

ANTICUERPOS ANTI-PSMA X ANTI-CD28 BIESPECÍFICOS Y USOS DE ESTOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud se relaciona con, y reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/688,227, presentada el 21 de junio de 2018, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/781,930, presentada el 19 de diciembre de 2018, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/781,980, presentada el 19 de diciembre de 2018 y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/815,878, presentada el 8 de marzo de 2019. Todo el contenido de las solicitudes anteriores se incorpora en este documento expresamente como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 20 de junio de 2019, se denomina 10367WO01_118003-45220_SL.TXT y tiene un tamaño de 48 690 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención también se refiere a moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que se unen a CD28 y a una molécula diana como PSMA, y a métodos para el uso de estas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CD28 es una proteína transmembrana de tipo I expresada en la superficie de las células T que tiene un único dominio extracelular similar a Ig-V ensamblado como un homodímero. CD28 es el receptor de las proteínas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) y es activado por CD80 o CD86 que se expresan en las APC. La unión de CD28 a CD80 o CD86 proporciona señales coestimuladoras importantes para la activación y supervivencia de las células T. La estimulación de células T a través de CD28 además del receptor de células T (TCR) proporciona una señal potente para la producción de varias interleucinas. CD28 potencia las señales celulares como las vías controladas por el factor de transcripción NFκB después de la activación del TCR. La señal simultánea de CD28 es importante para la activación eficaz de las células T, como la diferenciación, la proliferación, la liberación de citocinas y la muerte celular de las células T.

Se han propuesto anticuerpos anti-CD28 con fines terapéuticos que implican la activación de células T. Un anticuerpo anti-CD28 particular, TGN1412 (superagonista anti-CD28), se usó en un ensayo clínico. TGN1412 indujo una tormenta de citocinas, que no había sido predicha por estudios de toxicología o en PBMC humanas ex vivo. En 2006, seis voluntarios sanos recibieron una dosis intravenosa de TGN1412 (superagonista anti-CD28) a una dosis de 0,1 mg/kg. En 2 horas, los seis pacientes tuvieron respuestas inflamatorias significativas (tormenta de citocinas). En 16 horas, todos los pacientes presentaban disfunción multiorgánica. Los individuos fueron tratados con corticosteroides y los niveles de citocinas volvieron a los niveles normales en 2-3 días. Una dosis inicial de 0,1 mg/kg en un estudio de fase 1 (asociado con CRS) se basó en un múltiplo de 500 veces del nivel sin efectos adversos observados "NOAEL" de 50 mg/kg en monos cangrejeros (Suntharalingam, y otros, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, NEJM 355:1018-1028 (2006)).

Un estudio de toxicología en monos cangrejeros no pudo predecir la respuesta de citocinas observada en humanos.

El PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)/FOLH1 es una diana tumoral "bien caracterizada". El PSMA es una glicoproteína transmembrana de tipo II sobreexpresada en el cáncer de próstata. También se conoce como glutamato carboxipeptidasa II (GPC). En la próstata humana normal, el PSMA se asocia con el citoplasma y el lado apical del epitelio que rodea los conductos prostáticos. La transformación displásica y/o neoplásica del tejido prostático da como resultado la transferencia de PSMA desde la membrana apical a la superficie luminal de los conductos. El PSMA es endocitado constitutivamente y no se desprende. El PSMA es la diana de varios enfoques de ensayos clínicos y de imágenes con ADC (conjugado anticuerpo-fármaco). El PSMA se expresa en gran medida en el adenocarcinoma de próstata humano y coincide con las metástasis (ganglios linfáticos). En los tumores de próstata, los niveles de expresión de PSMA aumentan según el estadio y el grado. La transición al cáncer de próstata independiente de los andrógenos finalmente conduce a una mayor expresión. Curiosamente, la expresión de PSMA también se ha informado en la neovascularización tumoral de algunos tumores sólidos (incluidos cáncer de colon, pulmón, mama, riñón y subtipos de cáncer de vejiga).

El PSMA también se expresa en tejidos normales. La expresión más fuerte se encuentra en las células epiteliales de la próstata, el duodeno, las células tubulares

renales, las glándulas salivales y los astrocitos. El PSMA se expresa débilmente en las trompas de Falopio, la mama y rara vez se expresa en el endotelio del cuello uterino. Las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que se unen tanto a CD28 como a un antígeno diana (como el PSMA) serían útiles en entornos terapéuticos en los que se desea el direccionamiento específico y la destrucción de células que expresan el antígeno diana, mediada por células T. También existe la necesidad de un anticuerpo anti-CD28 que sea seguro para su uso en una composición farmacéutica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que se unen a CD28 y un antígeno diana. De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, se unen a CD28 y PSMA; tales moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, también se denominan en el presente documento "moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA". La porción anti-PSMA de la molécula biespecífica anti-CD28/anti-PSMA es útil para dirigirse a células tumorales que expresan PSMA (por ejemplo, células tumorales de próstata), y la porción anti-CD28 de la molécula biespecífica es útil para activar las células T. La unión simultánea de PSMA en una célula tumoral y CD28 en una célula T facilita la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral diana por parte de la célula T activada. Por lo tanto, las moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA de la invención son útiles, entre otras cosas, para tratar enfermedades y trastornos relacionados con, o causados por tumores que expresan PSMA (por ejemplo, cáncer de próstata).

Las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA. La presente invención incluye moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), en donde cada dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) apareada con una región variable de la cadena ligera (LCVR). En ciertas modalidades ilustrativas de la invención, el dominio de unión a antígeno anti-CD28 y el dominio de unión a antígeno anti-PSMA comprenden, cada uno, diferentes HCVR apareadas con una LCVR común.

La presente invención proporciona moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28

comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, como se establece en la **Tabla 1**. El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 puede comprender, además, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR, como se establece en la **Tabla 1**. De acuerdo con ciertas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende cualquiera de los pares de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR, como se establece en la **Tabla 1**. La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de la cadena pesada, como se establece en la **Tabla 1**, y/o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de la cadena ligera, como se establece en la **Tabla 1**.

De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención proporciona moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26 y 58 o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 42 y 66, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10/18, 26/42 y 58/66.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende un dominio CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 32 y 64, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %,

al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24, 48 y 72, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

En ciertas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16/24, 32/48 y 64/72.

La presente invención proporciona, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 comprende un dominio CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 28 y 60, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 30 y 62, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de la cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20, 44 y 68, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de la cadena ligera (LCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 46 y 70, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

Ciertas moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA, ilustrativas y no limitantes de la invención incluyen un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 que comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 que, respectivamente, tienen las secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24; 28-30-32-44-46-48; y 60-62-64-68-70-72.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente

a PSMA comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 34 y 50, o una secuencia sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 42 y 66, o una secuencia sustancialmente similar a estas con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/18, 34/42 y 50/66.

La presente invención proporciona, además, moléculas biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende un dominio CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 40 y 56, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24, 48 y 72, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

En ciertas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8/24, 40/48 y 56/72.

La presente invención proporciona, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende un dominio CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 36 y 52, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos

99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 38 y 54, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de la cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20, 44 y 68, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de la cadena ligera (LCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 46 y 70, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

Ciertos ejemplos no limitantes de moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA de la invención incluyen un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA que comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 que, respectivamente, tienen las secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24; 36-38-40-44-46-48; y 52-54-56-68-70-72.

En una modalidad relacionada, la invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA comprende los dominios CDR de la cadena pesada y ligera contenidos dentro de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera (HCVR/LCVR) que se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/18, 34/42 y 50/66.

En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias HCVR, LCVR o CDR de las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA que se describen en la presente, que incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de polinucleótidos como se establecen en la **Tabla 1** de la presente, así como moléculas de ácido nucleico que comprenden dos o más de las secuencias de polinucleótidos como se establecen en la **Tabla 1** en cualquier combinación o disposición funcional de estas. Los vectores de expresión recombinantes que llevan los ácidos nucleicos de la invención, y las células huésped en las que se introdujeron tales vectores, también están incluidas en la invención ya que son métodos para producir los anticuerpos

mediante el cultivo de las células huésped en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos, y para recuperar los anticuerpos producidos.

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, en donde cualquiera de los dominios de unión al antígeno antes mencionados que se unen específicamente a CD28 se combinan, conectan o se asocian de cualquier otro modo con cualquiera de los dominios de unión al antígeno antes mencionados que se unen específicamente a PSMA para formar una molécula de unión a antígenos, biespecífica que se une a CD28 y PSMA.

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, la modificación para eliminar los sitios de glucosilación no deseables puede ser útil, o un anticuerpo que carece de una porción de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (ver Shield y otros (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, se puede llevar a cabo la modificación de la galactosilación a fin de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA como se describe en la presente, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En un aspecto relacionado, la invención describe una composición que es una combinación de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA, y un segundo agente terapéutico. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combine de manera ventajosa con una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA. Los agentes ilustrativos que se podrían combinar de manera ventajosa con una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA se analizan en detalle en otra parte de la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para el direccionamiento/destrucción de células tumorales que expresan PSMA mediante el uso de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención, en donde los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad con eficacia terapéutica de una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención a un sujeto que lo necesita.

La presente invención incluye, además, el uso de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con o causado por la expresión de PSMA.

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos terapéuticos para el direccionamiento/destrucción de células tumorales que expresan PSMA mediante el uso de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención, en donde la molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA se combina con otras moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-tumorales que se unen a CD3 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD28/anti-PSMA combinados con anti-CD3/anti-PSMA).

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos terapéuticos para el direccionamiento/destrucción de células tumorales que expresan PSMA mediante el uso de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención, en donde la molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA se combina con un inhibidor de punto de control dirigido a PD-1 o CTLA-4 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD28/anti-PSMA combinados con anti-PD-1).

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos terapéuticos para el direccionamiento/destrucción de células tumorales que expresan PSMA mediante el uso de una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA de la invención, en donde la molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA se combina con otras moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, antitumorales que se unen a CD3 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD28/anti-PSMA combinados con anticuerpos biespecíficos anti-CD3/anti-PSMA) y un inhibidor de punto de control dirigido a PD-1 o CTLA-4 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD28/anti-PSMA combinados con anti-PD-1).

Otras formas de realización serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un esquema que muestra la estructura de un anticuerpo biespecífico anti-CD28/PSMA ilustrativo.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en líneas celulares modificadas genéticamente con introducción de la expresión de ligando coestimulador. Se modificaron tres líneas de células tumorales, B16F10.9, EL4 y MC

38 para expresar un ligando coestimulador o GFP como control. **La figura 2** es un gráfico que muestra el porcentaje (%) de supervivencia. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores crecieron más de 2000 mm³.

La Figura 3 es un esquema que muestra un bioensayo primario y modificado para analizar anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28.

Las Figuras 4A y 4B muestran que la activación de células T CD4⁺ y células JRT3.T3/1G4/hCD28 modificadas genéticamente aumentó por anti-hPSMA x hCD28 en presencia de estimulación primaria (REGN2281) y PSMA expresado en células HEK293/hCD20.

Las Figuras 5A-5H muestran que en líneas celulares modificadas con introducción de PSMA, los anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 potencian la activación de células T en presencia de estimulación de TCR por parte de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20xCD3.

La Figura 5A es un esquema que muestra el modo de acción de un anticuerpo biespecífico.

La Figura 5B es un gráfico que muestra la cuantificación de la proporción de fluorescencia de CD28 dentro/fuera de la sinapsis inmunitaria. Las células diana modificadas con PSMA (HEK293) y células T Jurkat humanas se cocultivaron con anticuerpos biespecíficos marcados con fluorescencia (anti-PSMAxCD28, anti-CD20xCD3) durante 1 hora a 37 °C, se fijaron suavemente y se tiñeron con anti-CD28. La cantidad de células analizadas por grupo se indica en el gráfico de barras.

Las Figuras 5C y 5D muestran la proliferación de células T humanas cultivadas con células diana modificadas con PSMA. Los datos que se muestran son el promedio $\pm$ SEM. Los datos son representativos de al menos dos (2) experimentos.

La Figura 5C proporciona un gráfico que muestra el ajuste de la dosis de CD20xCD3 en presencia de control de isotipo hIgG4s o PSMAxCD28 0,5 nM.

La Figura 5D proporciona un gráfico que muestra el ajuste de la dosis de PSMAxCD28 o los controles indicados en presencia de control de isotipo hIgG4s o CD20xCD3 5 pM.

Las Figuras 5E-5G son gráficos que muestran la proliferación y liberación de citocinas de células T humanas cultivadas con células diana modificadas con TAA (PSMA o CD20) como se indica en la parte superior del panel en presencia de control de isotipo de hIgG4s 5 pM (panel inferior de cada figura) o CD20xCD3 (panel superior de cada figura). Los datos son promedio $\pm$ SEM. Los datos son representativos de al menos tres (3) experimentos.

La figura 5E es un gráfico que muestra la proliferación.

La figura 5F es un gráfico que muestra la liberación de IL-2.

La Figura 5G es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ .

La Figura 5H es un gráfico que muestra que los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 y anti-PSMAxCD3 pueden unirse simultáneamente a células que expresan PSMA. Se preincubaron células 22RV1 durante 30 minutos a 4°C en tampón de citometría de flujo (PBS + FBS al 1 %) con PSMAxCD3 a 20 mg/ml, o anticuerpo anti-PSMA a 20 mg/ml que incluye un brazo anti-PSMA similar al biespecífico PSMAxCD28. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón de citometría de flujo y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con PSMAxCD28 a 5 mg/ml marcado directamente con Alexa647. Después de la incubación, las células se lavaron, se resuspendieron en tampón de citometría de flujo y se analizaron mediante citometría de flujo.

Las Figuras 6A y 6B muestran que anti-PSMAxCD28 aumentó la potencia citotóxica de anti-PSMAxCD3 en presencia de carcinoma de próstata y células T humanas o de mono cangrejero.

Las Figuras 7A-7H proporcionan gráficos que muestran que, en líneas de células cancerosas con PSMA endógeno, los anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 potencian la activación de las células T en presencia de estimulación de los TCR por los anticuerpos biespecíficos PSMAxCD3. Para las **Figuras 7A-7D**, se cultivaron células T humanas con células diana de cáncer con expresión endógena de PSMA (línea de cáncer de próstata C4-2) y los anticuerpos biespecíficos indicados durante 96 horas.

La Figura 7A es un gráfico que muestra la destrucción de las células tumorales. Los datos que se muestran son el porcentaje de células viables.

La Figura 7B es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ .

La Figura 7C proporciona gráficos que muestran los conteos de células T CD4 y la frecuencia de células CD25⁺ como porcentaje de células T CD4.

La Figura 7D proporciona gráficos que muestran los conteos de células T CD8 y la frecuencia de células CD25⁺ como porcentaje de células T CD8.

Para las **Figuras 7E-7G**, se cultivaron células T de mono cangrejero con células cancerosas con expresión endógena de PSMA (línea de cáncer de próstata C4-2) y los anticuerpos biespecíficos indicados durante 96 horas.

La Figura 7E es un gráfico que muestra la destrucción de células tumorales. Los datos que se muestran son el porcentaje de células viables.

La Figura 7F proporciona gráficos que muestran los conteos de células T CD4 y la frecuencia de células CD25⁺ como porcentaje de células T CD4.

La Figura 7G proporciona gráficos que muestran los conteos de células T CD8 y la frecuencia de células CD25⁺ como porcentaje de células T CD8.

La Figura 7H proporciona un gráfico que muestra la unión de anticuerpos a dianas celulares medida por citometría de flujo.

La Figura 8 muestra la comparación entre las propiedades del superagonista TGN y las del anticuerpo anti-CD28 de la invención.

Las Figuras 9A y 9B proporcionan gráficos y diagramas que muestran que el anticuerpo biespecífico PSMAxCD28 mejora la inmunidad antitumoral mediante PSMAxCD3 y la activación de células T inducidas. Se implantaron células tumorales MC38/hPSMA por vía subcutánea en ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA. Los ratones se trataron con los anticuerpos biespecíficos indicados a 5 mg/kg los días 0, 3 y 7.

La Figura 9A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo. Los valores representan el promedio $\pm$ SEM y son representativos de tres (3) experimentos con 3-7 ratones por grupo. Los valores de p se calcularon con ANOVA de dos vías. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ y ****, $p < 0,0001$).

La Figura 9B proporciona gráficos que muestran el porcentaje de células en cada agrupamiento de cada grupo de tratamiento (panel superior); superposición del agrupamiento indicado en el gráfico viSNE (panel inferior).

Las Figuras 9C y 9D proporcionan gráficos de barras que muestran que el anticuerpo biespecífico PSMAxCD28 aumenta la liberación de citocinas inducida por PSMAxCD3. Se extrajo sangre de los ratones para determinar las citocinas séricas 4 horas después de la dosis el día 0. La significación estadística se calculó con ANOVA de 1 vía en comparación con el isotipo ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$. $n = 7$ ratones por grupo. Los datos son representativos de 3 experimentos.

La Figura 9E proporciona un gráfico y un diagrama que muestran que el anticuerpo biespecífico contra PSMAxCD28 mejora la activación de células T inducida por PSMAxCD3.

La Figura 10 muestra que los anticuerpos biespecíficos contra PSMA x CD28 o los anticuerpos bivalentes contra CD28 originales no indujeron la producción de citocinas en suero en los ratones humanizados para CD3/CD28/PSMA.

La Figura 11 muestra que el tratamiento con superagonista de CD28 impulsó la respuesta de citocinas a las 4 horas en ratones NSG injertados con PBMC, mientras que el anticuerpo anti-CD28 mAb14226P2 no lo hizo.

La Figura 12 muestra un perfil toxicológico potencialmente más seguro de moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, coestimuladoras de esta invención. La molécula anti-CD28 x anti-PSMA no provocó una respuesta de citocinas, mientras que anti-CD3 x anti-PSMA sí lo hizo.

Las Figuras 13A y 13B muestran que PSMA x CD28 no mostró producción de citocinas o marginación de células T en comparación con PSMA x CD3 y el superagonista de CD28. LLOQ: "Límite inferior de cuantificación".

Las Figuras 14 y 17 muestran que TSAxCD28 y el bloqueo de PD-1 activa TCR/CD3 y CD28 en las células T en el sitio del tumor. **Las Figuras 15, 16 y 18** muestran que TSAxCD28 biespecífico y el bloqueo de PD-1 promueven sinérgicamente la activación de células T in vitro. En las **Figuras 14-18**, la célula T (Jurkat/PD-1) y la célula diana (Raji WT) se conjugan en presencia de un mAb contra PD-1 no bloqueador (mAb NB PD-1) o bloqueador (mAb contra PD-1) y anticuerpo biespecífico CD20xCD3.

La Figura 14 proporciona gráficos de barras que muestran la cuantificación de la localización de PD-1 y CD28 en la sinapsis inmunitaria. La significación estadística se calculó con una prueba t para datos no pareados (no significativo, ns). Para cuantificar la localización de PD-1 y CD28 en la sinapsis inmunitaria, se tomaron imágenes de los conjugados de células T (Jurkat/PD-1) y de células diana (Raji WT) en presencia de un mAb contra PD-1 no bloqueador (mAb NB PD-1) o bloqueador (mAb contra PD-1) y anticuerpo biespecífico anti-CD20xCD3. Los mAb contra PD-1 se marcaron directamente con Alexa647, el anticuerpo biespecífico anti-CD20xCD3 se marcó directamente con Alexa488, el mAb CD28 se marcó directamente con PE y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (imágenes no mostradas).

La Figura 15 proporciona gráficos de barras que muestran la cuantificación de la localización de PD-1 y CD28 en la sinapsis inmunitaria. La significación estadística se calculó con una prueba t para datos no pareados ($p < 0,0001$, ****). Para cuantificar la localización de PD-1 y CD28 en la sinapsis inmunitaria, se tomaron imágenes de los conjugados de células T (Jurkat/PD-1) y de células diana (Raji/PD-L1) en presencia de un mAb contra PD-1 no bloqueador (mAb NB PD-1) o bloqueador (mAb contra PD-1) y anticuerpo biespecífico anti-CD20xCD3. Los mAb contra PD-1 se marcaron directamente con Alexa647 (se muestra en rojo), CD20xCD3 se marcó directamente con Alexa488 (se muestra en verde), el mAb CD28 se marcó directamente con PE (se

muestra en azul) y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (se muestra en gris). Las líneas de puntos son contornos de células dibujadas basadas en la imagen de campo claro.

La Figura 16 muestra el porcentaje (%) de viabilidad de las células 22RV1-PDL1 a las 96 horas.

La Figura 17 es un gráfico que muestra los niveles de IFN γ en el sobrenadante a las 96 horas.

La Figura 18 es un gráfico que muestra la liberación de IL-2 a las 96 horas.

Las Figuras 19A-19D muestran que la expresión de un ligando de CD28 (CD86) en células tumorales actúa en sinergia con el tratamiento anti-PD1 para inducir inmunidad antitumoral dependiente de CD8. Las células tumorales MC38 se transdujeron con el ligando para CD28, CD86 (MC38/CD86) o control con vector vacío (MC38/EV). Los ratones C57BL6 WT se implantaron inicialmente con 1×10^6 células tumorales por ratón y se trataron con mAb contra PD-1 o control de isotipo de rata a 5 mg/kg en los días 0, 3, 7, 10 y 14 después del implante del tumor.

La Figura 19A muestra el volumen tumoral promedio a lo largo del tiempo. Las barras de error representan $\pm$ SEM. La significación estadística se determinó con ANOVA de dos vías y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey.

La Figura 19B muestra la supervivencia a lo largo del tiempo (porcentaje de ratones con tumores $< 2000 \text{ mm}^3$). La significación estadística en el día 60 después de la implantación se determinó con la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox).

En la **Figura 19C**, los ratones se trataron con anticuerpo que agota CD8 (con agotamiento de CD8) o control de isotipo (sin agotamiento). Se muestra el volumen tumoral promedio a lo largo del tiempo con agotamiento de CD8 (líneas discontinuas) y sin agotamiento (líneas continuas) $\pm$ SEM. La significación estadística se determinó con ANOVA de dos vías y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey.

La Figura 19D muestra el implante de tumor secundario (reexposición) de ratones libres de tumor que se implantaron con MC38/CD86 y se trataron con mAb PD1.

En las **Figuras 19A-19D**, los datos que se muestran son de 1 experimento con 10 ratones por grupo. Los datos son representativos de al menos 4 experimentos separados. Se indica la significación estadística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Las Figuras 20, 21A, 22, 24 y 25 muestran que PSMAxCD28 actúa en sinergia con el tratamiento con mAb contra PD1 para inducir inmunidad antitumoral. Se implantaron células tumorales MC38/hPSMA en ratones hCD3/hCD28/hPSMA por vía subcutánea.

Se administró anticuerpo biespecífico PSMAxCD28, mAb contra PD-1 o control de isotipo de IgG2a de rata como monoterapia o en combinación mediante inyección intraperitoneal a 5 mg/kg cada uno. **Las Figuras 21B y 21C** muestran que la combinación de PSMAxCD28 y el mAb contra PD-1 aumenta la frecuencia de células T específicas del tumor. **Las Figuras 23A y 23B** muestran que PSMA x CD28 actúa en sinergia con el tratamiento anti-PD1 para inducir citocinas intratumorales pero no esplénicas o sistémicas.

Las Figuras 20A - 20E muestran que el tratamiento inmediato con un anticuerpo anti-PSMA x anti-CD28 mejora la inmunidad en el sitio del tumor y actúa en sinergia con los anticuerpos anti-PD-1 para promover el rechazo del tumor. **La Figura 20A** muestra el volumen tumoral promedio a lo largo del tiempo. Las barras de error representan +/- SEM. Significación estadística determinada con ANOVA de 2 vías y prueba de comparaciones múltiples de Tukey (**, $p < 0,001$ y ****, $p < 0,0001$). **La Figura 20B** muestra la supervivencia a lo largo del tiempo (los ratones con tumores $> 2000 \text{ mm}^3$ se sacrifican). Significación estadística determinada con la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) (**, $p < 0,01$). **La Figura 20C** muestra el volumen tumoral promedio el día 21 después del implante. Las barras de error representan +/- SEM. Significación estadística determinada con ANOVA de 1 vía y prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak (****, $p < 0,0001$). **La Figura 20D** muestra una tabla de volumen tumoral (mm^3) el día 21 después del implante. **La Figura 20E** muestra una tabla con la cantidad de ratones libres de tumor por grupo de 6 experimentos separados.

La Figura 21A muestra la exposición secundaria al tumor de ratones libres de tumores tratados previamente con la combinación de PSMAxCD28 y mAb PD1. Las barras de error representan +/- SEM Los datos son representativos de 4 experimentos.

La Figura 21B muestra células tumorales MC38/PSMA implantadas en ratones humanizados para CD3/CD28/PSMA que se trataron con control de isotipo, PSMAxCD28, mAb contra PD1 o combinación a 5 mg/kg los días 10 y 14 después del implante. Los bazos se extrajeron el día 17. Los esplenocitos se cultivaron durante la noche en medio de células T con péptido (p15E u OVA) a 10 mg/ml y anti-CD28 a 2 mg/ml. Después de la incubación durante la noche, se realizó la tinción de citocinas intracelulares de acuerdo con procedimientos estándar.

La Figura 21C muestra que los ratones libres de tumor del tratamiento con anti-CD28 x PSMA y anti-PD1 pero no con anti-CD28 x PSMA y anti-CD3 x PSMA rechazaron la 2^{da} exposición tumoral.

Las Figuras 22A-22D, 24 y 25 muestran el régimen de tratamiento retardado/terapéutico (dosificación indicada por flechas; **Figuras 22A y 22B** los días 9, 16 y 22; **Figuras 24 y 25** los días 7, 11 y 14).

La Figura 22A muestra el volumen tumoral promedio a lo largo del tiempo. Las barras de error representan $\pm$ SEM. La significación estadística se determinó con ANOVA de dos vías y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos son representativos de 3 experimentos

La Figura 22B muestra citocinas esplénicas e intratumorales ex vivo. Los puntos representan datos de ratones individuales. La barra es el promedio $\pm$ SEM.

La Figura 22C muestra el tamaño promedio del tumor el día 20.

La Figura 22D muestra la supervivencia de los ratones que recibieron diferentes tratamientos.

