinjertos. Véase, por ejemplo, Liu et ál. (2014) JBC 289(6):3571-90, que se incorpora específicamente a la presente mediante referencia.

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

El «Fv» es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Los anticuerpos de unión a CD3 de la invención comprenden un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente; sin embargo, otros anticuerpos, p. ej., para el uso en una configuración multiespecífica, pueden comprender un VH en ausencia de una secuencia de VL. Incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad posiblemente menor que la de un sitio de unión de dos dominios.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CH1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se usa en la presente para el Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (p. ej., de roedores), incluidos los anticuerpos monocatenarios, son anticuerpos quiméricos (incluidos los anticuerpos monocatenarios) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Véase, por ejemplo, Jones et ál., (1986) *Nature* 321:522-525; Chothia et ál. (1989) *Nature* 342:877; 5 Riechmann et ál (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 487-499; Foote y Winter, (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Presta et ál. (1993) *J. Immunol.* 151, 2623-2632; Werther et ál. (1996) *J. Immunol. Methods* 157:4986-4995; y Presta et ál. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:379-389. Para conocer más detalles, véanse las pat. estadounidenses n.º 5,225,539; 6,548,640; 6,982,321; 5,585,089; 5,693,761; 6,407,213; Jones et ál. (1986) *Nature*, 321:522-525; y Riechmann et ál. (1988) *Nature* 332:323-10 329.

La expresión «anticuerpo monocatenario», tal como se usa en la presente, hace referencia a una sola cadena polipeptídica que contiene uno o más dominios de unión al antígeno que se unen a un epítipo de un antígeno, donde esos dominios derivan de o tienen identidad de secuencia con la región variable de una cadena pesada o ligera del anticuerpo. Partes de esa región variable 15 pueden ser codificadas por segmentos génicos V_H o V_L , segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L . La región variable puede ser codificada por segmentos génicos V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , o V_LJ_L reorganizados. Los segmentos génicos V , D y J pueden derivar de seres humanos y diversos animales, lo cual incluye aves, peces, tiburones, mamíferos, roedores, primates no humanos, camellos, llamas, conejos, y similares.

Los anticuerpos de unión a CD3 de la invención son particularmente útiles en configuraciones multiespecíficas, que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos trifuncionales, etc. Se conoce una gran variedad de métodos y configuraciones de proteínas que se usan en anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAB), anticuerpos triespecíficos, etc.

Los BsMAB de primera generación consistían en dos cadenas pesadas y dos ligeras, cada una de 25 ellas de dos anticuerpos diferentes. Las dos regiones de los Fab se dirigen contra dos antígenos. La región Fc está conformada por las dos cadenas pesadas y forma el tercer sitio de unión con el receptor de Fc en las células inmunitarias (véase, por ejemplo, Lindhofer et ál., *The Journal of Immunology*, Vol 155, p 219-225, 1995). Los anticuerpos pueden ser de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan anticuerpos de ratas y ratones secretan Ab biespecíficos funcionales debido al emparejamiento preferencial de cadenas pesadas y ligeras con restricción de especies. En otras modalidades, las regiones Fc se diseñan para que solo encajen entre sí de maneras específicas.

Otros tipos de anticuerpos biespecíficos incluyen Fab enlazados químicamente, que consisten solamente en las regiones del Fab. Dos fragmentos Fab o Fab2 enlazados químicamente forman 35 un anticuerpo artificial que se une a dos antígenos diferentes, lo cual lo convierte en un tipo de

anticuerpo biespecífico. Se producen fragmentos de unión al antígeno (Fab o Fab2) de dos anticuerpos monoclonales diferentes que se enlazan a través de medios químicos tales como un tioéter (véase Glennie, M J et ál., *Journal of immunology* 139, p 2367-75, 1987; Peter Borchmann et ál., *Blood*, Vol. 100, n.º 9, p 3101-3107, 2002).

- 5 Se han desarrollado diversos otros métodos para la producción de anticuerpos artificiales multivalentes mediante la fusión recombinante de dominios variables de dos anticuerpos. Un fragmento variable monocatenario (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador corto de diez a alrededor de 25 aminoácidos. Habitualmente, el enlazador es rico en glicina por la flexibilidad, así como en serina o treonina por la solubilidad, y puede o bien conectar el extremo N del VH con el extremo C del VL o viceversa. Se pueden diseñar fragmentos variables monocatenarios biespecíficos (di-scFv, bi-scFv) mediante el enlace de dos scFv con especificidades diferentes. Se produce una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, lo cual proporciona scFv bivalentes.
- 15 Los scFv en tándem biespecíficos también se conocen como captadores de linfocitos T biespecíficos (BiTE). Se pueden crear scFv biespecíficos con péptidos enlazadores que sean demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen entre sí (alrededor de cinco aminoácidos), lo cual obliga a los scFv a dimerizarse. Este tipo se conoce como «diacuerpos» (Adams et ál., *British journal of cancer* 77, p 1405-12, 1998). La tecnología de la plataforma de redireccionamiento de afinidad doble (DART, por sus siglas en inglés) (Macrogenics, Rockville, Md.). Esta tecnología de proteínas de fusión usa dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) de anticuerpos diferentes en una sola cadena peptídica de alrededor de 55 kilodaltons. SCORPION Therapeutics (Emergent Biosolutions, Inc., Seattle, Wash.) combina dos dominios de unión al antígeno en una proteína monocatenaria. Un dominio de unión se encuentra en el extremo C y un segundo dominio de unión en el extremo N de un dominio efector, con base en las regiones Fc de inmunoglobulina.
- 25 Las proteínas tipo anticuerpos biespecíficos y tetravalentes también incluyen DVD-Ig que se diseñan a partir de dos anticuerpos monoclonales (Wu, C. et ál., *Nature Biotechnology*, 25, p 1290-1297, 2007). Para construir la molécula DVD-Ig, los dominios V de los dos mAb se fusionan en tándem mediante un enlazador corto (TVAAP) con el dominio variable de la cadena ligera (VL) del primer anticuerpo en el extremo N, seguido por el VL del otro anticuerpo y Ck para formar la cadena ligera de la proteína DVD-Ig. De manera similar, las regiones variables de la cadena pesada (VH) de los dos mAb se fusionan en tándem mediante un enlazador corto (ASTKGP) con el primer anticuerpo en el extremo N, seguido por el otro anticuerpo y los dominios constantes de
- 35 cadena pesada para formar la cadena ligera de la proteína DVD-Ig (VH1/VL1). Todos los dominios