Las Figuras 23A y 23B muestran que PSMA x CD28 actúa en sinergia con el tratamiento anti-PD1 para inducir citocinas intratumorales pero no esplénicas o sistémicas.

En la **Figura 23A**, los datos se corresponden con la **Figura 22B**. Citocinas esplénicas e intratumorales ex vivo. Los puntos representan datos de ratones individuales. La barra es el promedio $\pm$ SEM.

En la **Figura 23B**, los ratones triple humanizados para CD3/CD28/PSMA se implantaron con MC38/hPSMA y se trataron con el anticuerpo indicado a 5 mg/kg el día 0. Se extrajo sangre de los ratones y se recogió el suero 4 horas después de la dosis. Tanto en la **Figura 23A** como en la **23B** se calculó la significación estadística con ANOVA de 1 vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

La Figura 24 muestra la expresión de PD1 en subconjuntos de células T de drenaje de ganglio linfático (dLN), bazo (Sp) y tumor (Tu). Los puntos representan datos de ratones individuales. La barra es el promedio $\pm$ SEM.

La Figura 25 muestra la frecuencia de células T CD8 en C1 y C2 de los grupos de tratamiento indicados.

Los datos de las **Figuras 22B, 24 y 25** son de 1 experimento cada uno. **Figura 22B y 24** $n = 4-6$ ratones por grupo. **Figura 25** $n = 10$ ratones por grupo.

Las Figuras 26A-26C y 27 muestran que TAAxCD28 solo o en combinación con la terapia para PD1 no induce la activación sistémica de las células T en comparación con el superagonista de CD28 en monos cangrejeros. Los monos cangrejeros se

trataron con una dosis única de bispecíficos a la dosis indicada (1 o 10 mg/kg según se indica). El tiempo se indica después de la dosis (hora).

La Figura 26A muestra las citocinas en suero.

La Figura 26B muestra los conteos relativos de células T en sangre periférica.

La Figura 26C muestra la frecuencia de las células T Ki67⁺ e ICOS⁺ (% de CD3).

En las **Figuras 26A-26C**, los valores representan el promedio +/- SEM. N = 3 animales por grupo.

La Figura 27 muestra que los ratones triple humanizados para CD3/CD28/PSMA se trataron con una sola dosis de anticuerpo (0,25 o 2,5 mg/kg como se indica). Se extrajo sangre de los ratones y se recogió suero a las 4 horas (día 0) después de la dosis. La significación estadística se calculó con ANOVA de 1 vía y la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001

La Figura 28 muestra que PSMA x CD28 +/- PD1 no elevó las citocinas séricas en ratones portadores de tumores.

29A y 29B muestran que PSMAxCD28 solo o en combinación con el mAb contra PD1 muestra un perfil de citocinas seguro in vivo en ratones que no portan tumores. Los datos se corresponden con los de la **Figura 27**. Se trataron ratones triple humanizados para CD3/CD28/PSMA con una dosis única de anticuerpo (0,25 o 2,5 mg/kg como se indica). Se extrajo sangre de los ratones y se recogió suero a las 4 horas (día 0) y 72 horas (día 3) después de la dosis. La significación estadística se calculó con ANOVA de 1 vía y la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención, cabe destacar que esta invención no se limita a los métodos particulares ni a las condiciones experimentales que se describen, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la invención. Como se usa en la presente, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico mencionado en particular, significa que el valor puede ser distinto del valor

mencionado en no más de 1 %. Por ejemplo, como se usa en la presente, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden usarse en la práctica o en pruebas de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones que no son patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Definiciones

La expresión "CD28", como se usa en este documento, se refiere a un antígeno que se expresa en las células T como un receptor coestimulador. El CD28 humano comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 74, y/o que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en el número de acceso de NCBI NP_006130,1. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en la presente pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivos, a menos que se especifique explícitamente como proveniente de una especie no humana. Por lo tanto, la expresión "CD28" significa CD28 humano a menos que se especifique que es de una especie no humana, por ejemplo, "CD28 de ratón", "CD28 de mono", etc.

Como se usa en la presente, "un anticuerpo que se une a CD28" o un "anticuerpo anti-CD28" incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que reconocen específicamente un CD28 monomérico, así como anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que reconocen específicamente un CD28 dimérico. Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención pueden unirse a CD28 soluble y/o CD28 expresado en la superficie celular. CD28 soluble incluye proteínas CD28 naturales, así como variantes proteicas de CD28 recombinantes, tales como, por ejemplo, construcciones de CD28 monomérico y dimérico, que carecen de un dominio transmembrana o que no están asociados de otra manera con una membrana celular.

Como se usa en la presente, la expresión "CD28 expresado en la superficie celular" significa una o más proteínas CD28 que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de manera que al menos una porción de una proteína CD28 está expuesta en el lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una porción de unión al antígeno de un anticuerpo. "CD28 expresado en la superficie celular"

incluye proteínas CD28 contenidas en el contexto de un receptor coestimulador funcional de células T en la membrana de una célula. La expresión "CD28 expresado en la superficie celular" incluye la proteína CD28 expresada como parte de un homodímero en la superficie de una célula. Un "CD28 expresado en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD28 expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa la proteína CD28. Alternativamente, "CD28 expresado en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD28 expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa CD28 humano en su superficie, pero que se modificó mediante ingeniería genética para expresar CD28 en su superficie.

Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo anti-CD28" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una sola especificidad, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a CD28 y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el brazo anti-CD28 comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 de este documento. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos anti-CD28 se describen en otra parte del presente documento. El término "molécula de unión al antígeno" incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que incluyen, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión al antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno en particular o interactúa con este (por ejemplo, CD28). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas mediante enlaces disulfuro, así como sus multímeros (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L

está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes modalidades de la invención, las FR del anticuerpo anti-CD28 (o la porción de unión al antígeno de este) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humanas, o se pueden modificar de manera natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir en función de un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye, además, fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usan en la presente, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, que se puede obtener enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar de, por ejemplo, moléculas de anticuerpo completas mediante el uso de cualquier técnica estándar adecuada, tal como la digestión proteolítica, o técnicas de ingeniería genética recombinantes que involucran la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios de anticuerpo variables y, opcionalmente, constantes. Tal ADN es conocido y/o se puede acceder con facilidad de, por ejemplo, fuentes comerciales, colecciones de ADN (que incluyen, por ejemplo, colecciones de fago-anticuerpo), o se puede sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer de uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos con dominios eliminados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo,

nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), proteínas inmunofarmacéuticas modulares pequeñas (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están incluidas dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en la presente.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá, en general, al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y, en general, comprende al menos una CDR que es adyacente a o está en marco con una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado a un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . De manera alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En ciertas formas de realización, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable ligado de manera covalente a al menos un dominio constante. Los ejemplos no limitativos de configuraciones de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; y (xiv) V_L - C_L . En cualquier configuración de dominios variables y constantes, que incluyen cualquiera de las configuraciones de ejemplo que se enumeran con anterioridad, los dominios variables y constantes pueden estar directamente unidos entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra total o parcial o una región enlazadora. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre los dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula de polipéptidos. Además, un fragmento de unión al antígeno puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de los dominios constante y variable que se enumeran con anterioridad en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante puente(s) disulfuro).

Al igual que las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un anticuerpo en general

comprenderá al menos dos dominios variables distintos, en donde cada dominio variable es capaz de fijarse de manera específica a un antígeno separado o a un epítipo distinto en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, que incluyen los formatos de anticuerpo biespecífico de ejemplo descritos en la presente, se puede adaptar para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención mediante el uso de técnicas de rutina disponibles en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar a través de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan un antígeno mediante un anticuerpo de la invención en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, por tanto, conducen a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC se pueden medir mediante ensayos que son bien conocidos y están disponibles en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5,500,362 y 5,821,337, y Clynes y otros (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (Estados Unidos) 95: 652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por lo tanto, el isotipo de un anticuerpo se puede seleccionar en función de si es deseable para el anticuerpo mediar la citotoxicidad.

En determinadas modalidades de la invención, los anticuerpos anti-CD28 de la invención (monoespecíficos o biespecíficos) son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de un sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en la CDR3 en particular. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, como ratón, se han injertado en las secuencias marco humanas.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descritos más adelante), los anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes (descritos más adelante), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes que derivan de secuencias de inmunoglobulina germinal humana. En algunas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana y se relacionan con ellas, es posible que no existan de manera natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas a heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende un constructo estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen unidos mediante un puente disulfuro de la cadena pesada intercatenario. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de puentes disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de alrededor de 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada (medio anticuerpo) apareada en forma covalente. Estas formas fueron extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación de afinidad.

La frecuencia de aparición de esta segunda forma en diversos isotipos IgG intactos se debe a, entre otros, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una única sustitución de aminoácidos en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal y otros (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles

observados típicamente usando una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3 que pueden ser convenientes, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos aislados. Como se usa en la presente, un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que fue identificado y separado, y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se separó o eliminó de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe naturalmente o se produce naturalmente, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado incluye, además, un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se sometieron a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas formas de realización, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o materiales celulares.

La presente invención incluye, además, anticuerpos de un brazo que se unen a CD28. Como se usa en la presente, un "anticuerpo de un brazo" significa una molécula de unión al antígeno que comprende una única cadena pesada de anticuerpo y una única cadena ligera de anticuerpo. Los anticuerpos de un brazo de la presente invención pueden comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 2.

Los anticuerpos anti-CD28 de la presente, o los dominios de unión al antígeno de estos, pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones del marco y/o CDR de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que se derivaron las proteínas de unión al antígeno o los dominios de unión al antígeno. Tales mutaciones se pueden determinar fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente con las secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y dominios de unión al antígeno de estos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de marco y/o regiones CDR mutan con respecto al(a los) residuo(s) correspondiente(s) de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo, o al(a los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de la línea germinal

humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del(de los) residuo(s) correspondiente(s) de la línea germinal (tales cambios de secuencia se denominan en la presente colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, que comience con las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera descritas en la presente, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de las líneas germinales individuales o combinaciones de estas. En ciertas formas de realización, todos los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L mutan nuevamente a los residuos que se encuentran en la secuencia de la línea germinal original de la que el anticuerpo se deriva originalmente. En otras modalidades, solo ciertos residuos vuelven a mutar a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras formas de realización, uno o más de los residuos de marco y/o CDR mutan a los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual el anticuerpo deriva originalmente). Además, los anticuerpos, o los dominios de unión al antígeno de estos, de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal en las regiones del marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales mutan con respecto al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular mientras que otros residuos que no son los de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden analizar fácilmente para determinar una o más propiedades deseadas, tales como mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, mejores o mayores propiedades biológicas agonistas o antagonistas (según sea el caso), reducción de la inmunogenicidad, etc. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera general están incluidos dentro de la presente invención.

La presente invención incluye, además, anticuerpos anti-CD28 y moléculas de unión al antígeno que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente. Las variantes ilustrativas incluidas en este aspecto de la invención incluyen variantes de cualquiera de las secuencias de

aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en este documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-CD28 y moléculas de unión al antígeno que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR establecidas en la Tabla 1 de la presente.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, distintos anticuerpos se pueden fijar a distintas áreas en un antígeno y pueden tener efectos biológicos distintos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptidos lineal. Un epítopo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. En algunas circunstancias, un epítopo puede incluir porciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

Las expresiones "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refieren a un ácido nucleico o fragmento de este, indican que, cuando se alinean óptimamente con las inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor de 95 %, y con mayor preferencia, al menos alrededor de 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, según se mide mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza más adelante. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en algunos casos, codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente similar al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Cuando se aplica a los polipéptidos, las expresiones "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significan que dos secuencias de péptidos, cuando se alinean óptimamente, por ejemplo, mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de las ponderaciones de espacio predeterminadas, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, aun con mayor preferencia, al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son

idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es aquella en la que un residuo de aminoácido es sustituido con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no modificará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar de manera ascendente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las personas del oficio de nivel medio conocen los medios para realizar este ajuste. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24, 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que se denomina también identidad de secuencia, se mide en general mediante software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares mediante el uso de medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, que incluyen las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas, tales como Gap y Bestfit, que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de esta. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1.

Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar mediante el uso de FASTA mediante parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la secuencia incógnita y la secuencia de búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, en especial, BLASTP o TBLASTN, mediante parámetros predeterminados. Véase, por ejemplo, Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul y otros (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

Moléculas de unión al antígeno biespecíficas

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Ver, por ejemplo, Tutt y otros, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer y otros, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Los anticuerpos anti-CD28 de la presente invención pueden estar unidos o se pueden expresar conjuntamente con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este puede estar unido funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

El uso de la expresión “anticuerpo anti-CD28” en el presente documento pretende incluir tanto anticuerpos anti-CD28 monoespecíficos como anticuerpos biespecíficos que comprenden un brazo de unión a CD28 y un segundo brazo que se une a un antígeno diana. Por lo tanto, la presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en donde un brazo de una inmunoglobulina se une a CD28 humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un antígeno diana. El antígeno diana al que se une el otro brazo del anticuerpo biespecífico para CD28 puede ser cualquier antígeno expresado sobre o en las proximidades de una célula, tejido, órgano, microorganismo o virus, contra el cual se desea una respuesta inmunitaria dirigida. El brazo de unión a CD28 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se exponen en la Tabla 1 de la presente. En determinadas

modalidades, el brazo de unión a CD28 se une a CD28 humano e induce la proliferación de células T humanas.

En el contexto de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención en los que un brazo del anticuerpo se une a CD28 y el otro brazo se une a un antígeno diana, el antígeno diana puede ser un antígeno asociado a un tumor, tal como PSMA.

De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas, la presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas que se unen específicamente a CD28 y PSMA. Estas moléculas pueden denominarse en el presente documento, por ejemplo, moléculas biespecíficas "anti-CD28/anti-PSMA" o "anti-CD28xPSMA" o "CD28xPSMA" o "anti-PSMA/anti-CD28" o "anti-PSMAxCD28" o "PSMAxCD28", u otra terminología similar.

El término "PSMA", como se usa en este documento, se refiere a la proteína PSMA humana a menos que se especifique que proviene de una especie no humana (por ejemplo, "PSMA de ratón", "PSMA de mono", etc.). La proteína PSMA humana tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 73, y/o tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en el número de acceso de NCBI NP_004467.1.

De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas como se muestra en la **Figura 1**, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) pueden tener un brazo efector y un brazo de direccionamiento. El brazo efector puede ser el primer dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti-CD28) que se une a los antígenos de las células efectoras (por ejemplo, células T). El brazo de direccionamiento puede ser el segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti-PSMA) que se une a los antígenos en las células diana (por ejemplo, células tumorales). De acuerdo con determinadas modalidades ilustrativas, el brazo efector se une a CD28 y el brazo de direccionamiento se une a PSMA. La molécula anti-CD28/PSMA biespecífica puede proporcionar una señal coestimuladora a las células efectoras (por ejemplo, células T). El brazo efector no tiene ningún efecto para estimular las células T sin agruparse. Tras la agrupación, el brazo efector por sí solo tiene poco efecto para estimular las células T. En combinación con el brazo de direccionamiento, el brazo efector estimula las células T. El brazo dirigido al tumor puede tener una especificidad tumoral imperfecta. El antígeno que es la diana del brazo de direccionamiento (por ejemplo, PSMA) puede expresarse en una fracción de células tumorales. La especificidad del brazo de direccionamiento al tumor puede

aumentarse al superponerse con la combinación con moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD3 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico anti-CD3/PSMA).

Como se usa en la presente, la expresión "molécula de unión al antígeno" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende o consiste en al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que sola, o en combinación con una o más CDR y/o regiones de marco (FR) adicionales, se une específicamente a un antígeno particular. En ciertas formas de realización, una molécula de unión al antígeno es un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo, como se definen esos términos en otra parte de la presente.

Como se usa en la presente, la expresión "molécula de unión a antígenos, biespecífica" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. Cada dominio de unión a antígeno dentro de la molécula de unión al antígeno biespecífica comprende al menos una CDR que, por sí sola o en combinación con una o más CDR y/o FR adicionales, se fija específicamente a un antígeno particular. En el contexto de la presente invención, el primer dominio de unión a antígeno se une específicamente a un primer antígeno (por ejemplo, CD28), y el segundo dominio de unión a antígeno se une específicamente a un segundo antígeno distinto (por ejemplo, PSMA).

En ciertas modalidades ilustrativas de la presente invención, la molécula de unión a antígenos, biespecífica es un anticuerpo biespecífico. Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de la cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de la cadena ligera (LCVR). En el contexto de una molécula de unión a antígenos, biespecífica que comprende un primer y segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), las CDR del primer dominio de unión a antígeno se pueden designar con el prefijo "D1" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno se puede designar con el prefijo "D2". Por lo tanto, las CDR del primer dominio de unión a antígeno se pueden denominar en la presente D1-HCDR1, D1-HCDR2 y D1-HCDR3; y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno se pueden denominar en la presente D2-HCDR1, D2-HCDR2 y D2-HCDR3.

El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar conectados directa o indirectamente entre sí para formar una molécula de unión a antígenos, biespecífica de la presente invención. Alternativamente, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden

estar conectados cada uno a un dominio de multimerización separado. La asociación de un dominio de multimerización con otro dominio de multimerización facilita la asociación entre los dos dominios de unión al antígeno, para formar así una molécula de unión al antígeno biespecífica. Como se usa en la presente, un "dominio de multimerización" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo dominio de multimerización que tiene una estructura o constitución igual o similar. Por ejemplo, un dominio de multimerización puede ser un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H3. Un ejemplo no limitativo de un componente de multimerización es una porción Fc de una inmunoglobulina (que comprende un dominio C_H2-C_H3), por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipos.

Las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la presente invención comprenderán típicamente dos dominios de multimerización, por ejemplo, dos dominios Fc que son, cada uno individualmente, parte de una cadena pesada de anticuerpo distinta. El primer y segundo dominios de multimerización pueden ser del mismo isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. De manera alternativa, el primer y segundo dominios de multimerización pueden ser de diferentes isotipos de IgG, por ejemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etc.

En ciertas modalidades, el dominio de multimerización es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un residuo de cisteína. En otras modalidades, el dominio de multimerización es un residuo de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios de multimerización incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de bucle de hélice o un motivo de bobina enrollada.

Cualquier formato o tecnología de anticuerpo biespecífico se pueden utilizar para formar las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de este que tiene una primera especificidad de unión al antígeno puede estar unido funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión al antígeno para producir una molécula de unión a antígenos, biespecífica. Formatos biespecíficos ilustrativos específicos que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, entre

otros, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (OVO)-Ig, Cuadroma, botones en ojales (*knobs-into-holes*), cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEEO)cuerpo, cremallera de leucina, Duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de doble efecto (OAF)-IgG, y formatos biespecíficos de Mab² (ver, por ejemplo, Klein y otros 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas allí, para una revisión de los formatos anteriores).

En el contexto de moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la presente invención, los dominios de multimerización, por ejemplo, dominios Fc, pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones) en comparación con la versión de tipo silvestre, natural, del dominio Fc. Por ejemplo, la invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas que comprenden una o más modificaciones en el dominio Fc que dan como resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, aumentada o disminuida) entre Fc y FcRn. En una modalidad, la molécula de unión a antígenos, biespecífica comprende una modificación en una región C_H2 o C_H3, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc con respecto a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma en donde el pH varía desde alrededor de 5,5 hasta alrededor de 6,0). Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, LN/FIW o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/EID o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, UR/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o V); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación de 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación de 428L, 2591 (por ejemplo, V2591) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación de 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación de 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación de 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

La presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas que comprenden un primer dominio C_H3 y un segundo dominio de Ig C_H3, en donde el primer y segundo dominios de Ig C_H3 difieren entre sí por al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo

biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que no tiene la diferencia de aminoácidos. En una forma de realización, el primer dominio de Ig C_H3 se fija a la proteína A y el segundo dominio de Ig C_H3 contiene una mutación que disminuye o suprime la fijación a la proteína A, tal como una modificación de H95R (de acuerdo con numeración IMGT de exón; H435R de acuerdo con numeración EU). El segundo C_H3 puede además comprender una modificación de Y96F (de acuerdo con IMGT; Y436F de acuerdo con EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L 18M, N44S, K52N, V57M y V821 (de acuerdo con IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V4221 de acuerdo con EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V821 (IMGT; N384S, K392N y V4221 de acuerdo con EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V821 (de acuerdo con IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V4221 de acuerdo con EU) en el caso de anticuerpos IgG4.

En ciertas modalidades, el dominio Fc puede ser quimérico, que combina las secuencias de Fc derivadas de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una secuencia C_H2 derivada de una región C_H2 de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o la totalidad de una secuencia C_H3 derivada de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede contener una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un ejemplo particular de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente comprende, desde el extremo N al C terminal: [C_H1 de IgG4]-[bisagra superior de IgG4]-[bisagra inferior de IgG2]-[CH2 de IgG4]-[C_H3 de IgG4]. Otro ejemplo de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente comprende, desde el extremo N al C terminal: [C_H1 de IgG1]-[bisagra superior de IgG1]-[bisagra inferior de IgG2]-[C_H2 de IgG4]-[C_H3 de IgG1]. Estos y otros ejemplos de dominios Fc quiméricos que pueden incluirse en cualquiera de las moléculas de unión a antígenos de la presente invención se describen en el documento WO2014/022540 A1, Los dominios Fc quiméricos que tienen estas disposiciones estructurales generales, y variantes de estos, pueden tener una unión alterada al receptor de Fc, que a su vez afecta la función efectora de Fc.

Variantes de secuencia

Los anticuerpos y moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la presente invención pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones de marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las cuales se derivaron los dominios de unión al antígeno individuales. Tales mutaciones se pueden determinar fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente con las secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en las bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Las moléculas de unión al antígeno de la presente invención pueden comprender fragmentos de unión al antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos ilustrativas que se describen en la presente, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de marco y/o CDR mutan con respecto al (a los) residuo(s) correspondiente(s) de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo, o al (a los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del (de los) residuo(s) correspondiente(s) de la línea germinal (tales cambios de secuencia se denominan en la presente colectivamente "mutaciones de la línea germinal"). Una persona del oficio de nivel medio, que comience con las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera descritas en la presente, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de las líneas germinales individuales o combinaciones de estas. En ciertas modalidades, todos los residuos del marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L están mutados nuevamente a los residuos que se encuentran en la secuencia de la línea germinal original de la que el dominio de unión a antígeno deriva originalmente. En otras modalidades, solo ciertos residuos vuelven a mutar a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos del marco y/o CDR mutan a los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual el dominio de unión a antígeno deriva originalmente). Además, los dominios de unión al antígeno pueden contener cualquier

combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones del marco y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados residuos individuales mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que otros residuos distintos a la secuencia de la línea germinal original se mantienen o mutan al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta. Una vez obtenidos, los dominios de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden analizar fácilmente para determinar una o más propiedades deseadas, tales como especificidad de fijación mejorada, afinidad de fijación aumentada, propiedades biológicas agonistas o antagonistas mejoradas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Las moléculas de unión al antígeno biespecíficas que comprenden uno o más dominios de unión al antígeno obtenidos de esta manera general están incluidas dentro de la presente invención.

La presente invención incluye, además, moléculas de unión al antígeno en donde uno o ambos dominios de unión al antígeno comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión al antígeno que comprenden un dominio de unión a antígeno que tiene secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente. Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es aquella en la que un residuo de aminoácido es sustituido con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no modificará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo

conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) Science 256: 1443-1445. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La presente invención incluye, además, moléculas de unión al antígeno que comprenden un dominio de unión a antígeno con una secuencia de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR que es sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente. La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a una secuencia de aminoácidos, significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando están alineadas de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacios predeterminados, comparten al menos 95% de identidad de secuencia, aun con mayor preferencia, al menos 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar de manera ascendente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las personas del oficio de nivel medio conocen los medios para realizar este ajuste. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24, 307-331.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que se denomina también identidad de secuencia, se mide en general mediante software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares mediante el uso de medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, que incluyen las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas, tales como Gap y Bestfit, que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de esta. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar mediante el uso de FASTA mediante parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la secuencia incógnita y la secuencia de búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro

algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, en especial, BLASTP o TBLASTN, mediante parámetros predeterminados. Véase, por ejemplo, Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul y otros (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

Unión dependiente del pH

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA, con características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD28 de la presente invención puede exhibir una unión reducida a CD28 a pH ácido en comparación con pH neutro. De manera alternativa, los anticuerpos anti-PSMA de la invención pueden exhibir una unión mejorada a PSMA a pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH inferiores a alrededor de 6,2, por ejemplo, alrededor de 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o menos. Como se usa en la presente, la expresión "pH neutro" significa un pH de alrededor de 7,0 a alrededor de 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de alrededor de 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En ciertos casos, "unión reducida a pH ácido en comparación con pH neutro" se expresa en términos de una relación del valor de K_D de la unión del anticuerpo a su antígeno a pH ácido y el valor de K_D de la unión del anticuerpo a su antígeno a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, se puede considerar que un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, exhibe "unión reducida a CD28 a pH ácido en comparación con pH neutro" para los fines de la presente invención si el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este exhibe una relación de K_D de ácido/neutro de alrededor de 3,0 o mayor. En ciertas formas de realización de ejemplo, la relación K_D de ácido/neutro para un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede ser de alrededor de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o mayor.

Los anticuerpos con características de unión dependientes del pH se pueden obtener, por ejemplo, mediante el cribado de una población de anticuerpos en busca de una unión reducida (o aumentada) a un antígeno particular a pH ácido, en comparación con pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión a antígeno en el nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH.

Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un residuo de histidina, se puede obtener un anticuerpo con unión reducida al antígeno a pH ácido con respecto a pH neutro.