constantes de cadena ligera y cadena pesada se conservan en el diseño de DVD-Ig, ya que son fundamentales para la formación de una molécula tipo IgG completa con enlace disulfuro. La transfección conjunta de células de mamíferos con vectores de expresión que codifican la cadena ligera y cadena pesada de DVD-Ig conduce a la secreción de una sola especie de una molécula tipo IgG con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Esta molécula tiene ahora cuatro sitios de unión, 2 de cada mAb.

La expresión «molécula tipo anticuerpo tricatenario biespecífico» o «TCA» se usa en la presente para hacer referencia a moléculas similares a anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en tres subunidades de polipéptidos, dos de las cuales comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo monoclonal, o fragmentos de unión al antígeno funcionales de esas cadenas de anticuerpos, que comprenden una región de unión al antígeno y al menos un dominio CH. Este par cadena pesada/cadena ligera tiene especificidad de unión con respecto a un primer antígeno. La tercera subunidad polipeptídica comprende, consiste esencialmente en o consiste en un anticuerpo solamente de cadena pesada que comprende una parte de Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en ausencia de un dominio CH1, y un dominio de unión al antígeno que se une a un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno, donde ese dominio de unión deriva de o tiene identidad de secuencia con la región variable de una cadena pesada o ligera del anticuerpo. Partes de esa región variable pueden ser codificadas por segmentos génicos V_H y/o V_L , segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L . La región variable puede ser codificada por segmentos génicos V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , o V_LJ_L reorganizados.

Una proteína TCA usa un «anticuerpo solamente de cadena pesada» o «anticuerpo de cadena pesada» o «polipéptido de cadena pesada», tal como se usa en la presente, que hace referencia a un anticuerpo monocatenario que comprende el dominio CH2 y/o CH3 y/o CH4 de regiones constantes de cadena pesada, pero no el dominio CH1. En una modalidad, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y los dominios CH2 y CH3. En otra modalidad, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH2. En una modalidad adicional, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión al antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH3. En la presente, también se encuentran incluidos anticuerpos de cadena pesada en los que el dominio CH2 y/o CH3 se encuentran trancos. En una modalidad adicional, la cadena pesada está compuesta por un dominio de unión al antígeno y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4) pero ninguna región bisagra. El anticuerpo solamente de cadena pesada puede encontrarse en forma de un dímero, en el que dos cadenas pesadas tengan enlaces disulfuros o estén unidas

de otro modo de manera covalente o no covalente entre sí. El anticuerpo de cadena pesada puede pertenecer a la subclase de IgG, pero también se encuentran incluidos en la presente anticuerpos pertenecientes a otras subclases, tales como la subclase IgM, IgA, IgD e IgE. En una modalidad particular, el anticuerpo de cadena pesada pertenece al subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en particular el subtipo IgG1.

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

Un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno, lo cual incluye los anticuerpos solamente de cadena pesada y moléculas tipo anticuerpos tricatenarios biespecíficos (TCA) en la presente, «que se une» a un antígeno de interés, es aquel que se une al anticuerpo con una afinidad suficiente tal que el anticuerpo o la molécula de unión sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico a la hora de dirigirse al antígeno, y que no presente reactividad cruzada significativa con otras proteínas. En esas modalidades, el alcance de unión del anticuerpo u otra molécula de unión a un antígeno no seleccionado como diana no será de más del 10 %, tal como se determina mediante análisis de clasificación de células activadas mediante fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) o radioinmunoprecipitación (RIA).

PROTEÍNAS

La presente invención proporciona una familia de anticuerpos relacionados estrechamente que se unen a CD3 y activan la señalización a través de estas, p. ej., la activación de linfocitos T CD3⁺. Los anticuerpos dentro de la familia comprenden un conjunto de secuencias de CDR tal como se

define en la presente y son ejemplificados por las secuencias de VH proporcionadas de las SEQ ID NO:1-18. La familia de anticuerpos proporciona una cantidad de beneficios que contribuyen con la utilidad como agente/s clínicamente terapéutico/s. Los anticuerpos dentro de la familia incluyen miembros con una variedad de afinidades de unión, lo cual permite la selección de una secuencia específica con una afinidad deseada. La capacidad de ajustar la afinidad es de particular importancia para controlar el nivel de activación de CD3 en un individuo en tratamiento, y de ese modo reducir la toxicidad. Por ejemplo, si se seleccionan como dianas antígenos tumorales de poca abundancia (menos de 10 000 moléculas por célula), se anticipa que se prefieren agentes de unión a CD3 con afinidad alta (<30 nM). Si se seleccionan como dianas antígenos tumorales de mucha abundancia (más de 50 000 moléculas por célula), se prefieren agentes de unión a CD3 con afinidades bajas (>50 nM). Se puede evaluar de manera separada a la afinidad, la propensión del anticuerpo para inducir la liberación de citocinas cuando se unen a un linfocito T, p. ej. la liberación de IL-2, IFN γ , etc, cuando sea deseable la liberación reducida de citocina.

Se puede seleccionar un anticuerpo adecuado a partir de los que se proporcionan en la presente para desarrollo y uso, lo cual incluye, de modo no taxativo, un anticuerpo biespecífico. La determinación de la afinidad con respecto a una proteína candidata puede realizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediciones de Biacore, etc. Los miembros de la familia de anticuerpos pueden tener una afinidad con respecto a CD3 con una Kd de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-11} , lo cual incluye, de modo no taxativo: de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-10} ; de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-9} ; de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10^{-8} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-11} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-10} ; de alrededor de 10^{-8} a alrededor de 10^{-9} ; de alrededor de 10^{-9} a alrededor de 10^{-11} ; de alrededor de 10^{-9} a alrededor de 10^{-10} ; o cualquier valor dentro de estos intervalos. La selección de afinidad puede confirmarse con una evaluación biológica para determinar la activación de linfocitos T en, por ejemplo, un modelo in vitro o preclínico, y la evaluación de la posible toxicidad. La determinación de la liberación de citocina puede evaluarse utilizando cualquier método convencional, esto incluye, de modo no taxativo, los ensayos descritos en los ejemplos.

El acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR), ya sea mediante la unión de complejos MH-péptido o anticuerpos anti-TCR/CD3, inicia la activación de los linfocitos T. Los ejemplos de anticuerpos anti-TCR/CD3 que activan los linfocitos T incluyen OKT3 y UCHT1. Estos anticuerpos anti-CD3 participan de una competición cruzada por la unión a CD3 en los linfocitos T y se usan comúnmente en los ensayos de activación de los linfocitos T. Los anticuerpos anti-CD3 de la presente invención participan de una competición cruzada con el OKT3 por la unión a CD3 humanas. En virtud de la afinidad de unión con respecto a las CD3 y el epítipo en las CD3, los anticuerpos anti-CD3 activaron los linfocitos T con diferentes resultados funcionales. La incubación

in vitro de linfocitos T humanos con anticuerpos anti-CD3 de afinidad baja produjo una activación incompleta de los linfocitos T y una producción baja de IL-2 e IL-10. En cambio, los agentes de unión a CD3 con afinidad alta activaron los linfocitos T para producir una cantidad significativamente mayor de IL-2 y otras citocinas. Los anticuerpos anti-CD3 de afinidad baja se consideran agonistas parciales que inducen de manera selectiva algunas funciones efectoras, una destrucción potente de los tumores y una regulación positiva de CD69, pero que no logran inducir otras, tales como la producción de IL-2 e IL-10. Los agentes de unión con afinidad alta de la presente invención son agonistas completos que activan muchas funciones efectoras inmunitarias de los linfocitos T. La fuerza de la interacción con CD3 y el epítipo reconocido produjo una activación cualitativamente diferente de los linfocitos T. La producción máxima de citocinas de los linfocitos T activados por anticuerpos anti-CD3 de afinidad baja fue menor que la activación máxima por parte de anticuerpos anti-CD3 de afinidad alta. En algunas modalidades, un anticuerpo de la invención produce una liberación más lenta de la IL-2 y/o IL-10 cuando se combina con linfocitos T en un ensayo de activación en comparación con un anticuerpo anti-CD3 de referencia en el mismo ensayo, donde el anticuerpo de referencia puede ser ID 304703 (SEQ ID NO: 22) o un anticuerpo con una afinidad equivalente. La liberación máxima de IL-2 y/o IL-10 puede constituir menos de alrededor del 75 % de la liberación por parte del anticuerpo de referencia, menos de alrededor del 50 % de la liberación por parte del anticuerpo de referencia, menos de alrededor del 25 % de la liberación por parte del anticuerpo de referencia y menos de alrededor del 10 % de la liberación por parte de un anticuerpo de referencia.

En algunas modalidades de la invención, se proporcionan anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, que pueden tener cualquiera de las configuraciones que se describen en la presente, lo cual incluye, de modo no taxativo, un biespecífico tricatenario. Los anticuerpos biespecíficos comprenden al menos la región variable de cadena pesada de un anticuerpo específico para una proteína que no sea CD3 y pueden comprender una región variable de cadena pesada y ligera. En algunas de esas modalidades, el segundo anticuerpo se une con especificidad a un antígeno asociado a un tumor, un antígeno de selección de dianas, p. ej., integrinas, etc., un antígeno patogénico, una proteína de punto de control y similares. Diversos formatos de anticuerpos biespecíficos se encuentran dentro del ámbito de la invención, lo cual incluye, de modo no taxativo, polipéptidos monocatenarios, polipéptidos bicatenarios, polipéptidos tricatenarios, polipéptidos tetracatenarios, y múltiplos de estos.

La familia de anticuerpos específicos de CD3 comprende un dominio VH, que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco VH humano. Las secuencias de CDR pueden situarse, a modo de ejemplo, en la región de los residuos de aminoácidos 26-33; 51-58; y 97-112 para la CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de los ejemplos de secuencias de región variable

- CDR1

10 donde:

X_6 puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X_6' es D o N; en algunas modalidades D_6 es D.

- 15 En algunas modalidades una secuencia de CDR1 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia que se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, residuos 26-33.

20

$$I_1, \quad S_2, \quad W_3, \quad N_4, \quad S_5, \quad G_6, \quad S_7, \quad I_8,$$

En algunas modalidades una secuencia de CDR2 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia indicada en cualquiera de las SEO ID NO: 1-18, residuos 51-58.