Anticuerpos que comprenden variantes de Fc

De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA se proporcionan de manera tal que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que aumentan o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos y moléculas de unión a antígenos que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la(s) mutación(es) aumenta(n) la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma en donde el pH varía de alrededor de 5,5 a alrededor de 6,0). Tales mutaciones pueden dar como resultado un aumento de la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una forma de realización, la modificación comprende una modificación de 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación de 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación de 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación de 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación de 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA, que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las anteriores mutaciones del dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de

anticuerpos descritas en la presente, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Características biológicas de los anticuerpos y las moléculas de unión a antígenos

La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a CD28 y/o PSMA humanos con alta afinidad. La presente invención incluye, además, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a CD28 y/o PSMA humanos con afinidad media o baja, en función del contexto terapéutico y las propiedades particulares de direccionamiento que se deseen. Por ejemplo, en el contexto de una molécula de unión a antígenos, biespecífica, en donde un brazo se une a CD28 y el otro brazo se une a un antígeno diana (por ejemplo, PSMA), puede ser conveniente que el brazo de unión al antígeno diana se una al antígeno diana con una afinidad alta mientras que el brazo anti-CD28 se une a CD28 con una afinidad moderada o baja. De esta manera, se puede lograr un direccionamiento preferencial de la molécula de unión al antígeno a las células que expresan el antígeno diana, evitando al mismo tiempo la unión general/no dirigida a CD28 y los efectos adversos asociados a ello.

De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que se unen a CD28 humano (por ejemplo, a 25°C) con una K_D de menos de alrededor de 210 nM según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, con un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a CD28 con una K_D de menos de alrededor de 150 nM, menos de alrededor de 130 nM, menos de alrededor de 120 nM, menos de alrededor de 100 nM, menos de alrededor de 50 nM, menos de alrededor de 80 nM, menos de alrededor de 60 nM, menos de alrededor de 40 nM, o menos de alrededor de 30 nM, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, con el uso de un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en la presente o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a CD28 con una K_D entre alrededor de 30 nM y alrededor de 207 nM.

La presente invención incluye, además, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a CD28 con una semivida ($t_{1/2}$) disociativa mayor de alrededor de 3,5 minutos, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o

37 °C, por ejemplo, con el uso de un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en la presente, o un ensayo sustancialmente similar. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a CD28 con un $t_{1/2}$ mayor de alrededor de 5 minutos, mayor de alrededor de 10 minutos, mayor de alrededor de 20 minutos, mayor de alrededor de 30 minutos, mayor de alrededor de 40 minutos, mayor de alrededor de 50 minutos, mayor de alrededor de 60 minutos, mayor de alrededor de 70 minutos, mayor de alrededor de 80 minutos, mayor de alrededor de 90 minutos, mayor de alrededor de 100 minutos, mayor de alrededor de 200 minutos, mayor de alrededor de 300 minutos, mayor de alrededor de 400 minutos, mayor de alrededor de 500 minutos, mayor de alrededor de 600 minutos, mayor de alrededor de 700 minutos, mayor de alrededor de 800 minutos, mayor de alrededor de 900 minutos, mayor de alrededor de 1000 minutos o mayor de alrededor de 1200 minutos, según se midió mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, mediante el uso de un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en la presente o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) que pueden unirse simultáneamente a CD28 humano y PSMA humano. De acuerdo con determinadas modalidades, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, de la invención interactúan específicamente con células que expresan CD28 y/o PSMA. La medida en la que una molécula de unión a antígenos, biespecífica, se une a células que expresan CD28 y/o PSMA se puede analizar mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), como se ilustra en el Ejemplo 4 de la presente. Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que se unen específicamente a líneas celulares humanas que expresan CD28 pero no PSMA (por ejemplo, HEK293 modificadas para expresar CD28), y líneas celulares de carcinoma prostático humano que expresan PSMA pero no CD28 (por ejemplo, C4-2). La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que se unen a cualquiera de las células y las líneas celulares mencionadas anteriormente con un valor de EC_{50} de aproximadamente $9,6 \times 10^{-9}$ a aproximadamente $3,5 \times 10^{-10}$, o menos, según se determina mediante un ensayo de FACS como se establece en el Ejemplo 4 o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención proporciona, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA que inducen o aumentan la muerte de células tumorales mediada por células T. Por ejemplo, la presente invención incluye

anticuerpos anti-CD28xPSMA que inducen o aumentan la muerte de células tumorales mediada por células T con una EC_{50} de menos de aproximadamente 78 pM, como se mide en un ensayo de muerte de células tumorales mediada por células T *in vitro*, por ejemplo, mediante el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en este documento (por ejemplo, para evaluar el grado de muerte de células tumorales C4-2 por PBMC humanas en presencia de anticuerpos anti-CD28xPSMA), o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención inducen la muerte de células tumorales mediada por células T (por ejemplo, muerte de las células C4-2 mediada por PBMC) con un valor de EC_{50} de menos de aproximadamente 40 pM, menos de aproximadamente 20 pM, menos de aproximadamente 16 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 5,0 pM, menos de aproximadamente 4,0 pM, menos de aproximadamente 3,0 pM, menos de aproximadamente 2,5 pM, menos de aproximadamente 2,0 pM, menos de aproximadamente 1,5 pM, o menos de aproximadamente 1,45 pM, medido mediante un ensayo de muerte de células tumorales mediada por células T *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso del formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA que se unen a las células T humanas que expresan CD28 con un valor de EC_{50} de entre 1,0 pM y 1000 nM. En ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA se unen a las células T humanas que expresan CD28 con un valor de EC_{50} de entre 48 nM y 180 nM. Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA que se unen a las células T humanas que expresan CD28 con un valor de EC_{50} de aproximadamente 1 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 1000 nM o más.

La presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA que exhiben una o más características seleccionadas del grupo

que consiste en: (a) inducir la proliferación de células T *in vitro* (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 en este documento); (b) activar las células T, inducir la regulación positiva de CD25 y PD-1 en las PBMC humanas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 en este documento); (c) aumentar la citotoxicidad mediada por células T humanas en líneas celulares que expresan PSMA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 en este documento); (d) inducir citotoxicidad mediada por células T de primates vírgenes en líneas celulares que expresan PSMA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 en este documento); (e) agotar las células tumorales en ratones (por ejemplo, el Ejemplo 10 en este documento); (f) aumentar la eliminación de tumores en ratones (por ejemplo, el Ejemplo 10 en este documento); (g) no inducir una tormenta de citocinas (por ejemplo, el Ejemplo 10 en este documento); (h) no inducir una acción sistémica de las células T en mono cangrejero (por ejemplo, el Ejemplo 11 de la presente); (i) aumentar el efecto del bloqueo de PD-1 sobre la muerte de células tumorales inducida por la activación de células T (por ejemplo, el Ejemplo 13 en este documento); (j) aumentar la expansión de las células T de memoria (por ejemplo, el Ejemplo 13 en este documento).

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA que pueden agotar las células tumorales en un sujeto (véase, por ejemplo, el Ejemplo 8). Por ejemplo, de acuerdo con determinadas modalidades, se proporcionan moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, anti-CD28/anti-PSMA, en donde una sola administración de la molécula de unión a antígenos, biespecífica, a un sujeto (por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, o menos) provoca una reducción en la cantidad de células tumorales en el sujeto.

Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

El epítipo en CD28 o PSMA a los cuales se unen las moléculas de unión al antígeno de la presente invención puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína CD28 o una proteína PSMA. Alternativamente, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de CD28 o PSMA. Los anticuerpos de la invención pueden interactuar con los aminoácidos contenidos dentro de un monómero de CD28 o pueden interactuar con aminoácidos en dos cadenas diferentes de CD28 de un dímero de

CD28. El término "epítopo", como se usa en la presente, se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, distintos anticuerpos se pueden fijar a distintas áreas en un antígeno y pueden tener efectos biológicos distintos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptidos lineal. Un epítipo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. En algunas circunstancias, un epítipo puede incluir porciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

Se pueden usar diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica para determinar si un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ilustrativas que pueden usarse para determinar un epítipo o dominio de unión de un anticuerpo particular o dominio de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), mutagénesis puntual (por ejemplo, mutagénesis con exploración de alanina, mutagénesis con exploración de arginina, etc.), análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463), protección de proteasas y análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tales como escisión de epítopos, extracción de epítopos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica etiquetar con deuterio la proteína de interés, luego fijar el anticuerpo a la proteína etiquetada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere al agua para permitir que se produzca un intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los residuos, con la excepción de los residuos protegidos por el anticuerpo (que permanecen etiquetados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasas y análisis de espectrometría de masas, lo que revela los residuos etiquetados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que el anticuerpo interactúa. Ver, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259;

Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. El análisis de la estructura cristalina de rayos X también se puede usar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo.

La presente invención incluye además anticuerpos anti-CD28 y anti-PSMA que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en la Tabla 1 de la presente). Del mismo modo, la presente invención incluye, además, anticuerpos anti-CD28 y/o anti-PSMA que compiten por la unión a CD28 y/o PSMA con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la Tabla 1 de la presente).

La presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 humano y un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PSMA humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en CD28 que cualquiera de los dominios de unión al antígeno específicos para CD28 ilustrativos específicos, descritos en la presente, y/o en donde el segundo dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en PSMA que cualquiera de los dominios de unión al antígeno específicos para PSMA ilustrativos específicos que se describen en la presente.

Del mismo modo, la presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD28 humano y un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PSMA humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD28 con cualquiera de los dominios de unión al antígeno específicos para CD28 ilustrativos específicos que se describen en la presente, y/o en donde el segundo dominio de unión a antígeno compite por la unión a PSMA con cualquiera de los dominios de unión al antígeno específicos para PSMA ilustrativos específicos que se describen en la presente.

Se puede determinar fácilmente si una molécula de unión al antígeno particular (por ejemplo, anticuerpo) o dominio de unión a antígeno de esta se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, una molécula de unión al antígeno de referencia de la presente invención mediante métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo en CD28 (o

PSMA) que una molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia de la presente invención, primero se permite que la molécula biespecífica de referencia se una a una proteína CD28 (o proteína PSMA). A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula CD28 (o PSMA). Si el anticuerpo de prueba puede unirse a CD28 (o PSMA) después de la unión de saturación con la molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo de CD28 (o PSMA) que es distinto al que se une la molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la molécula CD28 (o PSMA) después de la unión de saturación con la molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo de CD28 (o PSMA) que el epítipo al que se une la molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia de la invención. Luego, se puede llevar a cabo una experimentación adicional de rutina (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba se debe de hecho a la unión al mismo epítipo que la molécula de unión a antígenos, biespecífica de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo pueden realizarse utilizando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de fijación a anticuerpos disponible en la técnica. De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, dos proteínas de unión al antígeno se unen al mismo epítipo (o se superponen) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de una proteína de unión al antígeno inhibe la unión de la otra en al menos un 50 %, pero, preferentemente, un 75 %, 90 % o incluso un 99 %, como se mide en un ensayo de unión competitiva (ver, por ejemplo, Junghans y otros, Cancer Res. 1990:50:1495-1502). De manera alternativa, se considera que dos proteínas de unión al antígeno se fijan al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión al antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Se considera que dos proteínas de unión al antígeno tienen "epítopos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión al antígeno reduce o elimina la unión de la otra.

Para determinar si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de este compite por la unión con una molécula de unión al antígeno de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se lleva a cabo en dos orientaciones: en una primera

orientación, se permite que la molécula de unión al antígeno de referencia se una a una proteína CD28 (o proteína PSMA) en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula CD28 (o PSMA). En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula CD28 (o PSMA) en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión de la molécula de unión al antígeno de referencia a la molécula CD28 (o PSMA). Si, en ambas orientaciones, solo la primera molécula de unión al antígeno (de saturación) puede unirse a la molécula CD28 (o PSMA), entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y la molécula de unión al antígeno de referencia compiten por la unión a CD28 (o PSMA). Como apreciará una persona del oficio de nivel medio, un anticuerpo que compite por la fijación con una molécula de unión al antígeno de referencia no necesariamente puede fijarse al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la fijación del anticuerpo de referencia al fijarse a un epítipo superpuesto o adyacente.

Preparación de dominios de unión al antígeno y construcción de moléculas biespecíficas

Los dominios de unión a antígenos, específicos para antígenos particulares, se pueden preparar mediante cualquier tecnología de generación de anticuerpos conocida en la técnica. Una vez obtenidos, dos dominios de unión al antígeno diferentes, específicos para dos antígenos diferentes (por ejemplo, CD28 y PSMA), se pueden disponer adecuadamente entre sí para producir una molécula de unión a antígenos, biespecífica de la presente invención utilizando métodos de rutina. (Un análisis de formatos de anticuerpos biespecíficos de ejemplo que se pueden usar para construir las moléculas de unión al antígeno biespecíficas de la presente invención se proporciona en otra parte de la presente). En ciertas modalidades, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas de unión al antígeno multiespecíficas de la invención se derivan de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para producir tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras de las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la presente invención se pueden preparar utilizando la tecnología VELOCIMMUNE™. Mediante la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología generadora de anticuerpos humanos), los anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra un antígeno particular (por ejemplo, CD28 o PSMA) se aíslan inicialmente y tienen una región

variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan en función de las características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que se pueden incorporar en las moléculas de unión al antígeno biespecíficas de la presente invención.

Se pueden utilizar animales modificados por ingeniería genética para fabricar moléculas de unión a antígenos, biespecíficas humanas. Por ejemplo, se puede usar un ratón modificado por ingeniería genética que es incapaz de reorganizar y expresar una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón, en donde el ratón expresa solo uno o dos dominios variables de cadena ligera humana codificados mediante secuencias de inmunoglobulina humana ligadas operativamente al gen de la constante kappa del ratón en la locus kappa de ratón endógeno. Tales ratones modificados por ingeniería genética se pueden usar para producir moléculas de unión al antígeno biespecíficas totalmente humanas que comprenden dos cadenas pesadas diferentes que se asocian con una cadena ligera idéntica que comprende un dominio variable derivado de uno de dos segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera humana diferentes. (Véase, por ejemplo, el documento US 2011/0195454 para un análisis detallado de dichos ratones modificados y el uso de estos para producir moléculas de unión a antígenos, biespecíficas).

Bioequivalentes

La presente invención abarca moléculas de unión a antígenos que tienen secuencias de aminoácidos que varían en comparación con las de los anticuerpos descritos pero que retienen la capacidad de unirse a CD28 y/o PSMA. Tales moléculas variantes comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia de origen, pero muestran una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas de unión a antígenos descritas. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican moléculas de unión a antígenos de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican una molécula de unión a antígeno que es esencialmente bioequivalente a las moléculas de unión a antígenos descritas de la invención. Los ejemplos de tales secuencias variantes de aminoácidos y ADN se analizaron anteriormente.

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos que son bioequivalentes a cualquiera de las moléculas de unión a antígenos ilustrativas que se exponen en la presente. Dos proteínas de unión al antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea dosis unitarias o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su velocidad de absorción y, sin embargo, se pueden considerar bioequivalentes debido a que tales diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado y no son esenciales para lograr concentraciones eficaces de fármacos en el cuerpo, por ejemplo, en el uso crónico, y se consideran significativas desde el punto de vista médico para el producto farmacéutico estudiado en particular.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígenos son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígenos son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado del riesgo de efectos adversos, que incluyen un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad o una eficacia disminuida, en comparación con la terapia continua sin el cambio.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígenos son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que tales mecanismos sean conocidos.

La bioequivalencia se puede demostrar mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en donde la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se correlaciona con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo* en humanos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en donde el efecto farmacológico agudo adecuado del anticuerpo (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo. Las variantes bioequivalentes de las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas ilustrativas, que se exponen en la presente se pueden construir, por ejemplo, mediante

diversas sustituciones de residuos o secuencias o mediante la eliminación de secuencias o residuos terminales o internos que no son necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos después de la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas ilustrativas, que se exponen en la presente, que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven la glucosilación.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

La presente invención, de acuerdo con determinadas modalidades, proporciona moléculas de unión a antígenos que se unen a CD28 humano pero no a CD28 de otras especies. La presente invención proporciona, además, moléculas de unión a antígenos que se unen al PSMA humano pero no al PSMA de otras especies. La presente invención incluye, además, moléculas de unión a antígenos que se unen a CD28 humano y a CD28 de una o más especies no humanas; y/o moléculas de unión al antígeno que se unen a PSMA humano y a PSMA de una o más especies no humanas.

De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas de la invención, se proporcionan moléculas de unión a antígenos que se unen a CD28 humano y/o PSMA humano y se pueden unir o no, según sea el caso, a uno o más de CD28 y/o PSMA de ratón, rata, cobayo, hámster, gerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, mono cangrejero, tití, Macaca mulatta o chimpancé. Por ejemplo, en una modalidad particular ilustrativa de la presente invención, se proporcionan moléculas de unión a antígenos, biespecíficas que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD28 humano y CD28 de mono cangrejero, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA humano.

Inmunoconjugados

La presente invención abarca moléculas de unión a antígeno conjugadas con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo. Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos de

agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo el documento WO 05/103081).

Formulación y administración terapéutica

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígenos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Se puede encontrar una multitud de formulaciones adecuadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell y otros "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

La dosis de una molécula de unión a antígenos que se administra a un paciente puede variar en función de la edad y el tamaño del paciente, la enfermedad diana, las afecciones, la vía de administración y similares. La dosis preferida generalmente se calcula de acuerdo con el peso corporal o el área de superficie corporal. Cuando una molécula de unión a antígenos, biespecífica de la presente invención se usa con fines terapéuticos en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar la molécula de unión a antígenos, biespecífica de la presente invención por vía intravenosa, normalmente en una dosis única de alrededor de 0,01 a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia, de alrededor de 0,02 a alrededor de 7, alrededor de 0,03 a alrededor de 5, o alrededor de 0,05 a alrededor de 3 mg/kg de peso corporal. Según la gravedad de la condición, se puede ajustar la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis y los horarios eficaces para administrar una molécula de unión al antígeno biespecífica se pueden determinar empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente se puede controlar mediante una evaluación periódica, y la dosis se puede ajustar en consecuencia. Además, el escalado de dosis

entre especies se puede realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti y otros, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen varios sistemas de administración que se pueden usar para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu y otros, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración por vía subcutánea, un dispositivo de administración de bolígrafo tiene aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de administración de jeringa precargada puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de jeringa precargada reutilizable en general utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se administró toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, este se puede desechar y reemplazar fácilmente con un cartucho nuevo que contiene la composición farmacéutica. Luego, el dispositivo de administración de jeringa precargada se puede volver a utilizar. En un dispositivo de administración de jeringa precargada desechable, no se reemplaza el cartucho. En su lugar, el dispositivo de administración de jeringa precargada viene previamente llenado con la composición farmacéutica que se mantiene en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se descarta todo el dispositivo.

Numerosos dispositivos de administración de jeringas precargadas y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, entre otros, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), jeringa precargada DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), jeringa precargada HUMALOG MIX 75/25™, jeringa precargada HUMALOG™, jeringa precargada

HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), jeringa precargada BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de jeringas precargadas desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, entre otros, jeringa precargada SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la jeringa precargada HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar algunos.

En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se puede usar una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos; ver, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Aun en otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana de la composición, lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, volumen 2, págs. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosa, subcutánea, intracutánea e intramuscular, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, mediante disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo, o su sal descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso utilizado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existe, por ejemplo, una solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante adecuado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo,

aceite de soja, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante, tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección así preparada se rellena, preferentemente, en una ampolla adecuada.

De manera ventajosa, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral anteriormente descritas se preparan en formas de dosis en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente es, en general, de alrededor de 5 a alrededor de 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en alrededor de 5 a alrededor de 100 mg y en alrededor de 10 a alrededor de 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de las moléculas de unión al antígeno

La presente invención incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CD28 o una molécula de unión a antígeno, biespecífica, que se une específicamente a CD28 y a un antígeno diana (por ejemplo, PSMA). La composición terapéutica puede comprender cualquiera de los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno biespecíficas que se describen en la presente y un portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, la expresión "un sujeto que lo necesita" significa un ser humano o un animal no humano que presenta uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que expresa un tumor o que padece de cualquiera de los tipos de cáncer mencionados a continuación en la presente), o que de otro modo se beneficiaría de una inhibición o reducción de la actividad de PSMA o una disminución de las células PSMA+.

Los anticuerpos y moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la invención (y las composiciones terapéuticas que los comprenden) son útiles, entre otros, para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en donde la estimulación, la activación y/o el direccionamiento de una respuesta inmunitaria serían beneficiosos. En particular, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas anti-CD28/anti-PSMA de la presente invención se pueden usar para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión de PSMA o la actividad o proliferación de células PSMA+. Los mecanismos de acción

mediante los que se logran los métodos terapéuticos de la invención incluye la muerte de las células que expresan PSMA en presencia de células efectoras, por ejemplo, células T. Las células que expresan PSMA que se pueden inhibir o destruir con el uso de las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas de la invención incluyen, por ejemplo, células tumorigénicas de próstata.

Las moléculas de unión a antígenos de la presente invención pueden usarse para tratar, por ejemplo, tumores primarios y/o metastásicos que surgen en el cáncer de colon, pulmón, mama, riñón y subtipos de cáncer de vejiga. De acuerdo con determinadas modalidades ilustrativas, las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, de la presente invención se utilizan para tratar un cáncer de próstata.

La presente invención incluye, además, métodos para el tratamiento de un cáncer residual en un sujeto. Como se usa en la presente, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después del tratamiento con un tratamiento contra el cáncer.

De acuerdo con ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de PSMA (por ejemplo, cáncer de próstata) que comprenden administrar una o más de las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, descritas en otra parte en la presente a un sujeto después de que se determina que el sujeto no responde a otros tipos de terapia contra el cáncer. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos para tratar el cáncer de próstata que comprenden administrar una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA a un paciente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 año o más después de que el sujeto ha recibido un tratamiento de referencia para pacientes que padecen de cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata. En otros aspectos, una molécula de unión a antígenos, biespecífica de la invención (una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA) que comprende un dominio Fc de IgG4 se administra inicialmente a un sujeto en uno o más puntos de tiempo (por ejemplo, para proporcionar agotamiento inicial consistente de las células de cáncer de próstata), seguido de la administración de una molécula de unión a antígenos, biespecífica equivalente que comprende un dominio de IgG diferente, tal como un dominio Fc de IgG1, en puntos de tiempo posteriores. Se prevé que los anticuerpos anti-CD28/anti-PSMA de la invención puedan usarse junto con otras moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, tales como un anticuerpo biespecífico anti-PSMA/anti-CD3. También se prevé que los anticuerpos biespecíficos de la invención

se usarán junto con inhibidores de puntos de control, por ejemplo, aquellos que se dirigen a PD-1 y CTLA-4, y otras dianas. Puede ser ventajoso combinar dos anticuerpos biespecíficos que se dirijan al mismo antígeno tumoral (por ejemplo, PSMA), pero donde uno de los biespecíficos se dirija al CD3 en las células T y el otro biespecífico se dirija a una molécula coestimuladora como CD28. Esta combinación puede usarse sola para aumentar la destrucción de células tumorales o puede usarse en combinación con un inhibidor de punto de control.

Tratamientos conjuntos y formulaciones

La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos y moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, ilustrativos y descritos en el presente documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden administrar tales combinaciones a sujetos que las necesiten.

Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos que pueden combinarse o administrarse en combinación con una molécula de unión a antígenos de la presente invención incluyen, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, inhibidores de puntos de control que se dirigen a PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 como pembrolizumab o nivolumab; véase también el documento US9,987,500), CTLA-4, LAG3, TIM3 y otros, anticuerpos bivalentes agonistas coestimuladores que se dirigen a moléculas como GITR, OX40, 4-1BB y otras), anticuerpos biespecíficos CD3x (ver, por ejemplo, los documentos WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 y WO2018/058001A1), otros anticuerpos que se dirigen a PSMA X CD3 (ver, por ejemplo, el documento WO2017/023761A1) y otros anticuerpos biespecíficos CD28x coestimuladores.

Otros agentes que pueden administrarse beneficiosamente en combinación con anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, inhibidores de aromatasa e inhibidores de citocinas, incluidos inhibidores de citocinas de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus respectivos receptores. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a antígenos, biespecífica anti-CD28/anti-PSMA como se describe en la presente) también se pueden administrar como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones

terapéuticas seleccionadas de "ICE": ifosfamida (por ejemplo, Ifex®), carboplatino (por ejemplo, Paraplatin®), etopósido (por ejemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": dexametasona (por ejemplo, Decadron®), citarabina (por ejemplo, Cytosar-U®, arabinósido de citosina, ara-C), cisplatino (por ejemplo, Platinol®-AQ); y "ESHAP": etopósido (por ejemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), metilprednisolona (por ejemplo, Medrol®), citarabina en dosis altas, cisplatino (por ejemplo, Platinol®-AQ).

La presente invención incluye, además, combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión al antígeno mencionadas en la presente y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplakin, o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es una aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, un ARNip, un peptidocuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). Las moléculas de unión al antígeno de la invención también se pueden administrar y/o formular conjuntamente en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides y/o NSAID. Las moléculas de unión al antígeno de la invención también se pueden administrar como parte de un régimen de tratamiento que incluye, además, tratamiento de radiación y/o quimioterapia convencional, o tratamiento con un agente biológico, que incluye inhibidores de puntos de control u otros anticuerpos biespecíficos.

La presente invención incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión al antígeno descritas en el presente documento en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CytosanTM); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentioposforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosureas

tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK™; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (Taxotere™, Aventis Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrone; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados aceptable desde el punto de vista farmacéutico de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos, incluidos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida,

nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados aceptables desde el punto de vista farmacéutico de cualquiera de los anteriores.

El(Los) componente(s) terapéuticamente activo(s) adicional(es) se puede(n) administrar justo antes de, simultáneamente con, o poco después de la administración de una molécula de unión al antígeno de la presente invención; (para los fines de la presente descripción, tales regímenes de administración se consideran la administración de una molécula de unión al antígeno "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional).

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en donde una molécula de unión al antígeno de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales, como se describe en otra parte en la presente.

Regímenes de administración

De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, múltiples dosis de una molécula de unión al antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD28 o una molécula de unión a antígenos, biespecífica que se une específicamente a PSMA y CD28) se pueden administrar a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar de forma secuencial a un sujeto múltiples dosis de una molécula de unión al antígeno de la invención. Como se usa en la presente, "administración secuencial" significa que cada dosis de una molécula de unión al antígeno se administra al sujeto en un punto de tiempo diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar de forma secuencial al paciente una dosis inicial única de una molécula de unión al antígeno, seguida por una o más dosis secundarias de la molécula de unión al antígeno, y, opcionalmente, seguida por una o más dosis terciarias de la molécula de unión al antígeno.

Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de administración de la molécula de unión al antígeno de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también denominada "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de la

molécula de unión al antígeno, pero en general pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. Sin embargo, en ciertas modalidades, la cantidad de una molécula de unión al antígeno contenida en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria varía entre estas (por ejemplo, se ajusta hacia arriba o hacia abajo según sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En ciertas modalidades, se administran dos o más dosis (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga", seguidas de dosis posteriores que se administran de manera menos frecuente (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En una modalidad ilustrativa de la presente invención, se administra cada dosis secundaria y/o terciaria de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en la presente, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de molécula de unión al antígeno que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de una molécula de unión al antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD28 o una molécula de unión a antígenos, biespecífica que se une específicamente a PSMA y CD28). Por ejemplo, en ciertas formas de realización, solo se administra una dosis secundaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más dosis secundarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más). Del mismo modo, en ciertas formas de realización, solo se administra una dosis terciaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más dosis terciarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más).

En las formas de realización que incluyen múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria se puede administrar a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente 1 a 2 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en modalidades que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar a la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente 2 a 4 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera alternativa, la frecuencia con la que se

administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de la administración también puede ser ajustada durante el transcurso del tratamiento por un médico, en función de las necesidades del paciente individual después de un examen clínico.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención también se pueden usar para detectar y/o medir CD28 o PSMA, o células que expresan CD28 o que expresan PSMA en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD28 x PSMA, o un fragmento de este, se puede usar para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por una expresión anómala (por ejemplo, sobreexpresión, expresión insuficiente, falta de expresión, etc.) de CD28 o PSMA. Los ensayos diagnósticos ilustrativos para CD28 o PSMA pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo de la invención, en donde el anticuerpo está etiquetado con una etiqueta detectable o molécula indicadora. De manera alternativa, un anticuerpo no etiquetado se puede usar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está etiquetado de forma detectable. La etiqueta detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; una porción fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano o luciferasa. Los ensayos específicos ilustrativos que se pueden usar para detectar o medir CD28 o PSMA en una muestra incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las muestras que se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico con CD28 o PSMA de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se puede obtener de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína CD28 o PSMA, o fragmentos de estas, en condiciones normales o condiciones patológicas. En general, se medirán los niveles de CD28 o PSMA en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente que no tiene una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad anormal de CD28 o PSMA) para establecer inicialmente un nivel de referencia, o patrón, de CD28 o PSMA. Este nivel de referencia de CD28 o PSMA se puede comparar con los niveles de CD28 o PSMA medidos en muestras obtenidas de

individuos que se cree que tienen una enfermedad o afección relacionada con CD28 o PSMA.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se establecen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se realizan y usan los métodos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se ha intentado garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Resumen

El reciente éxito clínico de los anticuerpos biespecíficos contra antígenos específicos del tumor (TSA) o antígenos asociados al tumor (TAA) y CD3, como los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD3, está transformando la inmunoterapia contra el cáncer. Los anticuerpos TAA-CD3 ofrecen soluciones terapéuticas relativamente seguras y disponibles de inmediato que pueden llegar a ser una nueva clase importante de inmunoterapia. Sin embargo, es posible que no logren la eficacia observada con los enfoques de células CAR-T, que activan una segunda señal coestimuladora a menudo mediada por el dominio intracelular de CD28. De hecho, los anticuerpos activadores de CD28 son increíblemente poderosos pero también tóxicos en estudios en humanos. El término TSA y TAA se pueden usar indistintamente en este documento.

En la presente se describe una nueva clase de anticuerpos biespecíficos, denominados TAA-CD28, que parecen ser seguros, bien tolerados por sí mismos y cuando se combinan con TAA-CD3, para generar respuestas antitumorales muy amplificadas y altamente dirigidas. Con el uso de TAA, como PSMA, expresados en el tumor de próstata, se ha encontrado que TAAxCD28 mejora la activación de las células T y potencia significativamente la lisis de las células tumorales en presencia de una diana tumoral y un estímulo TCR/CD3.

Se ha demostrado que los anticuerpos biespecíficos TAAxCD28 de la invención mejoraron significativamente la inmunidad antitumoral mediada por la activación de células T inducida por TAAxCD3 en modelos de tumores singénicos. La combinación

de CD3 con un antígeno tumoral con expresión tisular normal limitada indujo poca o ninguna producción de citocinas periféricas solo o cuando se combinó con TAAxCD28 en modelos de primates no humanos y ratones humanizados. Además, TAAxCD28 administrado solo produjo una secreción de citocinas séricas y activación de células T mínimas o nulas en monos cangrejeros en comparación con un anticuerpo superagonista de CD28. Estos resultados sugieren que la combinación de esta novedosa clase de anticuerpos biespecíficos coestimuladores con la clase emergente de TAA-CD3 puede proporcionar soluciones biológicas más seguras y listas para usar, que podrían mejorar notablemente la eficacia de las moléculas biespecíficas tradicionales TAA-CD3.

Introducción

Aunque los anticuerpos monoclonales se han establecido como agentes terapéuticos antitumorales durante las últimas dos décadas, tienen una capacidad limitada para movilizar las células T y ejercer eficazmente su actividad citotóxica en el sitio del tumor. La capacidad de los anticuerpos biespecíficos para la inmunoterapia dirigida a células T y la subsiguiente destrucción de células tumorales se ha demostrado previamente. De hecho, la plataforma de anticuerpos biespecíficos tiene como objetivo reclutar células efectoras inmunitarias mediante la combinación de un dominio anti-CD3 con un dominio de unión a la diana tumoral. Recientemente, Catumaxomab (EpCAMxCD3) y Blinatumomab (CD19xCD3) recibieron la aprobación regulatoria para la leucemia linfoblástica aguda, mientras que se están investigando muchos otros anticuerpos biespecíficos. De hecho, se han construido anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto el marcador de células B CD20 como el componente CD3 del repertorio de células T y actualmente se encuentran bajo investigación clínica para neoplasias malignas hematológicas. De hecho, TAA-CD3 ofrece soluciones terapéuticas relativamente seguras y listas para usar que no tienen que ser personalizadas de manera muy laboriosa para pacientes individuales. Sin embargo, aunque los biespecíficos TAA-CD3 pueden resultar ser una nueva clase importante de inmunoterapia, las comparaciones de estudios cruzados sugieren que es posible que no estén logrando la eficacia observada con los enfoques CAR-T.

Dos fármacos basados en células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR), Kymriah y Yescarta, han recibido recientemente la aprobación de la FDA para neoplasias malignas de células B en sangre, lo que demuestra el gran potencial de este enfoque en el campo de la inmunoterapia personalizada contra el cáncer. Ambos

productos utilizan el antígeno CD19 como antígeno asociado al tumor (TAA), que es una diana ideal para la muerte mediada por células T debido a su expresión restringida a las células B, que minimiza la toxicidad por acción fuera del objetivo y mejora la eficacia antitumoral. Sin embargo, la alta potencia de las células CAR-T se ha asociado con efectos adversos como el síndrome de liberación de citocinas (SRC) y la neurotoxicidad. Además, todos los pacientes aún no se benefician del tratamiento, y la cantidad de variables que podrían afectar el resultado clínico de cada paciente es relativamente alta en los enfoques autólogos y alogénicos. Además, los intentos de dirigirse a antígenos asociados a tumores en los tumores sólidos han logrado un éxito limitado hasta ahora, mostrando una actividad antitumoral mínima o efectos adversos graves. El microambiente inhibitorio del tumor, el escaso acceso de las células CAR-T a todo el tejido tumoral, junto con la laboriosa fabricación, representan algunos de los desafíos actuales para la prometedora terapia con células CAR-T.

Una de las limitaciones de los tratamientos inmunoterapéuticos actuales es inducir de manera óptima la propia respuesta inmunitaria del paciente contra las células tumorales mediante el reconocimiento de células tumorales específicas y la inducción de citotoxicidad. La activación eficaz de células T vírgenes y la inducción de poblaciones de células T de memoria experimentadas requieren señales coestimuladoras (señal 2) además del estímulo específico del antígeno a través del complejo TCR/CD3 (señal 1). El agonismo de las vías coestimuladoras CD28 y 4-1BB puede proporcionar una potenciación significativa de la lisis de las células diana que podría beneficiar la resistencia de los pacientes a diferentes inmunoterapias. Sin embargo, el papel más amplio de la coestimulación sigue siendo objeto de evaluación en oncología clínica. Muchos tumores carecen de receptores coestimuladores, lo que les impide mejorar aún más la activación de T inducida por CD3xTAA.

Un cribado a ciegas de las vías coestimuladoras realizado en el presente documento mediante la expresión forzada de ligandos coestimuladores en un panel de tumores singénicos estableció al CD28 como uno de los receptores coestimuladores más potentes junto con 4-1BB. Además, en el presente documento se construyeron anticuerpos biespecíficos basados en coestimuladores que unen CD28 en la superficie de las células T, con TAA de tejidos de próstata para potenciar la respuesta antitumoral. En el presente documento se describen datos que demuestran que la terapia de combinación con biespecíficos TAA-CD3 y TAA-CD28 potenciaron eficazmente la activación y la citotoxicidad de las células T en presencia de estimulación tanto de TAA como de TCR, lo que condujo a una mayor inmunidad

antitumoral. De hecho, los datos divulgados en este documento sugieren que la combinación de esta novedosa clase de biespecíficos (TAA-CD28) con la clase emergente TAA-CD3 puede proporcionar soluciones biológicas más seguras y listas para usar, que pueden acercarse a la eficacia de la terapia personalizada con células CAR-T.

Más específicamente, se generaron anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 ilustrativos y se demostró que anti-PSMAxCD28 ilustrativo potencia la activación de células T inducida por PSMAxCD3 o CD20xCD3 *in vitro* y mejora de forma segura la eficacia antitumoral *in vivo*. La actividad *in vitro* se demostró con imágenes de anticuerpos biespecíficos localizados en la sinapsis inmunitaria de un conjugado de células T y células diana, aumento de la proliferación, liberación de citocinas y citotoxicidad inducidas por PSMAxCD3. La eficacia antitumoral *in vivo* se evaluó en modelos de tumores de ratón (singénicos). El volumen tumoral y las citocinas séricas se monitorearon a lo largo del tiempo para demostrar la respuesta al tratamiento con anticuerpos biespecíficos. Se realizó un estudio en monos cangrejeros para determinar la seguridad y tolerabilidad de PSMAxCD28 ilustrativo de la invención en un primate no humano. Los animales se examinaron para determinar la toxicidad mediante observaciones clínicas y muestras de sangre para analizar las citocinas séricas y el fenotipo de las células T.

Como se describe en detalle a continuación, se han generado anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos para potenciar la activación de las células T dependientes de TCR/CD3, para imitar así la coestimulación (señal 2) proporcionada por las APC profesionales.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los NIH. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Regeneron Pharmaceuticals.

Ejemplo 1. Construcción de anticuerpos anti-PSMAxCD28

Generación de anticuerpos anti-CD28

Los anticuerpos anti-CD28 se obtuvieron mediante la inmunización de un ratón VELOCIMMUNE® (es decir, un ratón modificado por ingeniería genética que comprende ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana) con proteína CD28 humana fusionada a la porción Fc de la IgG2a de ratón, o con células que expresan CD28 o con ADN que codifica CD28. La respuesta inmunitaria del anticuerpo se monitoreó mediante un

inmunoensayo específico para CD28. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, los esplenocitos se recolectaron y fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se cribaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos para CD28. Mediante esta técnica, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-CD28 (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, varios anticuerpos anti-CD28 completamente humanos se aislaron directamente de células B positivas para el antígeno sin fusión con células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

Ciertas propiedades biológicas de los anticuerpos anti-CD28 ilustrativos generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los ejemplos a continuación.

Generación de anticuerpos anti-PSMA

Los anticuerpos anti-PSMA se obtuvieron mediante la inmunización de un ratón modificado genéticamente con un antígeno de PSMA humano o mediante la inmunización de un ratón modificado por ingeniería genética que comprende ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana con un antígeno de PSMA humano. Alternativamente, los ratones se inmunizaron con células de cáncer de próstata humano (LNCaP, ATTC, Manassas, Virginia, Estados Unidos) que expresaban PSMA humano (UniProtKB/Swiss-Prot. núm. Q04609). La respuesta inmunitaria de anticuerpos se monitoreó mediante un inmunoensayo específico para PSMA. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada se recogieron esplenocitos de cada ratón y (1) se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar células de hibridoma y se cribaron para determinar la especificidad para PSMA, o (2) se clasificaron las células B (como se describe en el documento US 2007/0280945A1) con el uso de un PSMA humano con una etiqueta 6-His N-terminal (R&D, Cat. Núm. 4234-ZN) como el reactivo de clasificación que se une e identifica a los anticuerpos reactivos (células B positivas para el antígeno). Los anticuerpos quiméricos para PSMA se aislaron inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizaron y seleccionaron según las características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, etc. De ser necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazaron con una región constante humana deseada, por ejemplo, IgG1 o IgG4

de tipo silvestre o modificada, para generar un anticuerpo anti-PSMA completamente humano.

Generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD28 y PSMA

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión específico anti-PSMA y un dominio de unión específico anti-CD28 se construyeron mediante metodologías estándar, en donde el dominio de unión a antígeno anti-PSMA y el dominio de unión a antígeno anti-CD28 comprenden cada uno HCVR diferentes apareadas con una LCVR común. En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos se construyeron utilizando una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD28, una cadena pesada de un anticuerpo anti-PSMA y una cadena ligera común (véase la tabla 1). En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD28 de un anticuerpo biespecífico ilustrativo (bs16429D) se muestra en la SEQ ID NO.: 81. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-PSMA del anticuerpo biespecífico ilustrativo (bs16429D) se muestra en la SEQ ID NO.: 82. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera común para bs16429D se muestra en la SEQ ID NO.: 83.

Los anticuerpos biespecíficos creados de acuerdo con el presente Ejemplo comprenden dos dominios de unión a antígeno separados (*es decir*, brazos de unión). El primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada derivada de un anticuerpo anti-CD28 ("CD28-VH"), y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada derivada de un anticuerpo anti-PSMA ("PSMA-VH"). Tanto el anti-PSMA como el anti-CD28 comparten una cadena ligera común. La combinación CD28-VH/PSMA-VH crea dominios de unión a antígenos que reconocen específicamente CD28 en células T y PSMA en células tumorales.

Ejemplo 2. Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada y ligera

La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables y CDR de la cadena pesada y ligera de los diferentes anticuerpos biespecíficos obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 1. Los correspondientes identificadores de secuencias de ácido nucleico se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 1: ID de las secuencias de aminoácidos

Anticuerpo bienespecífico anti- PSMA x anti- CD28 PID	Segundo dominio de unión a antígeno (D2, anti-PSMA)				Primer dominio de unión a antígeno (D1, anti-CD28)				Región variable de la cadena ligera			
	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D1- HCDR3	D3- LCVR	D3- LCDR1	D3- LCDR2	D3- LCDR3
bs16429D	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
bs16430D	34	36	38	40	26	28	30	32	42	44	46	48
bs16431D	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72

Tabla 2: ID de secuencias de ácidos nucleicos

Anticuerpo bienespecífico anti- PSMA x anti- CD28 PID	Segundo dominio de unión a antígeno (D2, anti-PSMA)				Primer dominio de unión a antígeno (D1, anti-CD28)				Región variable de la cadena ligera			
	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D1- HCDR3	D3- LCVR	D3- LCDR1	D3- LCDR2	D3- LCDR3
bs16429D	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
bs16430D	33	35	37	39	25	27	29	31	41	43	45	47
bs16431D	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71

Ejemplo 3. CD28 y 4-1BB son potentes receptores coestimuladores

Para determinar los receptores coestimuladores que son eficaces para proporcionar la señal de coestimulación que es importante para la activación de las células T, un cribado a ciegas de las vías coestimuladoras que se llevó a cabo mediante la expresión forzada de ligandos coestimuladores en un panel de tumores singénicos (Tabla 3 y **Figura 2**) volvió a establecer a CD28 como uno de los receptores coestimuladores más potentes junto con 4-1BB. La Tabla 3 resume la cantidad de ratones libres de tumores en el cribado a ciegas. Se probaron cinco (5) ratones en cada grupo. Los ensayos se realizaron en tres (3) líneas de células tumorales diferentes que se modificaron para expresar siete (7) ligandos coestimuladores diferentes. Brevemente, se modificaron células tumorales EL4, MC38 y B16F10.9 para expresar ligandos coestimuladores individuales mediante transducción lentiviral. Las células se implantaron por vía subcutánea en ratones C57BL6 WT. El crecimiento tumoral se midió el día 18, 24 y 25 después del implante de los tipos de tumor EL4, MC38 y B16F10.9, respectivamente. Este es el punto de tiempo en el que los volúmenes tumorales de los grupos de control alcanzaron el tamaño máximo permitido (> 2000 mm³). Se midieron los tamaños de los tumores. De acuerdo con los datos de la Tabla 3, CD28 y 4-1BB también se encuentran entre los más eficaces para reducir el tamaño de los tumores (datos no mostrados).

Tabla 3: Inhibición del crecimiento tumoral en líneas celulares modificadas con expresión de ligando coestimulador introducido

Coestim. Ligando	Coestim. Receptor	Linfoma (EL4)	Carcinoma (MC38)	Melanoma (B16F10.9)
4-1BBL	4-BB	3	4	1
CD80 (B7.1)	CD28	2	2	2
CD86 (B7.2)	CD28	1	0	2
CD70	CD27	5	0	
OX40L	OX40	0	0	2
CD40	CD40L	0	1	0
ICOSL	ICOS	0	0	0
Vector vacío		0	0	0
Original		0	0	

Ejemplo 4. Afinidades de unión derivadas de la resonancia de plasmones superficiales y constantes cinéticas de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28

Para determinar la cinética de unión de los anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28, se determinaron las afinidades de unión derivadas de la resonancia de plasmones superficiales y las constantes cinéticas de los anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28 y originales asociados contra PSMA y/o CD28.

Cinética de unión de los anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28 a PSMA

Las constantes de disociación en equilibrio (valores de K_D) para la unión de 6h.hPSMA (proteína PSMA/FOLH1 humana recombinante, R&D, núm. de catálogo 4234-ZN) al anticuerpo monoclonal biespecífico anti-PSMAxCD28 purificado o el anticuerpo monoclonal original bivalente anti-PSMA se determinaron utilizando un biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real mediante el uso de un instrumento Biacore T-200. La superficie del sensor CM5 Biacore se derivatizó mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano para capturar anticuerpos monoclonales purificados anti-PSMAxCD28 biespecíficos o anti-PSMA y anti-CD28 originales.

Este estudio de unión de Biacore se realizó en un tampón compuesto de HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 1,0 mM, Tensioactivo P20 al 0,05 % v/v (tampón de corrida HBS-P++). Se prepararon diferentes concentraciones de hPSMA con una etiqueta de polihistidina N-terminal (6h.hPSMA, R&D) en tampón de corrida HBS-P++, que varió de 10 nM a 0,4 nM con diluciones en serie de 3 veces para anticuerpos monoclonales anti-PSMAxCD28 biespecífico y anti-PSMA o anti-CD28 originales.

Las diferentes concentraciones de 6h.hPSMA se inyectaron sobre la superficie capturada con el anticuerpo monoclonal a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto. La asociación de 6h.hPSMA con el anticuerpo monoclonal capturado se monitoreó durante 3 minutos y la disociación de 6h.hPSMA en tampón de corrida HBS-P++ se monitoreó durante 10 minutos. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación (k_a) y de disociación (k_d) se determinaron mediante el ajuste de sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 mediante el uso del software de ajuste de curvas Scrubber 2.0c (BioLogic Software). Las constantes de equilibrio de disociación y unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de

velocidad cinética de la siguiente manera:

$$K_D (M) = k_d/k_a, \quad y \quad t_{1/2} (min) = 0,693/k_d /60$$

Los parámetros cinéticos de unión para la unión de 6h.HPSMA a los anticuerpos monoclonales purificados a 25 °C se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Afinidades de unión por Biacore de anticuerpos monoclonales a PSMA a

ID del anticuerpo	Nombre común	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	T _{1/2} (min)
bs16429D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	1,96E+05	4,92E-05	2,51E-10	234,6
bs16430D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	TBD	TBD	TBD	TBD
bs16431D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	2,80E+05	3,85E-05	1,37E-10	300,4
mAb11810P2	anticuerpo monoclonal anti-PSMA	4,45E+05	2,99E-05	6,72E-11	386,3
mAb11838P2	anticuerpo monoclonal anti-PSMA	TBD	TBD	TBD	TBD
mAb14226P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	NB	NB	NB	NB
mAb14193P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	NB	NB	NB	NB
mAb14216P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	NB	NB	NB	NB

TBD: no evaluado

NB: no se observó unión

Los parámetros cinéticos de unión para la unión de 6h.hPSMA a un anticuerpo biespecífico monoclonal ilustrativo purificado a 37 °C se muestran a continuación en la Tabla 5. Una (1) RU (unidad de respuesta) representa 1 pg de proteína por mm², según lo definido por el fabricante.

Tabla 5. Afinidades de unión por Biacore del anticuerpo monoclonal a PSMA a 37 °C

ID del anticuerpo	Captura de mAb (RU)	Unión de hPSMA.6H 10 nM (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t _{1/2}
bs16429D	256,8±0,9	43,5	2,00E+05	7,93E-05	3,96E-10	145,7
ID del anticuerpo	Captura de mAb (RU)	Unión de hPSMA.6H 20 nM (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t _{1/2}
bs16429D	189,7±1,6	73,7	2,93E+05	6,36E+05	2,17E-10	181,6

Cinética de unión de anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28 a CD28

Las constantes de disociación en equilibrio (valores de K_D) para la unión de hCD28.mmh a anticuerpos monoclonales purificados se determinaron utilizando un biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real mediante el uso de un instrumento Biacore T-200. La superficie del sensor CM5 Biacore se derivatizó mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano para capturar anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28 purificados y anticuerpos monoclonales originales anti-PSMA o anti-CD28.

Se inyectaron diferentes concentraciones de hCD28.mmh sobre la superficie capturada con el anticuerpo monoclonal a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto. La asociación de hCD28.mmh al anticuerpo monoclonal capturado se monitoreó durante 5 minutos y se monitoreó la disociación de hCD28.mmh en tampón de corrida HBS-P++ durante 10 minutos. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) se determinaron mediante el ajuste de sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 mediante el uso del software de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación y unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética de la siguiente manera: K_D (M) = k_d/k_a , y $t_{1/2}$ (min) = $0,693/k_d / 60$

Los parámetros cinéticos de unión para la unión de hCD28.mmh al anticuerpo monoclonal biespecífico anti-PSMAxCD28 purificado o al anticuerpo monoclonal original bivalente anti-CD28 a 25 °C se muestran a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6: Afinidades de unión por Biacore de anticuerpos monoclonales a CD28 a 25 °C

ID del anticuerpo	Nombre común	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	T _{1/2} (min)
bs16429D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	2,26E+04	3,26E-03	1,44E-07	3,5
bs16430D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	TBD	TBD	TBD	TBD
bs16431D	Anticuerpo monoclonal PSMAxCD28	6,79E+03	1,41E-03	2,07E-07	8,2
mAB11810P2	anticuerpo monoclonal anti-PSMA	NB	NB	NB	NB
mAB11838P2	anticuerpo monoclonal anti-PSMA	TBD	TBD	TBD	TBD
mAB14226P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	2,34E+04	3,28E-03	1,40E-07	3,5
mAB14193P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	8,73E+03	2,64E-04	3,03E-08	43,7
mAB14216P2	anticuerpo monoclonal anti-CD28	1,12E+04	1,41E-03	1,27E-07	8,2

TBD: no evaluado

NB: no se observó unión

Los parámetros cinéticos de unión para la unión de hCD28.mmh al anticuerpo monoclonal biespecífico anti-PSMAxCD28 purificado a 37 °C se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Afinidades de unión por Biacore de anticuerpos monoclonales a CD28 a 37 °C

ID del anticuerpo	Captura de mAb (RU)	Unión de hCD28.6H 400 nM (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t _{1/2}
bs16429D	1576,3±5,0	98,9	2,46E+04	6,70E-03	2,72E-07	1,7

Como se muestra en las Tablas 4 a 7, varios anticuerpos anti-CD28 de la presente invención se unen a CD28 con alta afinidad. Varios anticuerpos anti-PSMA de la presente invención se unen a PSMA con alta afinidad. Varios anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 se unen tanto a CD28 como a PSMA con alta afinidad.

Ejemplo 5. Potencia y especificidad de la unión celular de anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMAxCD28 a PSMA y CD28

Para evaluar la capacidad de estos anticuerpos (anticuerpos monoclonales anti-PSMA, anti-CD28 y anti-PSMAxCD28) para unirse específicamente a las proteínas de la superficie celular, se desarrollaron ensayos de unión *in vitro* con el uso de células que expresan PSMA o CD28 humano en una plataforma de detección basada en electroquimioluminiscencia (MSD). Se realizaron dos estudios. En un estudio, se evaluó la potencia y especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales a los antígenos de la superficie celular. Estos anticuerpos (anticuerpos anti-PSMA, anti-CD28 y anti-PSMAxCD28) mostraron unión específica a líneas celulares que expresan PSMA humano o CD28 humano. En un experimento complementario, se realizó un estudio puente con el isotipo IgG4s.

Métodos utilizados para determinar la potencia y especificidad de la unión celular de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 a PSMA y CD28

La línea celular de carcinoma de próstata epitelial humano, C4-2 (UroCor), expresa de forma endógena PSMA humano. La línea celular HEK293/que expresa hCD28 se modificó por transducción de células de riñón embrionario humano de ATCC (CRL-

1573) con la construcción lentiviral resistente a neomicina que codifica CD28 humano (número de acceso de hCD28 NP_006130,1). Para evaluar la especificidad de la unión, estas dos líneas celulares se evaluaron en paralelo a la línea celular HEK293HZ original (que es negativa para PSMA y CD28), mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se incluyó un anticuerpo IgG1 humano anti-Feld1 como un control negativo para la detección de IgG.