25

$$A_1^1 K_2^2 D_3^3 S_4^4 R_5^5 G_6^6 Y_7^7 G_8^8 X_9^9 Y_{10}^{10} X_{11}^{11} X_{12}^{12} G_{13}^{13} G_{12}^{12} A_{15}^{15} Y_{16}^{16}$$

donde:

X_9 puede ser cualquier aminoácido; en algunas modalidades, X_9 es D o S; en algunas modalidades X_9 es D:

- 30 $X_{11''}$ puede ser cualquier aminoácido, en algunas modalidades $X_{11''}$ es R o S;
 $X_{12''}$ puede ser cualquier aminoácido, en algunas modalidades $X_{12''}$ es L o R.

En algunas modalidades una secuencia de CD3 de un anticuerpo anti-CD3 de familia 2 tiene la fórmula A K D S R G Y G D Y X₁₁" X₁₂" G G A Y donde X₁₁" y X₁₂",son tal como se describieron anteriormente. En algunas modalidades, una secuencia de CDR3 de un anticuerpo

anti-CD3 de familia 2 comprende la secuencia que se indica en cualquiera de las SEQ ID NO:1-18, residuos 97-112.

En algunas modalidades, el dominio VH de unión a CD3 se empareja con un dominio de región variable de cadena ligera. En algunas de esas modalidades, la cadena ligera es una cadena ligera fija. En algunas modalidades, la cadena ligera comprende un dominio VL con secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco VL humano. Las secuencias de CDR pueden ser aquellas de la SEQ ID NO:19. En algunas modalidades, la secuencia de CDR1 comprende los residuos de aminoácidos 27-32; 50-52; 89-97 para la CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR de un anticuerpo de familia 2 tienen una secuencia con al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia de CDR o un conjunto de secuencias de CDR en cualquiera de las SEQ ID NO:1-18. En algunas modalidades, una secuencia de CDR de la invención comprende una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de CDR o un conjunto de secuencias de CDR en cualquiera de las SEQ ID NO:1-18. En algunas modalidades, dicha o dichas sustituciones de aminoácidos se producen en la posición 5 y/o 10 de la CDR1, la posición 2, 6 y/o 7 de la CDR2, la posición 1, 8, 9 y/o 10 de la CDR3, con respecto a las fórmulas que se proporcionaron anteriormente.

Cuando una proteína de la invención es un anticuerpo biespecífico, un resto de unión, es decir, la combinación VH/VL o solamente VH, es específico para CD3 humanas, mientras que el otro brazo puede ser específico para células diana, lo cual incluye células cancerosas, tales como células de cánceres de ovario, de mama, gastrointestinales, cerebrales, de cabeza y cuello, de próstata, de colon y pulmonares, y similares, así como tumores hematológicos tales como tumores de linfocitos B, lo cual incluye leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neuronales, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, metástasis, tumores no diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas, neoplasias provocadas por agentes infecciosos y otras neoplasias malignas, células infectadas con un patógeno, células autorreactivas que provocan inflamación y/o autoinmunidad. El resto que no es CD3 también puede presentar especificidad con respecto a una proteína inmunorreguladora, tal como se describirá en la presente.

Los antígenos asociados a tumores (TAA) se encuentran relativamente restringidos a células tumorales, mientras que los antígenos específicos de tumores (TSA) son particulares de las células tumorales. Normalmente, los TSA y TAA son partes de moléculas intracelulares que se expresan en la superficie celular como parte del complejo principal de histocompatibilidad.

Los antígenos de diferenciación específicos de los tejidos son moléculas presentes en células tumorales y sus contrapartes celulares normales. Los antígenos asociados a tumores que se sabe

que son reconocidos por mAb terapéuticos entran en varias categorías diferentes. Los antígenos de diferenciación a nivel hematopoyético son glicoproteínas asociadas habitualmente a grupos de diferenciación (CD, por sus siglas en inglés) e incluyen CD20, CD30, CD33 y CD52. Los antígenos de diferenciación de la superficie celular son un grupo diverso de glicoproteínas y carbohidratos que se encuentran en la superficie de células normales y tumorales. Los antígenos involucrados en la señalización de la diferenciación y el desarrollo a menudo son factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que son dianas para los anticuerpos en pacientes con cáncer incluyen el CEA, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés; también conocido como «ERBB1»), ERBB2 (también conocido como «HER2»), ERBB3, MET (también conocido como «HGFR»), el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1R), el receptor de efrina A3 (EPHA3), el receptor del ligando de inducción de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) 1 (TRAILR1; también conocido como «TNFRSF10A»), el TRAILR2 (también conocido como «TNFRSF10B») y el activador del receptor del ligando del factor nuclear - κ B (RANKL; también conocido como «TNFSF11»). Los antígenos involucrados en la angiogénesis son habitualmente proteínas o factores de crecimiento que respaldan la formación de una nueva microvasculatura, lo cual incluye el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) el receptor del VEGF (VEGFR, por sus siglas en inglés), la integrina α V β 3 y la integrina α 5 β 1. El estroma tumoral y la matriz extracelular son estructuras de apoyo indispensables para un tumor. Los antígenos estromales y de la matriz extracelular que son dianas terapéuticas incluyen la proteína de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés) y la tenascina.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos útiles en configuraciones biespecíficas incluyen, de modo no taxativo: rituximab; Ibritumomab; tiuxetano; tositumomab; Brentuximab; vedotina; Gemtuzumab; ozogamicina; Alemtuzumab; IGN101; adecatumumab; Labetuzumab; huA33; Pemtumomab; oregovomab; CC49 (minretumomab); cG250; J591; MOv18; MORAb-003 (farletuzumab); 3F8; ch14.18; KW-2871; hu3S193; IgN311; Bevacizumab; IM-2C6; CDP791; Etaracizumab; Volociximab; Cetuximab; panitumumab; nimotuzumab 806; Trastuzumab; pertuzumab; MM-121; AMG 102; METMAB; SCH 900105; AVE1642; IMC-A12; MK-0646; R1507; CP 751871; KB004; IIIA4; Mapatumumab (HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; Denosumab; Sibrotuzumab; F19; y 81C6.