Las líneas celulares descritas anteriormente se lavaron una vez con tampón 1xPBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Irvine Scientific, Cat. núm. 9240) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con una solución de disociación de células sin enzimas (Millipore, cat. núm. S-004-C) para separar las células de un matraz. Se realizó un lavado adicional con 1xPBS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Irvine Scientific, Cat. núm. 9236). A continuación, las células se contaron con un contador de células Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, modelo núm. Auto T4). Aproximadamente 10,000 células por pocillo en el tampón de lavado de células se sembraron por separado en las placas de electrodos de carbono de 96 pocillos (placa de alta unión MULTI-ARRAY, MSD, Meso Scale Discovery, Cat núm. L15XB-3/LX11XB-3) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C para permitir que las células se adhirieran. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con BSA al 2 % (p/v) (Sigma, Cat. núm. A8577-1L) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las soluciones que contenían anticuerpos anti-PSMA, anti-CD28, anti-PSMAxCD28 o de control en diluciones en serie que variaban de 1,7 pM a 100 nM o soluciones sin anticuerpo se añadieron a las células unidas a la placa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Excepto donde se indique, los análisis se realizaron por duplicado. Las placas se lavaron después para retirar los anticuerpos no unidos mediante el uso de un lavador de placas AquaMax2000 con un cabezal para el lavado de células (MDS Analytical Technologies, Modelo núm. 2000). Los anticuerpos unidos a la placa se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-IgG humana producido en cabra y conjugado con SULFO-TAG™ específico para las cadenas pesadas y ligeras (Jackson ImmunoResearch, Cat. núm. 109-005-088) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de los lavados, las placas se revelaron con tampón de lectura (MSD, Meso Scale Discovery, Cat. núm. R92TD-2) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y las señales luminiscentes se registraron con un instrumento SECTOR Imager 600 (Meso Scale Discovery, Modelo núm. 600).

Las señales de unión directa (en unidad de luz relativa, RLU) se analizaron en función de la concentración de anticuerpo. Los datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta sigmoidal (logística de cuatro parámetros) con el uso del software GraphPad

Prism™ (GraphPad Software Versión núm. 6). Los valores de EC₅₀, definidos como la concentración de anticuerpo a la que se detecta el 50 % de la señal de unión máxima, se determinaron para la unión a las células HEK293/hCD28 y C4-2 para indicar la potencia de cada anticuerpo que se une a CD28 o PSMA, respectivamente. Además, se calcularon las relaciones de las señales de unión de los anticuerpos a 11,1 nM en HEK293/hCD28 o las células C4-2 con respecto a las células HEK293HZ. Esta concentración representativa se eligió por una alta unión a las células diana, pero una señal de fondo baja en las células HEK293HZ negativas para CD28, PSMA. Los anticuerpos con una relación de unión inferior a 3 se marcaron como NB en la Tabla 8 a continuación. NB se define como "no se observó unión específica en las condiciones del ensayo".

En un estudio complementario, se realizó un experimento separado con el uso del mismo protocolo que se describió anteriormente, pero incluyó un control de isotipo IgG4 (ver USSN 15/147,791) y un anticuerpo monoclonal CD28 original. Las soluciones de prueba contenían anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-PSMA, anti-CD28, anti-PSMAxCD28 o anticuerpos de control, de 3,4 pM a 200 nM, en diluciones en serie. Las relaciones de unión se calcularon a 7,4 nM.

Resultados, resumen y conclusiones

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 para unirse específicamente a células que expresan PSMA o CD28 en comparación con una línea celular negativa para la expresión de PSMA o CD28 mediante el uso de un ensayo de inmunounión. Se incluyeron anticuerpos originales bivalentes específicos para PSMA o CD28 para la comparación. La unión, dependiente de la dosis, del anticuerpo a las células en placas de alta unión de 96 pocillos (MSD, Meso Scale Discovery, Cat núm. L15XB-3/LX11XB-3), con concentraciones de anticuerpo de hasta 100 nM, se detectó mediante el uso de anticuerpo anti-IgG humana conjugado con SULFO-TAG™ y las señales de unión en electroquimioluminiscencia se registraron en un Sector Imager 600 (MSD). Se determinaron los valores de RLU para los anticuerpos que se unen a las células. Para las células que expresan CD28 o PSMA, los valores de EC₅₀ se calcularon como una medida de la potencia. Para las muestras que dieron como resultado una señal de fondo alta, las concentraciones más altas se excluyeron del cálculo de los valores de EC₅₀ y los valores se indican con una estrella en la Tabla 8. Se utilizó la comparación de las señales de unión de los anticuerpos a 11,1 nM para células HEK293/hCD28 o C4-2 con las células HEK293HZ negativas para evaluar la

especificidad de unión de los anticuerpos. La unión específica se define como anticuerpos que tienen una relación de 3 veces o más de la unión a las células que expresan CD28 o PSMA en comparación con las células HEK293HZ a esa concentración.

Los resultados de la unión se resumen en la Tabla 8. A una concentración de 11,1 nM, los tres anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención (bs16429D, bs16430D y bs16431D) se unieron específicamente a las células HEK293-hCD28 y C4-2, con relaciones que varían de 13-31 veces y 4-10 veces por encima de las células HEK293HZ, respectivamente. La potencia de los anticuerpos biespecíficos varió con valores de EC_{50} de 5,31-9,58 nM en células HEK293-hCD28 y 0,35-5,24 nM en células C4-2.

Tabla 8: Unión de anticuerpos monoclonales a antígenos de la superficie celular

ID del anticuerpo	EC_{50} (M) HEK293-hCD28	EC_{50} (M) C4-2	HEK293-hCD28/ HEK293HZ**	C4-2/ HEK293HZ***
bs16429D	9,58E-09	8,53E-10	31	10
mAb14226P2 (CD28)	1,04E-09	NB	68	1
mAb11838P2 (PSMA)	NB	7,38E-10*	<1	4
bs16430D	8,47E-09	5,24-09	41	10
mAb14193P2 (CD28)	1,02E-08	NB	110	1
mAb11810P2 (PSMA)#	NB	9,46E-10	1	25
bs16431D	5,31E-09	3,50E-10*	13	4
mAb14216P2 (CD28)	2,47E-09	NB	114	1
CONTROL				
Anti-Feld #	NB	NB	1	1

NB: Unión no específica según lo indicado por una relación de menos de 3 veces entre la señal de células y HEK293HZ a 11,1 nM

- *: Concentración superior a 11,1 nM excluida del cálculo de EC_{50} debido a una señal de fondo elevada
- #: Las muestras se procesan como serie de diluciones única
- **: Relación de la señal de unión celular del anticuerpo a 11,1 nM (RLU) a HEK293-hCD28 con relación a HEK293HZ original
- ***: Relación de la señal de unión celular del anticuerpo a 11,1 nM (RLU) a C4-2 en relación con HEK293HZ

Los anticuerpos originales se unieron específicamente a las células correspondientes al antígeno usado para generarlos, como se indica entre paréntesis en la columna ID del anticuerpo. Los valores de EC_{50} para la unión a las células HEK293-hCD28 y C4-2 para los anticuerpos originales variaron desde 1,04-10,2 nM en células HEK293-hCD28 hasta 0,738-0,946 nM en células C4-2. Para los anticuerpos, los valores de unión de mAb11838P2 y mAb11810P2 en concentraciones más altas en las células C4-2 fueron excluidos del cálculo de los valores de EC_{50} para compensar una alta señal de fondo en las células negativas. El anticuerpo de control IgG no se unió específicamente a las líneas celulares que expresan CD28 o PSMA, como se esperaba.

Se llevó a cabo un experimento complementario como se describió anteriormente, pero incluyó un control de isotipo IgG4 y un anticuerpo monoclonal CD28 original. Estos datos se generaron como un estudio puente para demostrar que había una señal de fondo insignificante con el uso de un control de isotipo de hIgG4s. Los datos se resumen en la **Tabla 9**. Como se muestra en la **Tabla 9**, el anticuerpo anti-CD28 mAb14226P2 se une específicamente a la célula que expresa CD28 humano, HEK293-hCD28 P-3. El anticuerpo anti-CD28 mAb14226P2 no se une a células que no expresan CD28 humano, independientemente de si las células expresan PSMA (C4-2) o no (HEK293HZ).

Tabla 9: Unión del isotipo de anticuerpos monoclonales al antígeno de la superficie

ID del anticuerpo	EC₅₀ (M) HEK293-hCD28 P-3	EC₅₀ (M) C4-2 P-7	HEK293-hCD28/HEK293HZ*	C4-2/HEK293HZ**
mAb14226P2	8,41E-10	NB	99	1
CONTROL				
Anti-Feld1-hIgG1	NB	NB	1	1
Anti-Feld1-hIgG4	NB	NB	1	1

NB: Unión no específica según lo indicado por una relación de menos de 3 veces entre la señal de células y HEK293HZ a 11,1 nM

*: Relación de la señal de unión celular del anticuerpo a 7,4 nM (RLU) a HEK293-hCD28 con relación a HEK293HZ original

** : Relación de la señal de unión celular del anticuerpo a 7,4 nM (RLU) a C4-2 con relación a HEK293HZ

Unión de anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 a células T y células diana

Procedimiento experimental

Se utilizó un análisis de citometría de flujo para determinar la unión de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 a células C4-2, 22RV1, RAJI, células T humanas y de monos cangrejeros, seguido de la detección con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con ficoeritrina (PE). Brevemente, 1×10^5 células/pocillo se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con una dilución en serie de anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 o un anticuerpo IgG4 humano (véase USSN 15/147,791) que se une a un antígeno humano sin reactividad cruzada con CD28 humano o de mono cangrejero, que varía de 133 nM a 8,14 pM para las células T humanas y de mono cangrejero, y que varía de 133 nM a 61 pM para las células que expresan PSMA. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS frío que contenía 1 % de FBS filtrado y se añadió un anticuerpo secundario antihumano conjugado con PE (Jackson Immunoresearch, Cat. núm. 709-116-149) a las células y se incubaron durante otros 30 minutos. Se añadió colorante para células vivas/muertas a las incubaciones de células T humanas y de mono cangrejero. Los pocillos que no contenían anticuerpos o solo un anticuerpo secundario se utilizaron como control.

Después de la incubación con células que expresan PSMA, las células se lavaron, se volvieron a suspender en 200 µL de PBS frío que contenía 1 % de FBS filtrado y se analizaron mediante citometría de flujo en un BD FACS Canto II.

Después de la incubación con células T humanas o de mono cangrejero, las células se lavaron y se tiñeron con un cóctel de anticuerpos anti-CD2 (BD, Cat. núm. 562638), anti-CD16 (BD, Cat. núm. 562874), anti-CD4 (BD, Cat. núm. 564305) y anti-CD8 (BD, Cat. núm. 563795) en tampón de tinción Brillante (BD, Cat. núm. 566349) para una incubación adicional de 20 minutos a 4 °C. Después del lavado, las células se resuspendieron en 200 µL de PBS frío (Gibco, Cat. núm. 14190-144) que contenía FBS filtrado al 1 % (TCB, Cat. núm. 101), se separaron en un portal de células Vivas/CD2+/CD4+/CD16- o Vivas/CD2+/CD8+/CD16- y se analizaron mediante citometría de flujo en un FACS LSR-Fortessa-X20 de BD.

Resultados, resumen y conclusiones:

La unión de anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 a la superficie de células T humanas se analizó mediante citometría de flujo.

bs16429D se unió a todas las células T con un valor de EC50 de $4,80 \times 10^{-8}$ M. Se unió a células T CD4+ y CD8+, con valores de EC50 de $5,09 \times 10^{-8}$ M y $5,89 \times 10^{-8}$ M, respectivamente.

bs16431D se unió débilmente a todas las células T con un valor de EC50 de $1,80 \times 10^{-7}$. Se unió débilmente a las células T CD4+ y CD8+, con valores de EC50 de $1,67 \times 10^{-7}$ M y $1,80 \times 10^{-7}$ M, respectivamente.

La unión de los anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 a la superficie de líneas celulares que expresan PSMA se analizó mediante citometría de flujo.

C4-2 es una línea celular CaP (cáncer de próstata) derivada de células LNCaP (células de adenocarcinoma de próstata humano sensible a andrógenos derivadas de metástasis en ganglios linfáticos; véase Wu y otros, *Int. J. Cancer*, 57: 406-412 (1994)). Tanto bs16429D como bs16431D se unieron a las células C4-2 (ver Liu y otros, 2004, *Prostate*, 60: 98-108) con valores de EC50 de $3,87 \times 10^{-9}$ M y $1,50 \times 10^{-9}$ M, respectivamente.

22RV1 es una línea celular de carcinoma de próstata epitelial (ver *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 1999, 35 (7): 403-409) Tanto bs16429D como bs16431D se unieron a las células 22RV1 con valores de EC50 de $3,05 \times 10^{-9}$ M y $6,33 \times 10^{-9}$ M, respectivamente. Estos resultados se resumen en las Tablas 10-12.

Tabla 10: Unión de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 a células T humanas

ID del anticuerpo	FACS de células T CD2+ humanas [M]	FACS de células T CD4+ humanas [M]	FACS de células T CD8+ humanas [M]
bs16429D	4,80E-08	5,09E-08	5,89E-08
bs16431D	(Débil) 1,80E-07	(Débil) 1,67E-07	(Débil) 1,80E-07
Control de isotipo	Sin unión	Sin unión	Sin unión

Tabla 11: Unión de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 a células T de mono

ID del anticuerpo	FACS de células T CD2+ de mono cangrejero [M]	FACS de células T CD4+ de mono cangrejero [M]	FACS de células T CD8+ de mono cangrejero [M]
bs16429D	1,10E-08	1,93E-08	(débil) 6,84E-08
bs16431D	(débil) 1,34E-07	(débil) 2,81E-07	Unión muy débil
Control de isotipo	Sin unión	Sin unión	Sin unión

Tabla 12: Unión de anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 a células que expresan

ID del anticuerpo	FACS de células C4-2 [M]	FACS de células 22RV1 [M]	FACS de células Raji [M]
bs16429D	3,87E-09	3,05E-09	Sin unión
bs16431D	1,50E-09	6,33E-09	Sin unión
Control de isotipo	Sin unión	Sin unión	Sin unión

Ejemplo 6: Bioensayo primario y modificado para anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28

La activación de las células T se logra estimulando los receptores de las células T (TCR) que reconocen péptidos específicos presentados por las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I o II (MHCI o MHCII) en las células presentadoras de antígeno (APC) (Goldrath y otros, Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire, Nature 402, 255-262 (1999)). Un TCR activado a su vez inicia

una cascada de eventos de señalización, que pueden ser monitoreados por genes indicadores, conducidos por varios factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear de células T activadas (NFAT) o el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas (NFkB). Después, la respuesta de las células T se refina aún más a través de la participación de los correceptores expresados de manera constitutiva o inducible en las células T como CD28, CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), PD-1 (proteína de muerte celular programada 1), LAG-3 (Gen 3 de activación de linfocitos) u otras moléculas (Sharpe y otros, The B7–CD28 Superfamily, Nat. Rev. Immunol., 2(2): 116-26 (2002)). La molécula coestimuladora, CD28, es activada por sus ligandos endógenos CD80 o CD86 expresados en las APC. CD28 potencia las señales celulares como las vías controladas por el factor de transcripción NFkB después de la activación del TCR. La señal simultánea de CD28 es importante para la activación eficaz de las células T, como la diferenciación, la proliferación, la liberación de citocinas y la muerte celular de las células T (Smeets y otros, NFkB activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C- θ , PNAS, 97(7):3394-3399 (2012)).

Para identificar anticuerpos que mejoran la actividad de las células T tanto en presencia de estimulación primaria como de expresión de la diana PSMA, se caracterizaron anticuerpos anti-CD28 y anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 en un bioensayo indicador modificado y ensayos basados en células mediante el uso de células T primarias humanas. Los ensayos evalúan el comportamiento del anticuerpo biespecífico anti-PSMA/CD28 en presencia y ausencia de estimulación primaria y en presencia y ausencia de expresión de la diana. El esquema de los ensayos se muestra en la **Figura 3**. Los ensayos se realizaron para seleccionar anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 que potencian la actividad de las células T en presencia de estimulación primaria y expresión de la diana. Por consiguiente, los ensayos evaluaron el comportamiento de los anticuerpos biespecíficos en presencia y ausencia de estimulación primaria y expresión de la diana.

1) Ensayo indicador basado en luciferasa:

a) Modificación genética de células T reporteras:

Un clon de células T derivado de Jurkat, JRT3.T3.5 (ATCC, núm. TIB-153) se transdujo con una construcción reportera de NFkB luciferasa (NFkB-Luc, SA Biosciences/Qiagen, Cat. núm. CLS-013L). Después del aislamiento de un clon

resistente a puromicina (JRT3.T3.5/NFκB-Luc Clon 1C2), las células se modificaron adicionalmente para expresar TCR alfa humano de longitud completa (1G4A - aminoácidos M1 a S274) y subunidad beta de TCR (1G4B - aminoácidos M1 a G311) (Robbins y otros, Single and Dual Amino Acid Substitutions in TCR CDRs Can Enhance Antigen-Specific T Cell Functions, J. Immunol. 180(9): 6116-31 (2008)). Después de aislar un solo clon (J.RT3-T3.5/NFκB-Luc/1G4AB Clon 1D2), las células se modificaron adicionalmente para expresar CD8 alfa humano de longitud completa (hCD8a - aminoácidos M1 a V235 del número de acceso NP_001139345) y subunidad beta de CD8 humano (hCD8b - aminoácidos M1 a K210 del nº de acceso P10966). Se generó un solo clon de nuevo (J.RT3-T3.5/NFκB-Luc/1G4AB/hCD8ab Clon 1D5) y se transdujo adicionalmente con CD28 humano de longitud completa (hCD28 - aminoácidos M1 a S220, número de acceso P10747). Las células se clasificaron según una expresión alta de CD28 y se mantuvieron en RPMI + FBS al 20 % + penicilina/estreptomicina/glutamina (P/S/G) + NEAA + NaPyr + puromicina 1 µg/ml + G418 a 500 µg/ml + higromicina a 250 µg/ml + blasticidina a 10 µg/ml. Para un crecimiento más rápido, las células T reporteras modificadas se mantuvieron en medios de cultivo celular sin antibióticos y se usaron para experimentos de luciferasa basados en células como células T reporteras modificadas genéticamente. La información de los reactivos es la siguiente: RPMI 1640, Irvine Scientific, Cat. núm. 9160; FBS, Seradigm, cat. núm. 1500-50; Penicilina/Estreptomicina/Glutamina 100x (P/S/G), Thermo Fisher Scientific, Cat. núm. 10378-016; Aminoácidos no esenciales (NEAA), Irvine Scientific, Cat. núm. 9304; Piruvato de sodio (NaPyr), Millipore, Cat. núm. TMS-005-C; puromicina, Sigma, Cat. núm. P8833; Geneticina (G418), Thermo Fisher Scientific, cat. núm. 11811-098; higromicina; blasticidina.

b) Modificación genética de las APC:

Una línea celular HEK293 estable (ATCC, núm. CRL-1573) que expresa CD20 humano (aminoácidos M1 a P297 del número de acceso NP_068769.2) se transdujo con PSMA humano (aminoácidos M1 a A750 del número de acceso Q04609). Las células positivas para PSMA humano se aislaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la línea celular resultante, HEK293/CD20/hPSMA con clasificación alta se mantuvo en DMEM + 10 % + P/S/G + NEAA suplementado con G418 a 500 µg/ml.

c) Estimulación de células T/APC:

En este experimento, las células T reporteras modificadas genéticamente se estimulan mediante dos anticuerpos biespecíficos. La primera estimulación es administrada por un anticuerpo biespecífico activador de células T, hlgG4 anti-CD3xCD20, (ver los documentos WO14/047231, US9657102 y USSN 14/661,334) que se dirige a moléculas CD3 en las células T reporteras modificadas y a CD20 en las células HEK293. Aquí, la primera estimulación evita la necesidad de activación de los TCR por sus ligandos naturales, que son péptidos específicos que se presentan en las moléculas de MHC. La segunda estimulación se lleva a cabo por el anticuerpo biespecífico para CD28. Este anticuerpo imita la activación de CD28 en las células T por sus ligandos, CD80/CD86, expresados en las APC. Aquí, el anticuerpo interactúa con CD28 en las células T y PSMA en las células HEK293 modificadas y conduce a la activación de CD28 en las células T reporteras modificadas. La activación simultánea de TCR y CD28 conduce a una mayor actividad transcripcional de NFκB, que a su vez induce la producción del gen indicador, luciferasa.

d) Configuración del ensayo de luciferasa:

Se usó RPMI1640 suplementado con FBS al 10 % y P/S/G como medio de ensayo para preparar suspensiones celulares y diluciones de anticuerpos para el cribado de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28.

Un día antes del cribado, las células T reporteras modificadas se cultivaron a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo celular. Se ensayaron los controles y anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28 diluidos tres veces en serie (1:3) en presencia de anti-CD20 x CD3 a 50 pM constante o un control de isotipo hlgG4. La dilución de 10 puntos varió entre 15 pM y 100 nM y la dilución final no contenía anticuerpos anti-PSMA x CD28. Los reactivos se añadieron en el siguiente orden: 1) los anticuerpos diluidos en serie se añadieron a las placas blancas de fondo plano de 96 pocillos en los pocillos correspondientes; 2) Se añadió a cada pocillo una concentración fija de 50 pM de anti-CD20 x CD3 o control de isotipo hlgG4; 3) Las APC resuspendidas a 4×10^5 células/ml se añadieron a las placas con una concentración final de 1×10^4 células/pocillo; 4) Las células T reporteras cultivadas durante la noche se resuspendieron en 2×10^6 /ml y se añadieron a placas con una concentración final de 5×10^4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4-6 horas a 37 °C/CO₂ al 5 %, antes de la adición de 100 µl del reactivo ONE-Glo™ (Promega, Cat. núm. E6051) para lisar las células y detectar la actividad luciferasa. La luz emitida se capturó en

unidades de luz relativa (RLU) en un lector de placas de múltiples etiquetas Envision (PerkinElmer, Modelo 2104). Todas las diluciones en serie se analizaron por duplicado. Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de dosis-respuesta de 10 puntos con el software GraphPad Prism™. La inducción en veces se calculó con el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Inducción en veces} = \frac{\text{Valores medios de RLU del anticuerpo [100 nM]}}{\text{Valores medios de RLU del anticuerpo [0 nM]}}$$

2) Ensayo funcional de IL-2 con el uso de células T CD4⁺ humanas primarias:

Se desarrolló un ensayo funcional de células T CD4⁺ primarias/APC para evaluar el efecto de la activación de CD28 sobre la producción de IL-2 tras el acoplamiento con anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28.

a) Aislamiento de células T CD4⁺ primarias humanas:

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de un concentrado de leucocitos de un donante sano. El aislamiento de PBMC se logró mediante centrifugación en gradiente de densidad con el uso de tubos SepMate™ de 50 ml (StemCell Technologies, Cat. núm. 85450) según el protocolo recomendado por el fabricante. En resumen, se colocaron 15 ml de FicollPaque PLUS en tubos SepMate de 50 ml, seguido de la adición de 30 ml de leucocitos diluidos 1:2 con D-PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Irvine Scientific, cat. núm. 9240). Se siguieron los pasos posteriores de acuerdo con el protocolo del fabricante de SepMate. Las células T CD4⁺ se aislaron posteriormente a partir de PBMC con el uso de kits de microperlas con CD4 humano de Miltenyi Biotec (Cat. núm. 130-045-101) según las instrucciones del fabricante. Las células T CD4⁺ aisladas se congelaron en FBS que contenía DMSO al 10 % (Macron Fine Chemicals, Cat. núm. 4948-02) a una concentración de 5 × 10⁶ células por frasco.

b) Liberación de IL-2 a partir de células T CD4⁺ primarias tratadas con anticuerpos contra CD28:

En este ensayo, las células T CD4⁺ primarias se activan mediante la reticulación de CD3 en su superficie con el uso de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 x CD3 en combinación con células HEK293 modificadas para expresar CD20 humano. La unión

del brazo CD20 de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 x CD3 a las células HEK293 que expresan CD20 conduce a la agrupación del receptor CD3, lo que proporciona la primera señal importante para la estimulación de las células T. Sin embargo, para detectar la liberación cuantificable de IL-2, es importante la coestimulación, que puede proporcionarse mediante el entrecruzamiento de moléculas CD28. Aquí, los anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28 interactúan con CD28 en las células T CD4⁺ y PSMA en las células HEK293/hCD20 modificadas y conducen a la agrupación - activación de CD28. La combinación de TCR y CD28 conduce a una mayor producción de IL-2 que se libera en los medios de cultivo celular. La IL-2 se detecta y cuantifica a partir del sobrenadante celular mediante el uso de un kit AlphaLisa homogéneo, sin lavado (PerkinElmer, Cat. núm. AL221).

Las células T CD4⁺ humanas previamente aisladas y congeladas del donante se descongelaron el día del ensayo en medio de estimulación (medio de cultivo celular X-VIVO 15 (Lonza, Cat. núm. 04-418Q) complementado con FBS al 10 %, HEPES, NaPyr, NEAA y BME 0,01 mM (β -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, Cat. núm. M-7522) que contiene nucleasa benzonasa a 50 U/ml (EMD Millipore, Cat. núm. 71205-3)). Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en medio de estimulación y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Las células HEK293 modificadas para expresar CD20 humano solo o en combinación con PSMA humano, se trataron con mitomicina C a 15 μ g/ml (Sigma-Aldrich, cat. núm. M4287) en medio de estimulación primario a una concentración de 10×10^6 células/ml. Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 %, las células HEK293 se lavaron 3 veces con D-PBS que contenía FBS al 2% y se añadieron a los pocillos que contenían células T CD4⁺ a una concentración final de 1×10^4 células por pocillo.

Posteriormente, se añadieron a los pocillos anticuerpos anti-PSMA x CD28 biespecíficos o de control diluidos en serie 1:3, en el intervalo de 15 pM a 100 nM, en presencia de 50 pM anti-CD20 x CD3 o control de isotipo hIgG4. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpo anti-PSMA x CD28 o anti-CD28. Después de incubar las placas durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, se centrifugaron para sedimentar las células y se recogieron 40 μ l de sobrenadante del medio. A partir de esto, se analizaron 5 μ L en un ensayo de IL-2 humana AlphaLISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones se adquirieron en el lector de placas de múltiples etiquetas Envision (PerkinElmer, Modelo 2104). Se utilizó una curva patrón de concentraciones conocidas de IL-2 para determinar las concentraciones de IL-2

generadas en los pocillos de ensayo. Todas las diluciones en serie se analizaron por duplicado.

Los valores de EC_{50} de los anticuerpos se determinaron ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de dosis-respuesta de 10 puntos mediante el uso del software GraphPad Prism™. La inducción en veces se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inducción en veces} = \frac{\text{Valores medios de IL-2 del anticuerpo [100 nM]}}{\text{Valores medios de IL-2 del anticuerpo [0 nM]}}$$

Resultados, resumen y conclusiones

Como se muestra en las **Figuras 4A y 4B**, la activación de las células T CD4+ (medida por la liberación de IL-2) y las células JRT3.T3/1G4/hCD28 modificadas genéticamente (medida por la actividad luciferasa) mejoró con hPSMA x hCD28 en presencia de estimulación primaria (REGN2281 anti-CD20xCD3) y PSMA expresado en células HEK293/hCD20. El anticuerpo bivalente para CD28, mAb14193P2, mejora ligeramente la actividad de las células T en presencia de estimulación primaria y ligeramente en el bioensayo modificado en ausencia de estimulación primaria. El superagonista de CD28, TGN1412, mejora la activación de células T tanto en ensayos primarios como modificados en presencia de estimulación de CD20 x CD3, aunque en menor grado que los biespecíficos PSMA x CD28 en presencia de PSMA diana y estimulación primaria.

1) Ensayo indicador basado en luciferasa:

Los valores de EC_{50} y de inducción en veces se resumen en las Tablas 13 y 14 para células T reporteras modificadas genéticamente incubadas conjuntamente con células HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA además de un control de isotipo hIgG4 constante 50 pM o anticuerpo biespecífico anti-CD3 x CD20 (anticuerpo biespecífico estimulante de células T).

Tabla 13: Actividad de luciferasa en células T reporteras modificadas en ausencia de estimulación del TCR

Anticuerpos	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces
bs16429D	-	0,81	-	1,04
bs16430D	-	0,87	-	0,89
bs16431D	-	0,94	-	0,98
mAb14226P2 (CD28)	5,11 E-09	4,76	4,90 E-09	3,59
mAb14193P2 (CD28)	-	0,86	-	0,89
mAb14216P2 (CD28)	n/c	2,80	n/c	3,95
mAb14226P2 de un brazo	-	0,83	-	0,88
mAb14193P2 de un brazo	-	0,88	-	0,86
mAb14216P2 de un brazo	-	0,89	-	0,91

La Tabla 14 resume los valores de EC₅₀ y resultados de la inducción en veces de la actividad luciferasa en células T modificadas que se coincubaron con células HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA y control de isotipo hIgG4 constante a 50 pM.

Tabla 14: Actividad de luciferasa en células T reporteras modificadas en presencia de estimulación de TCR

Anticuerpos	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces
bs16429D	-	1,00	1,72 E-10	16,15
bs16430D	-	0,92	4,57 E-10	13,61
bs16431D	-	0,95	2,78 E-10	24,47
mAb14226P2 (CD28)	3,59 E-09	3,16	3,27 E-09	3,03
mAb14193P2 (CD28)	2,23 E-08	1,27	-	1,37
mAb14216P2 (CD28)	n/c	3,26	n/c	3,15
mAb14226P2 de un brazo	-	0,99	-	0,95
mAb14193P2 de un brazo	2,24 E-08	1,10	-	1,15
mAb14216P2 de un brazo	-	0,96	-	0,94

La Tabla 14 resume los valores de EC₅₀ y los resultados de inducción en veces para la actividad de luciferasa en células T modificadas que se coincubaron con células HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA y anti-CD3xCD20 constante a 50 pM.

Cuando las células T y las APC se tratan con control de isotipo hIgG4 50 pM, ninguno de los anticuerpos biespecíficos para CD28 mostró un aumento en la actividad luciferasa en ausencia de estimulación de TCR, independientemente de la línea de APC usada en el ensayo. Se observó una ligera activación de luciferasa con uno de los anticuerpos para CD28 originales (mAb14226P2) en células HEK293/hCD20 (4.76x) y células HEK293/hCD20/hSPMA (3.59x), lo que se muestra en la Tabla 14.

Por el contrario, si las células se trataron con anticuerpo biespecífico anti-CD3 x CD20 50 pM, los tres anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28 bs16429D, bs16430D y bs16431D indujeron fuertemente la actividad luciferasa cuando se coincubaron con APC que expresan hPSMA en la superficie. Se observó una activación muy baja o

nula con sus controles de un solo brazo (un brazo de mAb14226P2, mAb14193P2 y mAb14216P2) independientemente de la línea de APC. Se observó una ligera activación de luciferasa para los tres anticuerpos para CD28 originales (mAb14226P2, mAb14193P2 y mAb14216P2) como se muestra en la Tabla 14.

2) Ensayo funcional de IL-2 con el uso de células T CD4⁺ humanas primarias:

La capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28 para proporcionar coestimulación a través de CD28 en células T en ausencia o presencia de expresión diana de PSMA se evaluó en un ensayo funcional de células T CD4⁺ primarias que medía la producción de citocinas IL-2.

Los valores de EC₅₀ y de inducción en veces se resumen en la Tabla 15 para las células T CD4⁺ coincubadas con células HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA además del control de isotipo hIgG4 constante 50 pM o anticuerpo biespecífico anti-CD3 x CD20 (-anticuerpo biespecífico estimulante de células T).

Como se esperaba, no se observó liberación de IL-2 medible en los pocillos que contenían cantidades constantes del control de isotipo hIgG4, ya que no hubo estimulación primaria de células T.

Por el contrario, se detectaron niveles de IL-2 medibles en muestras tratadas con anticuerpo biespecífico anti-CD3 x CD20. En estas condiciones, si las células T CD4⁺ humanas se coincubaron con células HEK293/hCD20, todos los anticuerpos monoclonales para CD28 analizados, incluidos los anticuerpos anti-CD28 y los anticuerpos biespecíficos anti-PSMA x CD28, excepto bs16430D y bs16431D, mostraron un aumento de los niveles de IL-2 (Tabla 15). El anticuerpo original, mAb14226P2 mostró la mayor inducción en veces y una EC₅₀ de alrededor de 6 nM. La liberación de IL-2 se detectó con los tres anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 (bs16429D, bs16430D y bs16431D), cuando las células T CD4⁺ se cultivan conjuntamente con APC que expresan hPSMA y anticuerpo biespecífico anti-CD3 x CD20. Los niveles más bajos de IL-2 se miden con sus anticuerpos de control de un brazo y los anticuerpos originales en el mismo ajuste que se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Producción de IL-2 a partir de células T CD4⁺ primarias en presencia de estimulación de TCR

Anticuerpos	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hPSMA	
	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces	EC ₅₀ [M]	Inducción en veces
bs16429D	n/c	22	0,27 E-09	606
bs16430D	-	1	0,15 E-09	165
bs16431D	-	1	0,22 E-09	463
mAb14226P2 (CD28)	6,05 E-09	110	8,69 E-09	46
mAb14193P2 (CD28)	n/c	27	n/c	13
mAb14216P2 (CD28)	n/c	13	n/c	11
mAb14226P2 de un brazo	n/c	21	n/c	14
mAb14193P2 de un brazo	13,78 E-09	21	14,52 E-09	13
mAb14216P2 de un brazo	n/c	9	n/c	6

La Tabla 15 resume los valores de EC₅₀ y los resultados de inducción en veces para la producción de IL-2 de células T CD4⁺ primarias coincubadas con células HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA y anticuerpo anti-CD3xCD20 constante 50 pM.

Ejemplo 7: Anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 potencian la activación de las células T en presencia de estimulación tanto de PSMA como de TCR por Anti-CD20xCD3

Se han generado anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos y se han validado por biacore (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 4). Un par de anticuerpos biespecíficos (se utilizaron anticuerpos biespecíficos CD20xCD3 y anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención para inducir la agrupación de células T y receptores coestimuladores en células tumorales mediante la unión a PSMA (CD20 y antígeno

tumoral de membrana específico de próstata - PSMA) (**Figura 5A**). Para mostrar que PSMAxCD28 se une y activa CD28 en presencia de PSMA expresado en células diana y activación de TCR, se realizaron una serie de ensayos basados en células *in vitro*.

Localización de CD28

Líneas celulares

Se usó una línea celular HEK293 estable (ATCC, núm. CRL-1573) para crear las líneas celulares HEK293/hCD20, HEK293/hPSMA y HEK293/hCD20/hPSMA. Para generar la línea celular HEK293/hPSMA, se realizó una transfección estable mediante el uso de un vector de mamífero que codifica un PSMA dirigido por el promotor de ubiquitina C (aminoácidos M1 a A750 de número de acceso Q04609) y un gen de resistencia a neomicina. De manera similar, la línea celular HEK293/hCD20 se generó mediante el uso de un vector de mamífero que codifica un hCD20 dirigido por un promotor de ubiquitina (aminoácidos M1 a P297 de número de acceso NP_068769.2). Las células transfectadas se cultivaron en Geneticina A a 500 µg/ml para seleccionar líneas celulares de expresión estable.

Para la generación de células HEK293/hCD20/hPSMA, se utilizó un plásmido lentiviral que codifica PSMA humano (aminoácidos M1 a A750 del número de acceso Q04609) y un gen de resistencia a neomicina para transfectar células HEK293T, lo que facilita la producción de partículas virales, que posteriormente fueron utilizadas para infectar células HEK293/hCD20. Las células positivas a PSMA humano se aislaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Todas las líneas celulares generadas se mantuvieron en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G + NEAA suplementado con G418 a 500 µg/ml. Se cultivaron células Jurkat Clon E6-1 (ATCC, núm. TIB-152) de acuerdo con el protocolo recomendado por la ATCC.

Para la generación de células MC38/hPSMA, se utilizó un plásmido lentiviral que codifica PSMA humano (aminoácidos M1 a A750 del número de acceso Q04609) y un gen de resistencia a neomicina para transfectar células HEK293T, facilitando la producción de partículas virales, que posteriormente se utilizaron para infectar células originales MC38. Las células positivas a PSMA humano se aislaron mediante FACS. MC38/hPSMA se mantuvieron en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G + NEAA suplementado con G418 a 500 µg/ml.

Flujo de imágenes de Amnis

Se incubaron células T Jurkat y células diana (HEK293/hPSMA o HEK293/hPSMA/hCD20) con CD20xCD3-Alexa488 (REGN2280, 0,5 µg/ml) solo o junto con PSMAxCD28-Alexa647 (bs16429D, 1 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron suavemente con tampón de FACS (FBS al 3 %, EDTA 2 mM en PBS) dos veces y se tiñeron con anti-CD28-Biotina (REGN1412, 2 µg/ml) durante 15 min a 4 °C y posteriormente con estreptavidina-PE-CF594 (BD 562284, 1 µg/ml) y Hoechst 33342 (Thermo Fisher H3570, 1 µM) durante 15 min a 4 °C. Las células se lavaron con PBS y se almacenaron en fijador estabilizador de BD (BD 338036). Las imágenes de las células se recogieron en un citómetro de flujo e imágenes Amnis® y se analizaron mediante el software IDEAS®. Las células se seleccionaron en campo brillante de doblete, núcleo de doblete, foco de núcleo, conteo de un solo punto, CD28 singlete. El área de sinapsis se definió mediante una máscara de valle basada en la tinción del núcleo. Las células con máscara de valle incorrecta se eliminaron al separar el área superpuesta entre la máscara de valle y CD28. La proporción de CD28 dentro/fuera de la sinapsis se calculó mediante la siguiente fórmula:

CD28 dentro/fuera de la sinapsis = intensidad de CD28 en la sinapsis/(intensidad total de CD28 - intensidad de CD28 en la sinapsis) * 100 %.

Resultados, resumen y conclusiones

Las células T se cultivaron conjuntamente con células diana modificadas (HEK293/hPSMA o HEK293/hCD20/hPSMA) que sobreexpresaban CD20 y PSMA y biespecíficos marcados con fluorescencia (CD20xCD3 en verde, PSMAxCD28 en rojo). Para determinar la localización de CD28, las células se fijaron y tiñeron con anti-CD28 después de una hora de incubación a 37 °C. Se obtuvieron imágenes de conjugados de células T y células diana utilizando una citometría de flujo de imágenes Amnis ImageStream. En ausencia de expresión de PSMA en las células diana, el biespecífico CD20xCD3 solo indujo poca o ninguna agrupación de CD28 en las células T. Cuando se expresó PSMA en células diana, CD20xCD3 se localizó en la interfaz de conjugados de células T y células diana y formó una sinapsis inmunitaria (IS) donde se localizó CD28. PSMAxCD28 junto con CD20xCD3, aumentó aún más la acumulación de CD28 en la IS. La distribución de CD28 se cuantificó calculando la proporción de tinción de CD28 dentro y fuera de la IS (**Figura 5B**).

Se ha concluido que PSMAxCD28 en presencia de PSMAxCD3 y células diana que expresan PSMA conduce a una sólida acumulación de CD28 en la IS, la ubicación donde se produce la señalización de activación de las células T.

Liberación de citocinas

Para investigar más a fondo el efecto de TAAxCD28 sobre la activación de células T, se midieron la proliferación de células T y la liberación de citocinas IL-2 e IFN γ después de la incubación con un ajuste de la dosis de biespecíficos CD20xCD3 o PSMAxCD28 en cocultivo con células T humanas primarias y células diana modificadas que sobreexpresan diferentes TAA (HEK293/hPSMA, HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hPSMA) (**Figuras 5C-5G**). Se verificó que los anticuerpos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención y los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD3 no compitieron por la unión a células que expresan PSMA y, por lo tanto, se unen a diferentes epítomos (**Figura 5H**). Se validó además que PSMAxCD28 indujo la activación de células T en presencia tanto de estimulación de CD3 como de expresión de PSMA en la célula diana (HEK293/hCD20/hPSMA más CD20xCD3 5 pM). No se observó activación de células T por los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos en ausencia de expresión de PSMA en las células diana (cocultivo con HEK293/hCD20) o en ausencia de estimulación de CD3 (cocultivo con HEK293/PSMA más CD20xCD3 5 pM o HEK293/hCD20/hPSMA más control de isotipo 5 pM). (**Figuras 5E-5G**). En general, se demostró que los anticuerpos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención conducen a la activación de células T en presencia de PSMAxCD3 y células diana que expresan PSMA, lo que da como resultado una mayor proliferación y secreción de citocinas.

Ejemplo 8: Destrucción de células que expresan PSMA

Se realizaron dos estudios de citotoxicidad basados en FACS. En el primer estudio, la citotoxicidad basada en FACS se llevó a cabo en células C4-2 en presencia de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en presencia o ausencia de estimulación anti-PSMAxCD28. La estimulación se realizó en presencia de una concentración fija de anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 y anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 diluido en serie. El segundo estudio es por lo demás idéntico al primer estudio excepto que se utilizan PBMC de mono cangrejero en lugar de PBMC humanas. Se concluyó que los anticuerpos biespecíficos PSMAxCD28 potencian la activación de las células T y la citotoxicidad en las células tumorales de próstata en presencia de estimulación de TCR por PSMAxCD3.

Métodos experimentales

Aislamiento de células T CD4⁺ primarias humanas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de un concentrado de leucocitos de un donante sano. El aislamiento de PBMC se logró mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando tubos SepMate™ de 50 ml según el protocolo del fabricante. Las células T CD4⁺ se aislaron posteriormente de las PBMC utilizando el kit de aislamiento de células T CD4⁺ humanas EasySep™ de StemCell Technologies y según las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las células T CD4⁺ aisladas se congelaron en FBS que contenía DMSO al 10 % a una concentración de 50×10^6 células por frasco.

Ensayo de activación de células T humanas primarias

Las células T CD4⁺ humanas previamente aisladas y congeladas se descongelaron el día del ensayo en medio de estimulación (medio de cultivo celular X-VIVO 15 suplementado con FBS al 10 %, HEPES, NaPyr, NEAA y 0,01 μ M de BME) que contenía 50 U/ml de nucleasa benzonasa. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en medio de estimulación y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de 1×10^5 células por pocillo. Las células HEK293 (HEK293/hPSMA, HEK293/hCD20 o HEK293/hPSMA/hCD20) se trataron con 15 mg/ml de Mitomicina C en los medios de estimulación primario a una concentración de 10×10^6 células/ml. Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 %, las células HEK293 se lavaron 3 veces con D-PBS que contenía FBS al 2% y se añadieron a los pocillos que contenían células T CD4⁺ a una concentración final de 2×10^4 células por pocillo.

Para determinar la concentración subóptima de anticuerpo biespecífico CD20xCD3 para activar las células T, se diluyó en serie CD20xCD3 1:3, variando de 1,5 pM a 10 nM en presencia del biespecífico PSMAxCD28 500 pM o control de isotipo hIgG4s. Se eligió un biespecífico CD20xCD3 o control de hIgG4 constante a 5 pM y los siguientes anticuerpos: 1) PSMA x CD28 2) no diana x control de CD28 3) CD28 original 4) CD28SA (superagonista) 5) control de isotipo hIgG4 y 6) control de isotipo hIgG4s, se valoraron de 15 pM a 100 nM en una dilución 1:3. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpo titulado, solo 5 pM de CD20xCD3 biespecífico o control de hIgG4.

Después las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % se centrifugaron para sedimentar las células y se recogió 50 μ l de sobrenadante del medio. A partir de esto, se probaron 5 μ L en un ensayo de IL-2 humana e IFN γ

AlphaLISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones se adquirieron en el lector de placas de múltiples etiquetas Envision de Perkin Elmer. Se generó una curva patrón de concentraciones conocidas de IL-2 o IFN γ con el fin de extrapolar los pg/ml de IL-2 o IFN γ generados en los pocillos de ensayo. Todas las diluciones en serie se probaron por duplicado. Las células sedimentadas se incubaron con [metil-³H]-timidina, 0,25 uCi/pocillo durante 16 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se recogieron en placas Perkin Elmer Unifilter mediante el uso del recolector de células Unifilter 96 de Perkin Elmer. Después de la adición de 30 μ l de líquido de centelleo, las placas se sellaron y se realizaron conteos por minuto para cada pocillo adquirido mediante el uso de TopCount NXT de Perkin Elmer.

Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de dosis-respuesta de 10 puntos mediante el uso del software GraphPad Prism™.

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS

Para monitorear la destrucción de células PSMA+ en presencia de una combinación de anticuerpos anti-PSMAxCD3 y anti-PSMAxCD28, las células C4-2 se marcaron con 1 μ M del colorante de seguimiento fluorescente Violet Cell Tracker (Invitrogen, Cat. núm. 34557). Después del etiquetado, las células se colocaron en placas durante la noche a 37°C. Por separado, las PBMC humanas (New York Blood Center) o las PBMC de mono cangrejero (Covance, Cranford NJ) se sembraron en medio RPMI complementado a 1x10⁶ células/mL y se incubaron durante la noche a 37 °C con el fin de enriquecer los linfocitos mediante el agotamiento de macrófagos adherentes, células dendríticas y algunos monocitos. Al día siguiente, las células diana se coincubaron con PBMC vírgenes con agotamiento de células adherentes (relación efector/célula diana 4:1) y una dilución en serie de anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 o el control IgG4 (intervalo de concentración: 0,42 nM a 0,1 pM), solo o en combinación con una concentración fija de moléculas coestimuladoras de PSMAxCD28 bs16429D o bs16431D a 2,5 μ g/ml (16,7 nM) durante 96 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se retiraron de las placas de cultivo celular con tripsina-EDTA (Millipore, cat. núm. SM-2004-C) tampón de disociación) y se analizaron por FACS en un FACS BD LSRFortessa-X20 (BD).

Para el análisis de FACS, las células se tiñeron con un rastreador de viabilidad Far Red Cell Tracker (Invitrogen) y anticuerpos conjugados directamente contra CD2, CD4, CD8 y CD25 (BD). Las muestras se procesaron con perlas de calibración para el

conteo de células. Para la evaluación de la especificidad de la muerte, las células diana se seleccionaron como poblaciones positivas al rastreador de células Violet. El porcentaje de células diana vivas se calculó de la siguiente manera: porcentaje (%) de células viables = $(R1/R2) * 100$, donde R1 = porcentaje (%) de células diana vivas en presencia de anticuerpo, y R2 = porcentaje (%) de células diana vivas en ausencia del anticuerpo de prueba. La activación de las células T se midió mediante el porcentaje de células T (CD25⁺) activadas del total de células T CD2⁺/CD4⁺ o CD2⁺/CD8⁺. El conteo de células T se midió calculando el número de células CD4⁺ o CD8⁺ vivas por perla de calibración.

Los niveles de citocinas acumuladas en los medios se analizaron utilizando el kit de citocinas humanas Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA) de BD, según el protocolo del fabricante.

Para el análisis de FACS, las células se tiñeron con un colorante reactivo en el IR cercano para células muertas/vivas (Invitrogen, Cat. núm. L34976). Se agregaron quinientas mil (5×10^5) perlas de conteo a cada pocillo inmediatamente antes del análisis de FACS. Se recogieron cien mil (1×10^5) perlas para cada muestra. Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células se clasificaron en poblaciones vivas etiquetadas con Violet. El porcentaje de población viva se registró y se utilizó para el cálculo de la supervivencia.

La activación de las células T y la regulación positiva del marcador PD-1 se evaluaron incubando células con anticuerpos conjugados directamente contra CD2, CD4, CD8, CD25 y PD-1, e informando el porcentaje de células T activadas tardíamente (CD25⁺/CD8⁺) y células T PD-1⁺/CD4⁺ del total de células T (CD2⁺). La información de los anticuerpos conjugados directamente es la siguiente: CD2, PE:CD2 (Cl:RPA-2.1), BD, Cat. núm. 555327; CD4, PerCP-Cy5.5:CD4 (Cl:OKT-4), Biolegend, cat. núm. 317428; CD8, APC:CD8 (Cl:RPA-T8), Biolegend, cat. núm. 301049; CD25, BV510:CD25 (Cl:M-A251), BD, Cat. núm. 563352; y PD-1, PE-Cy7:PD1 (Cl:EH12.2H7), Biolegend, cat. núm. 329918.

Se evaluó la liberación de citocinas Th1/Th2 en el sobrenadante de los pocillos del ensayo de PBMC humanas con el uso del kit para humanos de arreglo citométrico de perlas de BD (BD, Cat. núm. 560484) y según el protocolo del fabricante.

Resultados, resumen y conclusiones:

Las Figuras 6A y 6B muestran que el anti-PSMAxCD28 aumentó la potencia citotóxica de bs13644D (anti-PSMAxCD3) en presencia de células T humanas o de

mono cangrejero. El anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 se analizó para determinar su capacidad para inducir células T humanas vírgenes para destruir células diana que expresan PSMA humano como agente único, o en presencia de un anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 coestimulador. En el estudio que se muestra en las **Figuras 6A y 6B**, el anticuerpo anti-PSMAxCD28 se fijó en 2,5 µg/ml. El anti-PSMAxCD3 se diluyó en serie a 1:4 veces. Los anticuerpos se incubaron con las células durante 96 horas. **La Tabla 16** resume los componentes de los anticuerpos usados en este estudio.

Tabla 16: Componentes de anticuerpos biespecíficos en estudios de potencia

AbPiD	Formato de anticuerpo	Brazo de PSMA [VH]	Brazo de CD28 [VH]	Cadena ligera
bs16429D	PSMAxCD28	mAb11838P2	mAb14226P2	3-20 ULC
bs16431D	PSMAxCD28	mAb11810P2	mAb14216P2	1-39 ULC
bs13644D	PSMA (mAB11835P2)xCD3 (7221G)			1-39 ULC
bs17664D	Control EGFRvIIIxCD3 (7221G)			1-39 ULC

Se probó si los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos pudieron potenciar la activación de las células T y la citotoxicidad en las células de cáncer de próstata al dirigirse a PSMA. Con el uso del ensayo de citotoxicidad y activación de células T basado en FACS, se ensayaron los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos en combinación con PSMAxCD3 (**Figuras 6, 7A-7D**). Las PBMC humanas que contenían células T se cultivaron conjuntamente con células de cáncer de próstata C4-2 que expresan niveles endógenamente altos de PSMA (datos no mostrados). PSMAxCD28 aumentó significativamente la potencia de la citotoxicidad inducida por PSMAxCD3 solo, al cambiar la EC50 de $4,3 \times 10^{-11}$ a $1,5 \times 10^{-12}$ (sobre un cambio logarítmico en la potencia) (**Figuras 6 y 7A**). En concordancia con la inducción de la citotoxicidad de las células T, PSMAxCD28 aumentó 4 veces los niveles de liberación de IFN γ inducida por PSMAxCD3 (**Figura 7B**). De manera similar, la combinación de PSMAxCD28 y PSMAxCD3 aumentó el número de células T CD4 y CD8 y la expresión del marcador de activación CD25 (**Figuras 7C y 7D**). No se observó ningún efecto sobre la citotoxicidad o activación de las células T cuando los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos se combinaron con un anticuerpo biespecífico para CD3 no dirigido. Además, para demostrar que el

anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 ilustrativo puede potenciar la citotoxicidad de PSMAxCD3 y la activación de células T de primates no humanos, se realizaron los mismos ensayos y se obtuvieron resultados similares con el uso de PBMC de monos cangrejeros (**Figuras 6, 7E-7G**). Estos resultados demostraron que el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 ilustrativo puede aumentar de forma potente la activación de células T mediada por PSMAxCD3 no sólo por medio de la proliferación y liberación de citocinas sino también por citotoxicidad. **La Figura 7H** muestra que el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 ilustrativo se une a dianas celulares según se midió mediante citometría de flujo.

El anticuerpo biespecífico anti-PSMA x CD3 activó y dirigió las células T humanas para agotar las células C4-2 (línea celular de cáncer de próstata humano). Se observó la muerte de las células diana en presencia del anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 y las células C4-2 murieron de una manera dependiente de la dosis con valores de EC_{50} en un rango picomolar (**Tabla 17**). La lisis observada de las células diana se asoció con una regulación positiva de las células CD25+ y PD-1+ en las células T CD2+, de nuevo con valores de EC_{50} en un rango picomolar (**Tabla 17**). El anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 indujo la liberación de citocinas humanas. La actividad citotóxica observada con el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 como agente único aumentó en presencia de una concentración fija de moléculas coestimuladoras anti-PSMAxCD28 (anticuerpos biespecíficos) (**Tabla 17**).