Los receptores de puntos de control inmunitarios que se han estudiado de manera más activa en el contexto de la inmunoterapia clínica contra el cáncer, el antígeno asociado a linfocitos T con citotoxicidad 4 (CTLA4, por sus siglas en inglés; también conocido como «CD152») y la proteína de muerte celular programada 1 (PD1; también conocida como «CD279») son ambos receptores inhibidores. La actividad clínica de los anticuerpos que bloquean cualquiera de estos receptores

implica que la inmunidad antitumoral puede mejorarse en múltiples niveles y que se pueden diseñar, de manera inteligente, estrategias de combinación, guiadas por consideraciones en cuanto a los mecanismos y modelos preclínicos.

Los dos ligandos para PD1 son el ligando 1 de PD1 (PDL1; también conocido como «B7-H1» y «CD274») y PDL2 (también conocido como «B7-DC» y «CD273»). El PDL1 se expresa en células cancerosas y, a través de la unión a su PD1 receptor en los linfocitos T, inhibe la activación/función de los linfocitos T.

El gen de activación de linfocitos 3 (LAG3; también conocido como «CD223»), 2B4 (también conocido como «CD244»), el atenuador de linfocitos B y T (BTLA; también conocido como «CD272»), la proteína de la membrana de los linfocitos T 3 (TIM3; también conocida como «HAVcr2»), el receptor de adenosina A2a (A2aR) y la familia de receptores inhibidores destructores se han asociado cada uno a la inhibición de la actividad de los linfocitos y, en algunos casos, la inducción de anergia en los linfocitos. Se puede usar el direccionamiento de anticuerpos de estos receptores en los métodos de la invención.

Los agentes que agonizan una molécula coestimuladora inmunitaria también son útiles en los métodos de la invención. Esos agentes incluyen agonistas o CD40 y OX40. El CD40 es una proteína coestimuladora que se encuentra en células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) y se requiere para su activación. Estas APC incluyen fagocitos (macrófagos y células dendríticas) y linfocitos B. El CD40 es parte de la familia de receptores del TNF. Las moléculas de señalización de activación primarias para el CD40 son el IFN γ y el ligando de CD40 (CD40L). La estimulación a través del CD40 activa los macrófagos.

Los anticuerpos anti-CCR4 (CD194) de interés incluyen anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra el receptor de quimiocinas C-C 4 (CCR4) con posibles actividades antiinflamatorias y antineoplásicas. El CCR2 se expresa en macrófagos inflamatorios que pueden encontrarse en diversas afecciones inflamatorias, p. ej., la artritis reumatoide; y también se ha identificado que se expresa en macrófagos de promoción de tumores. El CCR2 también se expresa en linfocitos T reguladores, y el ligando del CCR2, el CCL2, media el reclutamiento de linfocitos T reguladores en los tumores. Los linfocitos T reguladores suprimen una respuesta para los linfocitos T antitumorales y, por lo tanto, se desea su inhibición o eliminación.

PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA INVENCION

Si bien los anticuerpos pueden producirse mediante síntesis química, estos son producidos normalmente mediante métodos de tecnología de ADN recombinante, tales como la expresión conjunta de todas las cadenas que conforman la proteína en una sola célula hospedadora

recombinante, o la expresión conjunta de un polipéptido de cadena pesada y un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo humano. Además, las cadenas pesada y ligera del anticuerpo también pueden expresarse mediante el uso de un solo vector de expresión policistrónico. La purificación de polipéptidos individuales se logra mediante el uso de tecnologías de purificación de proteínas estándares tales como la cromatografía por afinidad (proteína A), la cromatografía de exclusión por tamaño y/o la cromatografía de interacción hidrofóbica. Los biespecíficos presentan un tamaño y una hidrofobicidad lo suficientemente diferentes como para que se pueda realizar la purificación mediante el uso de procedimientos estándares.

La cantidad de anticuerpos y polipéptidos de cadena pesada que se produce en una sola célula hospedadora puede minimizarse a través de la modificación de las regiones constantes del anticuerpo y la cadena pesada de forma tal que se favorezca la homodimerización por sobre la heterodimerización, p. ej., mediante la introducción de interacciones autocomplementarias (véase, p. ej., WO 98/50431 para conocer las posibilidades, tales como estrategias de «protuberancia dentro de cavidad» (véase WO 96/27011)). Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención consiste en proporcionar un método para producir un biespecífico en un hospedador recombinante, donde el método incluye la etapa de: expresar en una célula hospedadora recombinante una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos dos polipéptidos de cadena pesada, donde dichos polipéptidos de cadena pesada difieran en sus regiones constantes lo suficiente como para reducir o prevenir la formación de homodímeros pero aumentar la formación biespecífica.

Cuando la proteína comprende tres cadenas, p. ej., FlicAb, esta puede producirse mediante la expresión conjunta de las tres cadenas (2 cadenas pesadas y una cadena ligera) que conformen la molécula en una sola célula hospedadora recombinante.