En resumen, la coestimulación por el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 aumentó la activación de las células T, la regulación positiva de PD-1 y la liberación de citocinas en comparación con lo que se observó con el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 como agente único. La Tabla 16 resume los resultados del experimento con el uso de PBMC humanas.

Tabla 17: Efectos de Anti-PSMAxCD28 sobre la citotoxicidad de anti-PSMAxCD3 para células C4-2 en presencia de PBMC humanas

Anticuerpo	EC₅₀ [M] para la muerte de C4-2	EC₅₀ [M] Activación de células T (CD8+/CD25+)	EC₅₀ [M] Regulación positiva de PD-1 (CD4+/PD1+)
Anti-PSMAxCD3	4,35E-11	7,53E-11	3,03E-11
Anti-PSMAxCD3 + bs16429D	1,45E-12	4,95E-12	3,71E-12
Anti-PSMAxCD3 + bs16431D	4,88E-12	6,44E-12	4,38E-12

El anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 también se analizó para determinar su capacidad de inducir células T vírgenes de mono cangrejero para destruir células diana que expresan PSMA humano como agente único, o en presencia de un anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 coestimulador. En la titulación del anticuerpo seleccionado, el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 activó las células T humanas pero no dirigió a las células T hacia el agotamiento de las células C4-2 (**Tabla 18**). La coestimulación con un anticuerpo anti-PSMAxCD28 resultó en un aumento de la activación de las células T, un aumento de la actividad citotóxica y una regulación positiva del marcador PD-1 en las células T (**Tabla 18**).

Tabla 18: Efectos de anti-PSMAxCD28 sobre la citotoxicidad de anti-PSMAxCD3 contra células C4-2 en presencia de PBMC de mono cangrejero

Anticuerpo	EC₅₀ [M] para la muerte de C4-2	EC₅₀ [M] Activación de células T (CD8+/CD25+)	EC₅₀ [M] Regulación positiva de PD-1 (CD4+/PD1+)
Anti-PSMAxCD3	N/A	1,71E-10	2,29E-10
Anti-PSMAxCD3 + bs16429D	1,55E-11	1,64E-11	5,64E-12
Anti-PSMAxCD3 + bs16431D	7,72E-11	2,76E-11	2,66E-11

Ejemplo 9: Liberación de citocinas de las células

Como se indica en otra parte del presente documento, los ensayos de liberación de citocinas *ex vivo* que utilizan PBMCs humanas en un formato "soluble" no pudieron predecir la liberación de citocinas. Por lo tanto, se desarrollaron formatos de ensayo "revestido".

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-PSMA/CD28 biespecíficos y anti-CD28 de esta invención para inducir la proliferación de PBMC humanas y la liberación de citocinas de las células mediante el uso de un formato de ensayo revestido. Para el ensayo de proliferación de PBMC, se usaron PBMC recién aisladas a 1×10^5 /pocillo. Para el cocultivo, se agregaron células C4-2 tratadas con mitomicina C a 1×10^4 /pocillo. Las placas se revisten en húmedo o en seco con las diluciones de anticuerpos durante la noche. Las placas se lavan antes de la adición de las PBMC. Los sobrenadantes se recogieron a ~ 54 horas para el análisis de citocinas por Meso Scale Diagnostics (MSD, Rockville, MD). Se añadió ^3H timidina durante 18 horas y se midió la proliferación.

Los resultados mostraron que el anticuerpo biespecífico anti-PSMA x CD28 soluble indujo la proliferación de PBMC humanas en presencia de un estímulo de CD3. Por el contrario, el superagonista anti-CD28 indujo la proliferación de PBMC humanas en ausencia de un estímulo de CD3 (datos no mostrados).

Además, bs16429D con recubrimiento húmedo (PSMA x CD28 "A") y mAb14226P2 (CD28 original "A") indujeron menos liberación de citocinas que el superagonista anti-CD28 con recubrimiento húmedo, mientras que bs16431D (PSMA x CD28 "B") y mAb14216P2 (CD28 original "B") no indujeron mayor liberación de citocinas significativamente en comparación con el control (datos no mostrados).

El anticuerpo anti-CD28 de la presente invención muestra varias propiedades diferentes en comparación con el superagonista TGN1412. Se cree que los mAb agonistas de CD28 convencionales (no superagonistas) se unen a los epítopos distales de la membrana, lo que permite solo la unión de Ab monovalentes (Dennehy y otros, Cutting Edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses, J. of Immunol. 176(10): 5725-29 (2006)). Los anticuerpos contra CD28 conducen a la activación óptima de las células T en presencia de reconocimiento antigénico específico del péptido-MHC por el TCR. La señalización de CD28 regula el umbral para la activación de TCR y disminuye significativamente el número de acoplamientos de TCR necesarios para la activación efectiva de las células

T. Por el contrario, el anticuerpo anti-CD28 TGN poseía algunas propiedades superagonistas (Luhder y otros, Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists, J. of Exp. Med. 197(8): 955-966 (2003)); Riley y otros, the CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation, Blood, 105(1): 13-21 (2005)). Por ejemplo, el anti-CD28 TGN indujo una potente proliferación de células T y producción de IL2 *in vitro* e *in vivo* incluso en ausencia de señalización de TCR, reforzó la actividad de NF-κB de manera más efectiva que la señalización convencional anti-CD28/CD3 e indujo la activación de AP-1/SRE y se unió a epítomos de CD28 proximales a la superficie celular, lo que permite la unión bivalente.

Por consiguiente, como se muestra en la **Figura 8**, el superagonista de CD28 TGN 1412 activó el reportero AP-1 en ausencia de estimulación primaria de CD3. Por el contrario, el anticuerpo anti-CD28 de esta invención (el PSMA x CD28 original) activó mínimamente a AP-1 en un bioensayo de AP-1 luciferasa.

Ejemplo 10: Estudio *in vivo* del anticuerpo anti-PSMAxCD28

Modelo de tumor singénico

De acuerdo con el estudio *in vitro* del Ejemplo 8, la combinación de anticuerpos biespecíficos anti-CD3xPSMA y anti-CD28xPSMA dirigidos al antígeno tumoral aumentó la eliminación del tumor en un modelo de ratón. Para probar la eficacia del anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28 como monoterapia o en combinación con el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3, se realizaron experimentos de tumores singénicos en ratones que expresaban CD28 humano, CD3 humano y PSMA humano en lugar de los genes de ratón correspondientes, generados con la tecnología patentada Velocigene (ratones hCD3/hCD28/hPSMA). Se concluyó que el anti-PSMAxCD28 biespecífico mejora la inmunidad antitumoral *in vivo* mediante la activación de células T inducida por anti-PSMAxCD3.

La activación de las células T se inicia tras la unión del complejo receptor de células T (TCR)/CD3 a los complejos péptido-MHC ("señal 1"); a continuación, la activación aumenta por el acoplamiento de un segundo receptor "coestimulador", como el receptor CD28 en las células T que se une a su(s) ligando(s) afín(es) en la célula diana ("señal 2"). Los "anticuerpos biespecíficos" basados en CD3 descritos recientemente actúan reemplazando la señal 1 convencional, uniendo las células T a las células tumorales mediante la unión de un antígeno específico del tumor (TSA) con

un brazo del anticuerpo biespecífico y la unión del TCR/CD3 con el otro. Aunque algunos de estos biespecíficos TSAxCD3 han demostrado una eficacia antitumoral prometedora en pacientes con cáncer, su actividad aún no se ha optimizado. Como se describe en otra parte del presente documento, se introduce en la presente invención una novedosa clase de anticuerpos biespecíficos que imitan la señal 2, uniendo un segundo TSA al receptor coestimulador CD28 en las células T. Estos anticuerpos biespecíficos se denominan biespecíficos TSAxCD28 o biespecíficos anti-TSA/CD28. Como se describe en el presente documento, un anticuerpo ilustrativo de la presente invención es específico para antígenos de cáncer de próstata (por ejemplo, PSMA). A diferencia de los superagonistas de CD28, que activan ampliamente las células T y en ciertos casos dieron como resultado una toxicidad profunda en los primeros ensayos clínicos, estos biespecíficos TSAxCD28 muestran una actividad limitada y ninguna toxicidad cuando se usan solos en modelos de ratones inmunocompetentes genéticamente humanizados o en primates. Sin embargo, cuando se combinaron con anticuerpos biespecíficos TSAxCD3, el anticuerpo ilustrativo de la invención mejoró la sinapsis artificial entre una célula T y su célula diana, potenció la activación de las células T y mejoró notablemente la actividad antitumoral de los biespecíficos para CD3 en modelos de tumores singénicos. La combinación de esta novedosa clase de anticuerpos biespecíficos coestimuladores de CD28 con la clase emergente de biespecíficos TSAxCD3 puede proporcionar terapias de anticuerpos "listas para usar" y bien toleradas con una eficacia antitumoral potencialmente mejorada.

La capacidad de las células T para reconocer y destruir sus dianas celulares, como las células infectadas por virus o las células tumorales, depende de un conjunto coordinado de interacciones. El más importante de ellos es el reconocimiento y la unión de la célula diana por el complejo TCR (que incluye las cadenas de CD3 γ , δ , ϵ , ζ asociadas); esta interacción se ha denominado "señal 1" para la activación de las células T. El TCR puede reconocer péptidos virales o tumorales presentados en el surco de una proteína MHC expresada en la superficie de las células diana. Esta unión es típicamente de baja afinidad; por lo tanto, para la activación exitosa de la señal 1, es importante agrupar muchos complejos de TCR a lo largo de la interfaz entre una célula T y su célula diana, y esta interfaz se ha denominado sinapsis inmunitaria (J. B. Huppa, M. M. Davis, T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973 - 983 (2003)). La activación y la proliferación de las células T se promueven aún más mediante interacciones adicionales con receptores coestimuladores como CD28 ("señal 2") (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A.

Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). Cuando una célula T reconoce una célula diana a través del complejo TCR, y activa la señal 2 a través de la unión de CD28 a su(s) ligando(s) afin(es) (CD80/B7.1 y/o CD86/B7.2) en una célula presentadora de antígeno profesional o la célula diana, se mejora la activación de las células T. Al igual que con la señal 1, se cree que la señal 2 mediada por CD28 se produce mediante la agrupación conjunta en la sinapsis inmunitaria.

Los anticuerpos monoclonales convencionales dirigidos contra antígenos específicos de tumores (TSA) se han utilizado como terapias antitumorales durante las últimas dos décadas (G. Salles y otros, Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther* **34**, 2232-2273 (2017); M. V. Mateos y otros, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med* **378**, 518-528 (2018); W. Eiermann, G. International Herceptin Study, Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trial data. *Ann Oncol* **12 Suppl 1**, S57-62 (2001); J. M. Connors y otros, Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* **378**, 331-344 (2018); V. Dieras y otros, Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**, 732-742 (2017)). Sin embargo, esta clase de anticuerpos tenía una capacidad limitada para inducir citotoxicidad mediada por células T y, en cambio, actuaba promoviendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o administrando una toxina a las células tumorales. Recientemente, ha surgido una nueva clase de anticuerpos biespecíficos (TSAxCD3) que pueden desencadenar eficazmente la muerte de células tumorales mediada por células T, al unir una célula T con una célula tumoral y activar el complejo CD3/TCR (generalmente a través de la cadena ϵ de CD3) a través de un mecanismo sustituto, imitando así la señal 1. Una versión temprana de tal biespecífico (un brazo se une a CD19 en las células leucémicas, mientras que el otro se une al CD3) recibió recientemente la aprobación regulatoria para la leucemia linfoblástica aguda de células B (R. Bargou y otros, Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell engaging antibody. *Science* **321**, 974-977 (2008); H. Kantarjian y otros, Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **376**, 836-847 (2017)). Recientemente, se ha demostrado que las versiones más avanzadas

de los biespecíficos tienen una buena actividad contra los linfomas no Hodgkin, dirigiéndose a CD20 en estos linfomas (E.J. Smith y otros, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of Bcells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015); L. L. Sun y otros, Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med* **7**, 287ra270 (2015); M. Bacac y otros, CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* **24**, 4785-4797 (2018); R. Bannerji y otros, Emerging Clinical Activity of REGN1979, an Anti-CD20 x Anti-CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma (FL), Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), and Other B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) Subtypes. *American Society of Hematology*, (2018); L. Budde y otros, Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study. *American Society of Hematology*, (2018)). Sin embargo, aunque los biespecíficos TSAxCD3 están emergiendo como una nueva clase importante de inmunoterapia en neoplasias malignas hematológicas, las comparaciones de estudios cruzados (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016)) sugieren que en algunos casos es posible que no estén logrando el nivel de eficacia observado con las terapias personalizadas de células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR-T).

Una de las razones de la gran eficacia de las terapias CAR-T es que el receptor de antígeno quimérico (CAR) está modificado para proporcionar tanto la señal 1 (a través de una parte del citodominio de CD3z) como la señal 2 (por ejemplo, a través de una parte del citodominio de CD28) al unirse a su diana en una célula tumoral. Dos terapias con células CAR-T han recibido recientemente la aprobación de la FDA para las neoplasias malignas de células B, las cuales actúan uniéndose y dirigiéndose al antígeno CD19 (S. S. Neelapu y otros, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster y otros, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017)). Los enfoques de células CAR-T pueden asociarse con efectos adversos graves como el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y neurotoxicidad (S. S. Neelapu y otros, Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 47-62

(2018); J. Gust y otros, Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* **7**, 1404-1419 (2017); A. Shimabukuro-Vornhagen y otros, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018)); y debido a los procesos de fabricación altamente personalizados y al requisito de precondicionamiento de los regímenes de quimioterapia (S.S. Neelapu y otros, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **377**, 2531-2544 (2017); S. J. Schuster y otros, Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* **377**, 2545-2554 (2017); P. Salmikangas, N. Kinsella, P. Chamberlain, Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CART-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry? *Pharm Res* **35**, 152 (2018)), muchos pacientes no se consideran candidatos adecuados.

Las ventajas de los biespecíficos TSAxCD3 como soluciones terapéuticas relativamente bien toleradas y "listas para usar" para poblaciones de pacientes más amplias aumentarían si se pudiera optimizar aún más su actividad antitumoral, especialmente si esto se pudiera hacer sin sacrificar la tolerabilidad, o quizás incluso aumentar, la especificidad por las células tumorales en comparación con las células normales. Con este fin, se planteó la hipótesis de que la combinación de biespecíficos TSAxCD3 con una novedosa clase de biespecíficos que activa de forma independiente la señal 2 podría proporcionar una posible mayor eficacia, así como una oportunidad para una mayor especificidad. Por lo tanto, se diseñó una segunda clase de biespecíficos. Estos biespecíficos podrían comprometer un segundo epítipo en el mismo antígeno específico del tumor o un segundo antígeno tumoral separado, con el receptor coestimulador CD28 (biespecíficos TSAxCD28) expresado en células T. Se razonó que la combinación de TSA1xCD3 con un TSA2xCD28 debería permitir la activación sustituta dirigida y mejorada de las células T al activar tanto la señal 1 como la señal 2, con especificidad dirigida solo contra las células tumorales que expresan ambos epítipos o ambos antígenos, lo que permite una mayor actividad antitumoral en conjunto con una oportunidad para una mayor especificidad.

En el presente documento se describen la generación y prueba de anticuerpos biespecíficos coestimuladores TSAxCD28 dirigidos al cáncer de próstata (PSMAxCD28, que se une al antígeno tumoral de membrana específico de la próstata). Los estudios de toxicología en ratones inmunocompetentes humanizados genéticamente, así como en monos cangrejeros, demuestran que estos biespecíficos presentan una actividad limitada y ninguna toxicidad como agentes individuales. Sin

embargo, estos novedosos biespecíficos coestimuladores pueden combinarse eficazmente con la clase emergente de biespecíficos TSAxCD3 para potenciar las respuestas antitumorales en modelos de tumores singénicos. En conjunto, estos datos sugieren que la combinación de esta novedosa clase de biespecíficos basados en CD28 (TSAxCD28) con los biespecíficos basados en CD3 (TSAxCD3) puede proporcionar soluciones biológicas bien toleradas y listas para usar con actividad antitumoral marcadamente mejorada y sinérgica.

Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos 10 y 13.

Estudios de tumores singénicos

Se generaron ratones que expresaban CD28 humano, CD3 humano y PSMA humano en lugar de los genes de ratón correspondientes utilizando la tecnología Velocigene® (se denominaron ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA), como se describió anteriormente (Valenzuela (2003), Nat Biotechnol, junio, 21 (6): 652-9; Crawford y otros 2018, Manuscrito en preparación). Para cada ratón humanizado, la orientación genética correcta en clones de células madre embrionarias (ES) F1H4 (híbrido C57BL/6 × 129) se identificó mediante un ensayo de pérdida de alelos como se describió anteriormente (Poueymirou y otros (2007), Nat Biotechnol, enero; 25 (1): 91-9). Se inyectaron células ES seleccionadas en embriones Swiss Webster en estadio de 8 células para producir ratones heterocigotos de generación F0 completos para la reproducción con ratones C57BL/6N (Taconic, Rensselaer, NY) hasta la homocigosis. Los ratones hCD3/hCD28/hPSMA (4-8 ratones/grupo, 8-16 semanas de edad) se inyectaron por vía subcutánea con 1×10^6 células tumorales MC38/hPSMA. El anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD28, el anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 o un control de isotipo IgG4 humano se administraron como monoterapia o en combinación mediante inyección intraperitoneal los días 0, 3 y 7 a 5 mg/kg.

El crecimiento tumoral se controló a lo largo del tiempo mediante el uso de mediciones con calibre de diámetro X e Y. Se calculó el volumen tumoral ($X \times Y \times (X/2)$). Los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor era superior a 2000 mm³.

Medición de los niveles de citocinas en suero en ratones

En los puntos de tiempo indicados, se extrajo sangre mediante punción submandibular en tubos de suero microtainer (BD 365967). Los niveles de citocinas se analizaron

mediante el uso de un kit V-plex Human ProInflammatory-10 Plex según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MA).

Resultados, resumen y conclusiones

La expresión de CD28 humano en células T y NK fue validada por FACS (datos no mostrados). Los ratones triple humanizados se validaron funcionalmente mediante el uso de un ensayo de proliferación de células T *in vitro* (datos no mostrados). La expresión de PSMA fue confirmada por QPCR (datos no mostrados). Se monitoreó el crecimiento del tumor MC38/hPSMA en los ratones hCD3/hCD28/hPSMA triple humanizados (descritos anteriormente) a lo largo del tiempo (**Figura 9A**). En comparación con el control de isotipo, los tratamientos de monoterapia con PSMAxCD3 y PSMAxCD28 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral ($p < 0,001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). El crecimiento del tumor se inhibió además significativamente mediante la terapia de combinación ($p < 0,00001$). En comparación con el control de isotipo, la combinación de biespecíficos PSMAxCD3 y PSMAxCD28 proporcionó la mayor producción de citocinas (**Figuras 9C y 9D**). Para comprender mejor el papel de la terapia de combinación en el estado de activación de las células T CD8⁺ intratumorales, se realizó el análisis de viSNE (**Figura 9B**). viSNE es una herramienta para mapear datos de citometría de alta dimensionalidad en 2D, mientras se conserva la estructura de alta dimensionalidad. Cada tratamiento condujo a agrupaciones únicas de células T CD8⁺ en el bazo y el tumor. La terapia combinada condujo a la expansión de un fenotipo de células T activadas/de memoria (que expresan TCF1, CD1-2, CD127, PD-1, ICOS, KLRG1 y CD38), como se muestra en el agrupamiento 4 en el tumor.

Se realizaron estudios para determinar los niveles de citocinas séricas (IFN γ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF α , IL-4 e IL-5) en ratones hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/+} y ratones hCD3^{+/-}/hPSMA^{+/-}/hCD28^{+/-}. La sangre se obtuvo en los días 0 (4 horas), 3, 7 y 11 después de los tratamientos. A excepción de IL-10 en los ratones hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/+}, en el día 0, los niveles de citocinas aumentaron significativamente en los tratamientos que incluyeron anticuerpos anti-PSMAxCD3, donde la terapia combinada con anti-PSMAxCD3 y anti -PSMAxCD28 proporcionó la mayor liberación de citocinas. Por el contrario, el control de IgG y la monoterapia anti-PSMAxCD28 no provocaron un aumento de la producción de citocinas. A excepción de IL-5 e IL-10, la producción de citocinas disminuyó después de tres (3) días a un nivel similar en todo el grupo de tratamiento. La producción de IL-5 tuvo una producción significativamente mayor el día

3, aunque menor que el día 0, en ratones hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/+}, pero no en hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/-} que recibieron el tratamiento combinado. En ratones hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/+}, la producción de IL-10 fue similar para todos los grupos de tratamiento el día 0 y el día 3, pero la terapia combinada produjo niveles significativamente más altos en la terapia combinada el día 7 y el día 11. En ratones hCD3^{+/+}/hPSMA^{+/+}/hCD28^{+/-}, la terapia de combinación produjo significativamente más IL-10 el día 0, el día 3 y el día 11, pero no el día 7. La monoterapia anti-PSMAxCD3 produjo significativamente más IL-10 el día 0 y el día 3, pero no el día 7 y el día 11. La monoterapia anti-PSMAxCD28 solo produjo significativamente más IL-10 el día 11 (datos no mostrados).

Como se muestra en la **Figura 9A**, a diferencia de los análisis *in vitro* anteriores en los que los biespecíficos para CD28 tenían una actividad de agente único muy limitada (ver el ejemplo 8 anterior), los biespecíficos para CD28 en estos modelos singénicos de MC38/hPSMA tenían una actividad más notable como agentes únicos. Esto sugirió que la "señal 1" ya se estaba activando hasta cierto punto en este modelo MC38. De acuerdo con esto, se ha demostrado previamente que las células tumorales MC38 expresan altos niveles de proteínas retrovirales endógenas reactivadas como p15E, y que los ratones C57BL6 pueden generar células T endógenas que reconocen y responden a este neoepítipo (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). De hecho, se confirmó que en los modelos MC38, las células T intratumorales que responden a este neoantígeno p15E podrían detectarse fácilmente. Por tanto, los biespecíficos para CD28 en estos modelos de tumores singénicos pueden reforzar las respuestas de linfocitos T endógenos dependientes de TCR/CD3, que después pueden aumentar aún más proporcionando una activación adicional de la "señal 1" mediante un anticuerpo biespecífico para CD3.

Para determinar el mecanismo celular subyacente a la terapia de combinación, se obtuvo el perfil de células T CD8⁺ infiltrantes de tumores y de bazo de estos experimentos mediante citometría de flujo de alta dimensionalidad y se utilizaron enfoques de agrupamiento no supervisados. Se encontró que cada tratamiento generó agrupamientos únicos de células T CD8⁺ en el bazo y el tumor. Los regímenes de tratamiento único redujeron las células T CD8⁺ intratumorales con fenotipo menos

activado (menor ICOS, KLRG1, Ki67, PD1, CD38 y LAG3, **Figura 9E**) como se muestra en el agrupamiento C35. Sin embargo, la terapia de combinación impulsó significativamente la expansión de un fenotipo de células T más activadas/de memoria (que expresaban Tcf1, CD122, CD127, PD1, ICOS, KLRG1 y CD38, **Figura 9B**) como se muestra en el agrupamiento C4.

Anti-CD28 x anti-PSMA no induce elevación de citocinas séricas en ratones humanizados para CD28/CD3/PSMA en ausencia y presencia de tumor

Como se indica en otra parte del presente documento, TGN1412, el anticuerpo anti-CD28 superagonista, indujo una "tormenta de citocinas" perjudicial para el paciente. El anticuerpo anti-CD28 y el anticuerpo biespecífico anti-CD28xPSMA de la invención no provocaron una tormenta de citocinas. En este estudio, se administraron varios anticuerpos (resumidos en la Tabla 19) a ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA a dosis de 2,5 mg/kg o 0,25 mg/kg. Se extrajo sangre de los ratones 4 horas y 3 días después de la administración de anticuerpos. Como se muestra en la **Figura 10**, los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 o los anticuerpos bivalentes CD28 originales no indujeron la producción de citocinas en suero en ratones humanizados para CD3/CD28/PSMA en ausencia de tumor.

Tabla 19: Anticuerpos para el estudio de tormentas de citocinas en ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA

ID del anticuerpo	Lote núm.	Nombre
REGN1945	REGN1945-L49	hIgG4
mAb14226P2	REGN5705-L1	mAb CD28
REGN2329 (TeGenero)	REGN2329-L3	CD28 SA
bs16429D	bs16429D-L2	PSMAxCD28
BE0146	614216J2B	PD1, RMP1-14
bs15780D	bs15780D-L2	PSMAxCD3

A 2,5 mg/kg, TGN1412 puede causar un aumento significativo en el nivel en sangre de IL-2, IL-4, IL-5 y TNF α (datos no mostrados).

Además, como se muestra en la **Figura 28**, el tratamiento anti-PSMAxCD28 solo o el tratamiento combinado con anti-PD1 no elevó las citocinas séricas en ratones portadores de tumores. Por el contrario, el tratamiento anti-PSMAxCD3, solo o en

combinación con anti-PD1, aumentó el nivel de citocinas en suero, como TNF α , IL-5, IL-10, IL-2 e IL-4 en ratones portadores de tumores. El tratamiento anti-PSMAxCD3 indujo la expresión de citocinas 4 horas después de la dosis. La elevación de citocinas no se mantuvo después del día 7. Este estudio se realizó en ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA que portaban tumor MC38/hPSMA. Se recogió suero de ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA que portaban tumor MC38/hPSMA 4 horas después de la dosis el día 0 y el día 7, 4 días después con 5 mg/kg de los anticuerpos o biespecíficos indicados. Las citocinas séricas se midieron mediante el uso de un kit MSD de citocinas de ratón de 10 plex según el protocolo del fabricante.