Para la producción recombinante de las proteínas en la presente, uno o más ácidos nucleicos que codifican todas las cadenas, p. ej., 2, 3, 4, etc., se aíslan e insertan en un vector que se puede replicar para una clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. Hay muchos vectores disponibles. Por lo general, los componentes de los vectores incluyen, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

En una modalidad preferida, la célula hospedadora de acuerdo con el método de la invención es capaz de una expresión en niveles altos de inmunoglobulina humana, es decir, al menos 1 pg/célula/día, preferentemente al menos 10 pg/célula/día e incluso más preferentemente al menos 20 pg/célula/día o más sin la necesidad de amplificar las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas simples en dicha célula hospedadora.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

- Otro aspecto de la presente invención consiste en proporcionar composiciones farmacéuticas que comprendan una o más proteínas de la presente invención mezcladas con un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se usan en la presente incluyen, de modo no taxativo, adyuvantes, portadores sólidos, agua, soluciones amortiguadoras u otros portadores usados en la técnica para contener componentes terapéuticos, o combinaciones de estos.
- Las formulaciones terapéuticas de las proteínas que se usan de acuerdo con la presente invención se preparan para ser almacenadas mediante la mezcla de proteínas con el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), por ejemplo, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para quienes los reciben en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG).
- Se describen formulaciones de anticuerpos anti-CD3, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 20070065437, cuya descripción se incorpora expresamente en su totalidad a la presente mediante referencia. Se pueden usar formulaciones similares para las proteínas de la presente invención. Los componentes principales de esas formulaciones son un agente amortiguador del pH eficaz en el intervalo de 3.0 a 6.2, una sal, un tensioactivo y una cantidad eficaz de un biespecífico con especificidad anti-CD3.

MÉTODOS DE USO

Se proporcionan métodos para tratar o reducir enfermedades, lo cual incluye, de modo no taxativo, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, cánceres primarios o metastásicos, etc., en un régimen que comprende poner en contacto las células diana con una composición de unión al antígeno de la invención, particularmente cuando la composición de unión al antígeno es un anticuerpo multiespecífico adecuado para la afección en tratamiento, p. ej., donde un resto de unión se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor para el tratamiento de las células cancerosas pertinentes; un resto de unión específico para un patógeno de interés para el tratamiento de la infección pertinente, y similares. Esos métodos incluyen administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad con eficacia terapéutica o una dosis eficaz de los agentes de la invención, lo cual incluye, de modo no taxativo, combinaciones del reactivo con un fármaco quimioterapéutico, terapia de radiación o cirugía.

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

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

En algunas modalidades, la dosis terapéutica del agente puede oscilar entre alrededor de 0.0001 y 100 mg/kg y más habitualmente entre 0.01 y 5 mg/kg de peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de régimen de tratamiento implica una administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención habitualmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser semanales, mensuales o

anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares tal como se indica mediante la medición de los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. De manera alternativa, las entidades terapéuticas de la presente invención pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían en virtud de la semivida del polipéptido en el paciente.

En aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosificación relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta en intervalos de dosificación relativamente cortos hasta que se reduzca o se detenga la progresión de la enfermedad y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Luego, el paciente puede someterse a un régimen profiláctico.

En incluso otras modalidades, los métodos de la presente invención incluyen tratar, reducir o prevenir el desarrollo de tumores, metástasis tumorales o invasión tumoral de cánceres, lo cual incluye carcinomas, cánceres hematológicos tales como leucemias y linfomas, melanomas, sarcomas, gliomas, etc. Para las aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible de, o en riesgo de contraer una enfermedad en una cantidad suficiente como para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, lo cual incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

Las composiciones para el tratamiento de enfermedades pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, intratumoral, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Una vía típica de administración es la intravenosa o intratumoral, si bien otras vías pueden ser igual de eficaces.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas, tales como un poliláctido, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, tal como se describió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que puede formularse de manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Por lo general, las composiciones farmacéuticas se formulan como estériles, sustancialmente isotónicas y en cumplimiento absoluto con todas las

normativas de Prácticas correctas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU.

La toxicidad de las proteínas descritas en la presente puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej.,

5 mediante la determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) o la LD₁₀₀ (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para el uso en seres humanos. La dosificación de las proteínas que se describen en la presente se
10 encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la dosis eficaz con una toxicidad escasa o nula. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en virtud de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico particular puede elegir la formulación, vía de administración y dosificación exactas en vista de la condición del paciente.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitaria en virtud del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen, de modo no taxativo, polvo, comprimidos, pastillas, cápsulas y grajeas. Se reconoce que las composiciones de la invención, cuando se administran por vía oral, deberían protegerse contra la digestión. Esto se logra típicamente mediante la
20 formación de complejos de las moléculas con una composición para volverlas resistentes a la hidrólisis enzimática y ácida o mediante el empaque de las moléculas en un portador con una resistencia adecuada, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger los agentes contra la digestión son muy conocidos en la técnica.

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

necesidades del paciente (p. ej., Remington's Pharmaceutical Science (15.^a ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et ál., eds., 1996)).

También se encuentran dentro del alcance de la invención los kits que comprenden los agentes activos y formulaciones de estos de la invención e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, p. ej., un fármaco quimioterapéutico, etc. Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término «etiqueta» incluye cualquier inscripción o material registrado que se suministre en el kit o con este, o que acompañe de otro modo al kit.

Las composiciones pueden administrarse para un tratamiento terapéutico. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente como para ablar sustancialmente las células seleccionadas como dianas, tal como se describió anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una «dosis con eficacia terapéutica», que puede proporcionar una mejora en las tasas de supervivencia general. Se pueden administrar dosis únicas o múltiples de las composiciones en virtud de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente.

La dosis particular requerida para un tratamiento dependerá de la afección médica y los antecedentes del mamífero, así como otros factores tales como la edad, el peso, el sexo, la vía de administración, la eficiencia, etc.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ratas modificadas genéticamente que expresan anticuerpos solamente de cadena pesada

Se construyó y ensambló un locus de IgH humana en varias partes, lo cual involucró la modificación y unión de genes de la región C de las ratas, que luego se unieron en una posición posterior con respecto a la región V_H6-D-J_H humana. Luego se inyectaron conjuntamente dos BAC con grupos separados de genes V_H humanos y un BAC que codificaba el fragmento ensamblado (V_H6 de ser humano-D-J_H-de rata C).

Se generaron ratas transgénicas que portaban los locus de inmunoglobulina de cadena pesada artificiales en una configuración no reorganizada. Los genes de región constante incluidos codifican IgM, IgD, IgG2b, IgE, IgA y un potenciador 3'. Los análisis RT-PCR y en suero (ELISA)

de las ratas transgénicas revelaron una reorganización productiva de locus de inmunoglobulina transgénicos y la expresión de anticuerpos solamente de cadena pesada de diversos isotipos en suero. Las ratas transgénicas se cruzaron con ratas con locus de cadena ligera y cadena pesada endógenos descritos anteriormente en la publicación de patente estadounidense 2009/0098134

- 5 A1. El análisis de esos animales mostró la inactivación de la expresión de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de las ratas y la expresión en niveles altos de anticuerpos de cadena pesada con regiones variables codificadas por los genes V, D y J humanos. La inmunización de las ratas transgénicas produjo respuestas en suero de titulación alta de anticuerpos de cadena pesada específicos del antígeno. Estas ratas transgénicas que expresaban anticuerpos de cadena pesada
10 con una región VDJ humana se denominaron «UniRats».

Ejemplo 2

Ratas modificadas genéticamente que expresan anticuerpos de cadena ligera fijados

- 15 Se generaron repertorios de anticuerpos humanos transgénicos a partir de cadenas H con una reorganización $(V_H-D-J_H)_n$ diferente en combinación con una cadena L particular. Para esta cadena L reorganizada, se integraron $V_k-J_k1-C_k$ humanas en la línea germinal de las ratas mediante microinyección de ADN y los animales transgénicos obtenidos se cruzaron con una cepa de ratas descrita anteriormente que expresaba de manera natural un repertorio de cadenas H humanas
20 (Osborn et ál., 2013). Esta nueva cepa de ratas se denominó «OmniFlic».

Las inmunizaciones de ratas OmniFlic, mediante el uso de muchos antígenos diferentes, produjeron niveles altos de IgG con especificidad de antígeno similares a los de otras ratas transgénicas con el mismo locus de IgH. El análisis del repertorio mediante RT-PCR identificó reorganizaciones del gen V_H altamente variables con niveles de transcripción y de proteínas altos.

- 25 Además, solamente se identificó un producto de cadena L, también expresado en un nivel alto. Se obtuvieron agentes de unión con especificidad de antígeno de las OmniFlic mediante NGS y la selección de bibliotecas de ADNc (levadura, *E.coli*, fago) que, a partir de la secuenciación, identificaron diversos transcritos de cadena H. Para la expresión en células mamíferas, se transfectaron construcciones de cadena H hipermutadas en combinación con la secuencia de Ig
30 transgénica original. En esta $V_k-J_k1-C_k$ reorganizada, no se permitieron cambios mutacionales y siempre se expresó la misma cadena L con diversos productos de cadena H para generar IgG humana monoclonal.

Ejemplo 3

- 35 Generación de anticuerpos con especificidad de antígeno en ratas transgénicas

Para la generación de anticuerpos de cadena pesada con especificidad de antígeno en ratas, se inmunizaron ratas modificadas genéticamente de dos maneras.

5 Inmunización con dominios extracelulares recombinantes de PD-L1 y BCMA. Se adquirieron dominios extracelulares recombinantes de PD-L1 y BCMA a través de R&D Systems y se diluyeron con solución salina estéril y se combinaron con adyuvante. Los inmunógenos se combinaron con adyuvante de Freund completo (CFA, por sus siglas en inglés) y adyuvante de Freund incompleto (IFA, por sus siglas en inglés) o adyuvantes Titermax y Ribi. La primera inmunización (cebado) con el inmunógeno en CFA o Titermax se administró en las piernas izquierdas y derechas. Después de 10 la primera inmunización con inmunógenos en CFA, se administraron dos inmunizaciones más en IFA (refuerzos) o 4 inmunizaciones más en Ribi y una más en Titermax en cada pierna. Esta secuencia de inmunizaciones conduce al desarrollo de linfocitos B que producen anticuerpos de afinidad alta. Las concentraciones del inmunógeno fueron de 10 microgramos por pierna. Se recolectó suero de las ratas en la extracción final de sangre para determinar las titulaciones del 15 suero.

Para la generación de anticuerpos CD3 $\delta\epsilon$ antihumanos, se inmunizaron ratas modificadas genéticamente mediante el uso de protocolos de inmunización a base de ADN.

Se inmunizaron ratas OmniFlic con construcciones CD3-épsilon/delta de cynomolgus y humanas en Aldevron, Inc. (Fargo, ND) mediante el uso de la tecnología de anticuerpos GENOVAC. Se recolectaron los ganglios linfáticos de drenaje después del refuerzo final y se aisló el ARN. Luego 20 de la síntesis de ADNc, se realizó una caracterización del repertorio de anticuerpos de cadena pesada de IgH mediante secuenciación de próxima generación y nuestro software interno. Se seleccionaron secuencias de VH con especificidad de antígeno candidatas que mostraron manifestaciones de una selección positiva con especificidad de antígeno. Se seleccionaron varios 25 cientos de secuencias de VH que codificaban FlicAb para el ensamblaje génico y se clonaron en un vector de expresión. Posteriormente, se expresaron anticuerpos de IgG1 FlicAb completamente humanos en células HEK para el análisis mediante Flow y ELISA. Se evaluaron FlicAb humanos para determinar la unión a linfocitos T humanos primarios y células Jurkat mediante flujo. Además, se evaluaron FlicAb humanos mediante el uso de proteínas CD3 $\delta\epsilon$ recombinantes en un ELISA. 30 Todos los FlicAb con una unión positiva con respecto a los linfocitos T humanos se enumeran en la Figura 1 y 2. Se realizó una caracterización adicional de las secuencias seleccionadas en ensayos de activación de linfocitos T.

Ejemplo 4 Caracterización de anticuerpos

La tabla de información de la Figura 3 resume el comportamiento de los anticuerpos anti-CD3 de familia 2 en formato monoespecífico y biespecífico. La columna 1 muestra la ID de secuencia para la secuencia de VH anti-CD3. La columna 2 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anti-CD3 monoespecífico original. La columna 3 muestra el valor de MFI para la unión a linfocitos T de cyno del anti-CD3 monoespecífico original. La columna 4 muestra el nombre del anticuerpo específico α CD3: α BCMA. La columna 5 muestra los picogramas de IL-2 liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 6 muestra los picogramas de IL-6 liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 7 muestra los picogramas de IL-10 liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 8 muestra los picogramas de IFN- γ liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 9 muestra los picogramas de TNF α liberada por linfocitos pan T estimulados por la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína BCMA que recubre plástico en la dosis indicada. La columna 10 muestra la EC50 de la lisis de células tumorales U266 mediada por el anticuerpo biespecífico en presencia de linfocitos pan T humanos. La columna 11 muestra el porcentaje de lisis de células tumorales U266 en presencia del anticuerpo biespecífico y linfocitos pan T humanos en una dosis de 333 ng/mL del anticuerpo biespecífico. La columna 12 muestra la afinidad de unión con la proteína del brazo anti-CD3 del anticuerpo biespecífico, según se midió mediante Octet. La columna 13 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 5 Caracterización de anticuerpo

Correlación de la actividad de destrucción biespecífica y la liberación de citocinas

Se evaluaron siete anticuerpos biespecíficos α CD3_fam2: α BCMA, cada uno con un brazo anti-CD3 particular y un brazo anti-BCMA común, para determinar su capacidad de destruir células tumorales U266 BCMA+ a través del redireccionamiento de linfocitos T primarios activados. En este experimento, se mezclaron células U266 que expresaban BCMA con linfocitos pan T activados en una relación E:T 10:1 junto con la adición del anticuerpo biespecífico. Como se muestra en la Figura 4, el eje x muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje y muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

Una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico con la liberación de la citocina IL-2 se muestra en la gráfica de dispersión de la Figura

5. La correlación entre la producción de IL-2 y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0.37$. Una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por el anticuerpo biespecífico con la liberación de la citocina IFN- γ se muestra en la gráfica de dispersión de la Figura 6. La correlación entre la producción de IFN- γ y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0.53$. Una comparación de la actividad de lisis de células tumorales U266 mediada por el anticuerpo biespecífico con afinidad de unión anti-CD3 se muestra en la gráfica de dispersión de la Figura 7. La correlación entre la EC50 de destrucción de U266 y la afinidad de unión a la proteína es $R^2 = 0.93$.

Ejemplo 6 Lisis de células tumorales

- 10 Los anticuerpos biespecíficos α CD3_F1F:- α BCMA se sometieron a ensayos para determinar la capacidad de destruir tres células tumorales BCMA+ diferentes y una línea celular BCMA-negativa a través del redireccionamiento de linfocitos T primarios activados. En este experimento, se mezclaron células tumorales con linfocitos pan T activados en una relación E:T 10:1 junto con la adición del anticuerpo biespecífico. Los resultados que se muestran en las Figuras 8A-6D. El panel
- 15 A muestra la destrucción de células RPMI-8226, el panel B muestra la destrucción de células NCI-H929, el panel C muestra la destrucción de células U-266 y el panel D muestra la destrucción de células K562, un control negativo. El eje x muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje y muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.
- El nivel de liberación de la citocina IL-2 después de que se cultivaron linfocitos T humanos en
- 20 reposo con diversas líneas de células tumorales y dosis en aumento del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F: α BCMA. La Figura 9A muestra la liberación de IL-2 estimulada por las células RPMI-8226, la Figura 9B muestra la liberación de IL-2 estimulada por las células NCI-H929, la Figura 9C muestra la liberación de IL-2 estimulada por las células U-266 y la Figura 9D muestra la liberación de IL-2 estimulada por las células K562, un control negativo.
- 25 Se midió el nivel de liberación de la citocina IFN- γ después de que se cultivaron linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas de células tumorales y dosis en aumento del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F: α BCMA. La Figura 10A muestra la liberación de IFN- γ estimulada por las células RPMI-8226, la Figura 10B muestra la liberación de IFN- γ estimulada por las células NCI-H929, la Figura 10C muestra la liberación de IFN- γ estimulada por las células U-266 y la Figura
- 30 10D muestra la liberación de IFN- γ estimulada por las células K562, un control negativo.

Los ejemplos se brindan de manera de proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y divulgación completa de cómo elaborar y usar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran que es su invención ni se pretende que establezcan

que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se ha intentado garantizar la exactitud de los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta un margen de error y desvío experimental. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura se encuentra en grados centígrados y la presión es atmosférica o similar.

5 Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a sus modalidades específicas, los expertos en la técnica comprenderán que pueden realizarse diversos cambios y que se pueden realizar sustituciones por equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación, un

10 material, una composición de materia, un proceso o una o más etapas de un proceso en particular al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Se pretende que todas esas modificaciones estén comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.