Además, como se muestra en la **Figura 11**, el tratamiento con superagonista de CD28 impulsó la respuesta de citocinas a las 4 horas en ratones NSG injertados con PBMC, mientras que el anticuerpo anti-CD28 de la invención no lo hizo. En el estudio que se muestra en la **Figura 11**, se injertaron ratones NSG inmunodeficientes con 5×10^6 PBMC de un donante sano normal el día -10. El día -1, se confirmó el injerto sistémico de células T mediante tinción de sangre periférica para marcadores de células T humanas. El día 0, los ratones se inyectaron por vía i.p. con 50 μ g de un anticuerpo de control de isotipo IgG4, 5 μ g o 50 μ g de superagonista anti-CD28, o 5 μ g o 50 μ g del anticuerpo mAb14226P2 anti-CD28. Cuatro horas después de las inyecciones de anticuerpos, se extrajo sangre de los animales y se preparó el suero. Las concentraciones de citocinas en el suero se analizaron mediante ensayo multiplex (kit Meso Scale Discovery V-PLEX). Si bien el superagonista anti-CD28 aumentó los niveles séricos de interferón gamma (IFN- γ), IL-2, IL-6 y TNF α en comparación con los animales tratados con anticuerpos de control de isotipo, no se observó ningún aumento en la respuesta de citocinas en el suero de los animales tratados con mAb14226P2 anti-CD28. En consecuencia, el anti-CD28xPSMA biespecífico tiene un perfil toxicológico potencialmente más seguro entre las moléculas de unión a antígenos, biespecíficas, coestimuladoras. El anti-CD28xPSMA biespecífico no provocó una respuesta de citocinas, mientras que el anti-CD3xPSMA sí lo hizo. Como se muestra en la **Figura 12**, anti-CD3 x PSMA provocó un IFN γ elevado en los ratones humanizados, mientras que anti-CD28xPSMA no lo hizo. En este estudio, se recogió suero de los ratones humanizados para CD3/CD28/PSMA o CD3/CD28 que portaban tumores MC38/hPSMA, 4 horas después de la dosificación con 5 mg/kg de los biespecíficos indicados. Las citocinas séricas se midieron mediante el uso de un kit MSD de citocinas de ratón de 10 plex según el protocolo del fabricante. Los puntos de datos representan niveles de citocinas individuales por ratón. Las barras del gráfico

representan el promedio por grupo de tratamiento. Las barras de error representan +/- SEM. Significación estadística determinada con ANOVA de 1 vía y prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak con el uso de los ratones tratados con isotipo como controles (**, $p < 0,01$)

De acuerdo con los datos de los ratones humanizados, el anticuerpo biespecífico anti-CD3xPSMA provocó una elevación de CRP y de la liberación sistémica de citocinas en primates no humanos, mono cangrejero. En el estudio en monos, se administró un anticuerpo biespecífico anti-CD3xPSMA a monos cangrejeros en dosis de 0,01, 0,1 y 0,5 mg/kg. El mono mostró los siguientes síntomas: signos clínicos el primer día como vómito, encorvado, piel enrojecida/descolorida; CRP elevada (aproximadamente 10 frente a 1 mg/dl en ratones de control); citocinas plasmáticas elevadas (IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2 y MCP); y disminución del número absoluto de células T en sangre (datos no mostrados).

Además, los ratones que recibieron tratamiento anti-CD28xPSMA no mostraron producción de citocinas o marginación de células T en comparación con el tratamiento anti-PSMAxCD3 o superagonista anti-CD28 (**Figuras 13A y 13B**).

Resumen

Se ha apreciado durante mucho tiempo que la activación de las células T a través del complejo TCR ("señal 1") se puede mejorar notablemente mediante señales coestimuladoras como las mediadas cuando el receptor CD28 de las células T se acopla a sus ligandos (CD80/B7.1 y CD86 /B7.2) en las células diana ("señal 2") (J. H. Esensten, Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, J. A. Bluestone, CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973-988 (2016)). De acuerdo con los datos descritos en este documento, el potencial de la coestimulación de CD28 para mejorar la actividad antitumoral de las células T se demostró por primera vez mediante estudios en los que los ligandos B7 se sobreexpresaban en las células tumorales (R. H. Schwartz, Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068 (1992); L. Chen y otros, Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* **71**, 1093-1102 (1992)), lo que mostró un mayor rechazo por parte de las células T, de dichos tumores que expresan B7. Este potencial inspiró esfuerzos para evaluar anticuerpos activadores de CD28 en ensayos en humanos. Trágicamente, el ensayo de 2006 de tal anticuerpo (TGN1412) resultó en complicaciones potencialmente mortales en los seis voluntarios humanos (G.

Suntharalingam y otros, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)), debido a una disfunción multiorgánica resultante de un síndrome de liberación masiva de citocinas (CRS). Esta catástrofe llevó al cese de cualquier prueba adicional de anticuerpos activadores de CD28 en humanos.

En el presente documento se describe una novedosa clase de anticuerpos biespecíficos coestimuladores de CD28 que pueden promover de forma marcada y segura la actividad antitumoral al proporcionar una "señal 2" coestimuladora. Estos biespecíficos para CD28 tienen una actividad limitada por sí mismos (en ausencia de la "señal 1"), pero pueden mejorar notablemente la actividad antitumoral en el marco de la "señal 1", como se puede obtener cuando estos biespecíficos para CD28 se combinan con la clase emergente de biespecíficos para CD3 (o si estos biespecíficos para CD28 se utilizan en entornos donde ya existen poblaciones endógenas de células T específicas de tumores). En el presente documento se describen la generación y prueba de anticuerpos biespecíficos coestimuladores TSAxCD28 dirigidos contra el cáncer de próstata (PSMAxCD28). Se demostró que, en ausencia de la "señal 1", estos biespecíficos para CD28 tienen una actividad mínima, *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo, estos biespecíficos para CD28 se pueden combinar con biespecíficos para CD3 para formar "sinapsis inmunitarias" artificiales que contienen los antígenos tumorales, así como los complejos de TCR y CD28. Además, cuando se combinan con los biespecíficos para CD3 apropiados *in vitro*, estos biespecíficos para CD28 pueden promover de manera eficaz y específica la activación de las células T y la muerte de las células tumorales de una manera dependiente del antígeno. Además, estos biespecíficos para CD28 también mejoran eficazmente la actividad antitumoral de los biespecíficos para CD3 *in vivo*, de una manera específica del antígeno tumoral, en modelos tumorales singénicos; en tales modelos, los biespecíficos para CD28 tienen una actividad mínima como agente único a menos que ya estén presentes células T específicas del tumor, y en tales entornos parecen mejorar esta actividad específica de una manera dependiente del antígeno tumoral. Además, la terapia de combinación TSAxCD28 y TSAxCD3 conduce significativamente a la expansión de un fenotipo de células T activadas/de memoria intratumorales *in vivo*. Por último, los estudios de toxicología en ratones inmunocompetentes humanizados genéticamente, así como en monos cangrejeros, demuestran que estos biespecíficos exhiben una actividad limitada y ninguna toxicidad como agentes individuales, en comparación directamente con los anticuerpos activadores de CD28 convencionales.

A menudo, la caracterización de candidatos clínicos específicos para humanos en el campo de la inmunooncología se limita a las pruebas en modelos de tumores xenogénicos con células inmunitarias humanas injertadas. Aunque estos modelos xenogénicos pueden resultar muy útiles, tienen limitaciones. Los ratones usados en tales modelos xenogénicos no expresan la diana tumoral humana en sus tejidos normales, lo que excluye la evaluación del agente de prueba en el marco de la expresión tisular normal de la diana. De hecho, si una diana también se expresa normalmente en niveles altos en tejidos normales, esto podría limitar la eficacia antitumoral al desviar el agente de prueba del tumor y podría resultar en toxicidad en estos tejidos normales; nada de esto podría evaluarse en un modelo xenogénico. Una limitación adicional podría implicar la actividad de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) injertadas que se transfieren a un ratón inmunodeficiente, que podría diferir de las de las células T huésped normales que se encuentran en un sistema inmunocompetente. Para superar estas limitaciones y proporcionar mejores modelos para probar candidatos clínicos específicos para humanos, aquí se crearon ratones genéticamente humanizados dobles y triples. En estos modelos, los antígenos tumorales se humanizaron genéticamente para permitir su expresión normal en los tejidos apropiados del huésped, y los componentes CD3 y/o CD28 se humanizaron genéticamente para permitir que las células huésped inmunocompetentes respondieran a los candidatos clínicos específicos para humanos. En estos modelos animales singénicos inmunocompetentes genéticamente humanizados, se encontró que los biespecíficos de CD28 para la diana tumoral de PSMA mejoraron la actividad antitumoral de sus biespecíficos de CD3 apropiados. La mejora similar de la eficacia antitumoral de los diferentes biespecíficos TSAxCD28 en múltiples modelos preclínicos sugiere que esta modalidad terapéutica es sólida y no se limita a un modelo tumoral específico, y podría tener una utilidad más amplia como una nueva clase de diana de combinación para la inmunoterapia. En general, los hallazgos destacan que los biespecíficos TSAxCD28 pueden actuar en sinergia con los biespecíficos TSAxCD3 y pueden proporcionar una solución biológica que podría mejorar notablemente la eficacia de los biespecíficos TSAxCD3 bien estudiados, de una manera razonablemente segura y bien tolerada, lo que justifica las pruebas en ensayos en humanos.

Los biespecíficos TSAxCD3 representan una clase emergente prometedora de inmunoterapia, pero una mayor optimización de la actividad antitumoral seguramente será importante en muchos casos. Así como los enfoques CAR-T han empleado

receptores quiméricos que activan artificialmente tanto la "señal 1" como la "señal 2" para mejorar su actividad antitumoral (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); S. L. Maude y otros, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448 (2018)), se muestra ahora el posible beneficio de combinar específicos para CD3 (que proporcionan la "señal 1") con biespecíficos para CD28 (que proporcionan la "señal 2") para mejorar la actividad antitumoral. Además de los beneficios prácticos que este enfoque podría tener sobre las terapias CAR-T, ya que no requiere una preparación laboriosa de la terapia celular la cual debe personalizarse individualmente para cada paciente, ni requiere el "agotamiento de los linfocitos" de los pacientes de manera preventiva a través de una quimioterapia tóxica para que puedan aceptar esta terapia celular a menudo asociada con efectos adversos (A. Shimabukuro-Vornhagen y otros, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **6**, 56 (2018); C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)), el enfoque biespecífico de acuerdo con la invención ofrece el potencial para una mayor eficacia, así como una mayor seguridad y especificidad de acción. Es decir, es posible aprovechar la "orientación combinatoria", mediante la combinación de un biespecífico de CD3 para un antígeno con un biespecífico de CD28, específico para un segundo antígeno (el aumento de la eficacia solo se producirá en las células tumorales que expresan ambos antígenos) para concentrar así la muerte, por parte de las células T, sólo en las células tumorales que expresan ambos antígenos, mientras se limita la "toxicidad por acción fuera del objetivo" en tejidos normales que expresan sólo uno de los antígenos. En conjunto, los datos descritos en el presente documento sugieren que la combinación de biespecíficos basados en CD28 con biespecíficos basados en CD3 puede proporcionar soluciones biológicas "listas para usar" bien toleradas con actividad antitumoral notablemente mejorada y sinérgica. Este año se realizarán las pruebas iniciales de esta posibilidad en ensayos en seres humanos.

Ejemplo 11: Estudios de toxicología en mono cangrejero

Estos estudios demostraron que PSMAxCD28 solo o en terapia de combinación no induce la acción sistémica de las células T en comparación con el superagonista de CD28 en monos cangrejeros. Los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención potenciaron la activación de células T por TAAxCD3 en

monos cangrejeros (Ejemplo 8, **Figuras 7E-7G**). Para determinar la seguridad y tolerabilidad de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención solos o en combinación con anti-PSMAxCD3, se realizó un estudio de toxicidad de dosis única en monos cangrejeros. Se asignaron monos cangrejeros machos o hembras a los grupos de tratamiento como se indica en la **Tabla 20**.

Tabla 20: Estudio exploratorio de toxicología de Anti-PSMAxCD28 en dosis única en monos

Grupo	Tratamiento (dosis única)	Núm. total de animales	Niveles de dosis/escalado de dosis (Infusión intravenosa en 30 minutos)
		Machos	
1	PSMAxCD3	3	0,1 mg/kg
2	bs16429D	3	1 mg/kg
3	bs16429D	3	10 mg/kg
4	Superagonista anti- CD28 "SA"	3	10 mg/kg
5	bs16429D + anti- PD-1	3	10 mg/kg + 10 mg/kg
6	bs16431D + anti- PD-1	3	10 mg/kg + 10 mg/kg
7	Ac control de isotipo	3	10 mg/kg

El estudio en monos cangrejeros se realizó de acuerdo con las directrices de la IACUC. Los monos cangrejeros machos (3 animales/grupo) recibieron una dosis única de cada artículo de prueba mediante infusión intravenosa durante aproximadamente 30 minutos (el tratamiento de combinación se administró como infusión separada durante un total de 1 hora). La evaluación de la toxicidad se basó en observaciones clínicas, consumo cualitativo de alimentos, peso corporal, exámenes neurológicos, signos vitales (temperatura corporal, frecuencia cardíaca, oximetría de pulso y frecuencia respiratoria) y patología clínica y anatómica. Se recolectaron muestras de sangre y tejido para el análisis de citocinas, análisis de inmunofenotipado por FACS, histopatología y evaluación toxicocinética. Los niveles de CRP se analizaron en un sistema Roche Modular P 800. Las citocinas se midieron mediante Meso Scale Diagnostics (MSD, Rockville, MD). Para la citometría de flujo de sangre periférica, la

sangre se recogió en tubos con EDTA de potasio, se lisó, se tiñó con los anticuerpos indicados como anti-CD3, anti-Ki67 y anti-ICOS (BD Biosciences), y se analizó con FACS Canto II. No se observó liberación significativa de citocinas, marginación de células T o regulación positiva de marcadores de activación de células T después de la administración de una dosis única de PSMAxCD28 a 1 o 10 mg/kg que no indujo liberación significativa de citocinas, marginación de células T o regulación positiva de marcadores de activación de células T (**Tabla 21**).

Tabla 21: Resumen del estudio de toxicidad en mono cangrejero

Molécula	Descripción	Dosis (mg/kg)	Día 1 – Observa- ciones clínicas	Cualquier Obs, Días 2-4	Células T absolutas (E3/μL)		Células T en proliferación Ki67+ (E3/μL)		CRP (mg/dl)	Citocina plasmática a las 5 horas después de la dosis (pg/ml)							
					Previo a la prueba	5 horas	Previo a la prueba	168 horas		IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-5
bs16429D	anti- PSMAxCD28	1	-	-	6,58	7,22	0,62	0,59	0,5	BLQ*	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	-	4,91	5,09	0,42	0,32	0,5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	-	4,50	4,04	0,63	0,48	1,1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
bs16429D	anti- PSMAxCD28	10	-	-	6,03	5,73	0,33	0,35	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	-	4,64	4,53	0,38	0,64	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
			-	-	10,06	7,16	0,88	0,39	1,3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
REGN2329 (TeGenero)	Superagonist a anti-CD28	10	-	-	7,02	0,26	0,60	5,66	15,4	764	BLQ	3364	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1169
			-	-	7,06	0,19	0,79	7,29	15	2907	1095	17155	333	BLQ	238	BLQ	615
			-	-	11,87	0,66	1,13	10,96	15,3	5226	5324	7918	1509	163	522	342	198
mAb10154 P3	EGFRVIIIab		-	-	6,39	5,62	0,62	0,39	0,8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	151	BLQ	335	BLQ
			-	-	7,43	7,72	0,86	0,52	11	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	267	BLQ	378	BLQ
			-	-	3,66	4,61	0,52	0,69	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: por debajo del límite inferior de cuantificación

Por el contrario, se observó una liberación significativa de citocinas, marginación de linfocitos y activación de células T en los monos a los que se les administró el superagonista de CD28. Además, estos hallazgos se validaron mediante el uso de un ensayo de proliferación de células T humanas con recubrimiento en seco y en húmedo (Ejemplo 9). De hecho, no se observó que los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos así como los anticuerpos para CD28 bivalentes originales indujeran la proliferación de células T humanas en comparación con el anticuerpo superagonista de CD28. En general, el estudio exploratorio de toxicología de dosis única en monos y los ensayos basados en células T humanas *in vitro* sugieren que los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 ilustrativos de la invención son seguros y bien tolerados.

Como se muestra en la **Tabla 21**, TGN1412, el superagonista de CD28, provocó una modesta liberación de citocinas y aumentos transitorios en las células T (medido en D15). El estudio se realizó en monos cangrejeros machos con una dosis semanal de 5 a 50 mg/kg durante 4 semanas. El análisis de FACS de subconjuntos de leucocitos se realizó en un mono cangrejero macho después de la inyección intravenosa de dosis semanales (d1, 8, 15, 22) crecientes (5, 10, 25, 50 mg/kg) de TGN1412. Se observaron aumentos modestos en IL-2, IL-5, IL-6, IFN- γ en las primeras 2 a 24 horas (2 a 20 veces). No hubo cambios sustanciales en IL-4 o TNF- α . Se realizó un estudio exploratorio de toxicología de dosis única en monos con anti-CD28xPSMA para establecer el perfil de seguridad y farmacocinético del anticuerpo biespecífico anti-CD28xPSMA.

En resumen, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD28xPSMA mejoraron la inmunidad en el sitio del tumor. El anti-CD28xPSMA convirtió las células tumorales en células presentadoras de antígeno (APC). Los anticuerpos anti-CD28xPSMA no inducen la proliferación de células T ni estimulan la liberación de citocinas en comparación con el superagonista anti-CD28.

Ejemplo 12: Mapeo de epítomos de la unión de mAb14226P2 a CD28 mediante intercambio de hidrógeno y deuterio

Se realizó un mapeo de epítomos mediante intercambio de H/D con espectrometría de masas (HDX-MS) para determinar los residuos de aminoácidos de CD28 (CD28 humano recombinante, mostrado como hCD28 ecto (N19-P152).mmh; SEQ ID NO: 75) que interactúa con el anticuerpo monoclonal anti-hCD28. Una descripción general del método de intercambio de H/D se establece en Ehring (1999) *Analytical Biochemistry*

267(2):252-259; y Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Los experimentos de HDX-MS se realizaron en una plataforma HDX/MS integrada, que consistió en un sistema HDX PAL de Leaptec para el etiquetado con deuterio e inactivación, un sistema Acquity M-Class de Waters (Auxiliary solvent manager) para la digestión y carga de muestra, un sistema Acquity M-Class de Waters (μ Binary solvent manager) para el gradiente analítico, y un espectrómetro de masas Thermo Q Exactive HF para la medición de la masa de péptidos.

La solución de marcaje se preparó como tampón PBS en D₂O a pD 7,0 (tampón fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y KCl 3 mM, equivalente a pH 7,4 a 25 °C). Para el etiquetado de deuterio, se incubaron 11 μ L de CD28.mmH (proteína interna de Regeneron REGN2011, 127 μ M) o CD28.mmH premezclado con REGN5705 en una proporción molar de 1:0,6 (complejo Ag-Ac) a 20 °C con 44 μ L de solución de etiquetado D₂O para varios puntos de tiempo por duplicado (por ejemplo, control no deuterado = 0 segundos; etiquetado con deuterio durante 5 minutos y 10 minutos). La reacción de deuteración se inactivó mediante la adición de 55 μ L de tampón de inactivación enfriado previamente (TCEP-HCl 0,5 M, urea 8 M y ácido fórmico al 1 %) a cada muestra para una incubación de 5 minutos a 20 °C. La muestra inactivada luego se inyectó en un Waters HDX Manager para digestión por pepsina/proteasa XIII en línea. Los péptidos digeridos se separaron mediante una columna C8 (1,0 mm x 50 mm, NovaBioassays) con un gradiente de 13 minutos de 10 % - 32 % de B (fase móvil A: ácido fórmico al 0,5 % en agua, fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). Los péptidos eluidos se analizaron mediante espectrometría de masas Q Exactive HF en modo LC-MS/MS o LC-MS.

Los datos de LC-MS/MS de una muestra de CD28 no deuterada se buscaron en una base de datos que incluía CD28 y su secuencia aleatoria con el uso del Motor de búsqueda Byonic (Protein Metrics). Los parámetros de búsqueda (en ELN) se establecieron por defecto con el uso de digestión enzimática no específica y glucosilación humana como modificación de variable común. La lista de péptidos identificados se importó después al software HDX Workbench (versión 3.3) para calcular la captación de deuterio de cada péptido detectado por LC-MS de todas las muestras deuteradas. Para un péptido dado, se usó la masa del centroide (masa promedio ponderada en intensidad) en cada punto de tiempo para calcular la captación de deuterio (D) y el porcentaje de captación de deuterio (% D).

Captación de deuterio (captación de D) = Masa promedio (deuterada) - Masa promedio (no deuterada)

$$\text{Porcentaje de captación de deuterio (\% D)} = \frac{\text{Captación de D para el péptido en cada punto de tiempo} \times 100 \%}{\text{Captación máxima de D del péptido (definido en ELN)}}$$

Se identificaron un total de 73 péptidos de hCD28.mmH (SEQ ID NO: 75) tanto de hCD28.mmH solo como de hCD28.mmH en complejo con muestras de anticuerpos anti-CD28, lo que representa un 85,8 % de cobertura de secuencia de hCD28. Cualquier péptido que exhibiera un porcentaje diferencial del valor de captación de D por encima del 5 % se definió como protegido significativamente. Para hCD28.mmH (SEQ ID NO: 75), las regiones correspondientes a los aminoácidos 5-20 (VKQSPMLVAYDNAVNL; SEQ ID NO: 77), 29-38 (FSREFRASLH; SEQ ID NO: 78), 80-84 (YLQNL; SEQ ID NO: 79) y 91-108 (IYFCKIEVMYPPPYLDNE; SEQ ID NO: 80) estaban significativamente protegidas por el anticuerpo anti-CD28, con los aminoácidos 91-108 (IYFCKIEVMYPPPYLDNE; SEQ ID NO: 80) definidos como el epítipo primario en CD28. La protección de estos residuos por el anticuerpo anti-CD28 se confirmó mediante el uso de hCD28.mFc (SEQ ID NO: 76). Consulte también la Tabla 22 a continuación para obtener un resumen de los resultados de este estudio.

Tabla 22: Péptidos de CD28.mmH seleccionados con protección significativa al unirse a un anticuerpo anti-CD28

CD28 Resi- duos	Carga (+)	5 minutos			10 minutos			Δ% D
		REGN 2011	REGN2011 + mAb14226P2		REGN 2011	REGN2011 + mAb14226P2		
		Cen- troide MH ⁺	Cen- troide MH ⁺	ΔD	Cen- troide MH ⁺	Cen- troide MH ⁺	ΔD	
5-11	1	805,74	805,53	-0,21	805,83	805,58	-0,25	-7,1
5-11	2	806,69	806,48	-0,21	806,76	806,51	-0,24	-7,1
8-11	1	449,28	449,11	-0,16	449,33	449,16	-0,17	-10,5
12-19	1	869,61	869,30	-0,31	869,72	869,33	-0,39	-7,2
12-19	2	869,95	869,72	-0,23	870,08	869,69	-0,39	-6,4
12-20	1	982,96	982,54	-0,42	983,05	982,63	-0,41	-7,4
15-20	1	648,02	647,61	-0,40	648,06	647,68	-0,38	-12,3
29-32	1	540,44	540,06	-0,38	540,51	540,08	-0,44	-25,4
29-37	2	1116,66	1116,15	-0,51	1116,79	1116,20	-0,60	-9,9
29-37	3	1117,61	1117,74	-0,50	1117,11	1117,17	-0,57	-9,6
30-37	2	969,13	968,85	-0,28	969,23	968,90	-0,33	-6,4
30-38	3	1107,35	1106,93	-0,42	1107,48	1107,02	-0,46	-7,8
33-37	1	595,17	595,23	-0,12	595,05	595,08	-0,15	-5,8
33-38	1	732,40	732,24	-0,16	732,45	732,25	-0,19	-5,5
33-38	2	733,43	733,25	-0,18	733,48	733,29	-0,19	-5,7
80-84	1	652,81	652,51	-0,30	652,91	652,60	-0,31	-12,6
81-84	1	489,26	488,99	-0,28	489,34	489,04	-0,30	-17,9
91-93	1	443,49	443,50	-0,07	443,42	443,41	-0,09	-10,1
93-97	1	641,40	641,48	-0,58	640,83	640,89	-0,59	-24,4
94-105	2	1458,33	1456,70	-1,63	1458,63	1456,83	-1,80	-30,7
94-107	2	1688,09	1686,36	-1,73	1688,33	1686,43	-1,90	-25,2
94-108	2	1817,69	1816,15	-1,54	1817,88	1816,19	-1,69	-20,2
96-107	2	1455,75	1455,07	-0,68	1455,91	1455,09	-0,82	-13,4
98-107	2	1212,67	1212,07	-0,60	1212,78	1212,07	-0,70	-16,3
98-108	2	1342,17	1341,57	-0,60	1342,10	1341,61	-0,48	-5,0

Ejemplo 13: Los anticuerpos biespecíficos PSMA x CD28 mejoran potencialmente la eficacia antitumoral de la inmunoterapia contra PD-1

Resumen

La activación de las células T se mejora con la participación de un segundo receptor coestimulador ("señal 2") además de la activación de TCR/CD3 específica de antígeno ("señal 1"). El objetivo de la inmunoterapia contra el cáncer es activar y movilizar de manera óptima las células T para detectar y destruir las células tumorales. Sin embargo, los tratamientos actuales tienden a no activar las células T de manera eficiente y selectiva en el sitio del tumor, a menudo no logran respuestas duraderas y/o conducen a toxicidades indeseables. En este documento, se introdujo una novedosa modalidad inmunoterapéutica dirigida a tumores que combina la inhibición de PD-1 junto con anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos se unen a un antígeno específico del tumor (TSA) (por ejemplo, PSMA) con un brazo y al receptor coestimulador CD28 en las células T con el otro brazo. De hecho, la inhibición de la señalización de PD-1-PD-L1 aumenta significativamente la proporción de CD28 acumulado en la sinapsis inmunitaria, lo que permite que la molécula biespecífica TSAxCD28 ejerza su efecto. Esta inmunoterapia combinada se validó con el uso de un anticuerpo biespecífico que es específico para el antígeno prostático (por ejemplo, PSMA). A diferencia de los superagonistas de CD28 no específicos, que activan ampliamente las células T, los biespecíficos TSAxCD28 fueron bien tolerados cuando se usaron solos o en combinación con un bloqueador de PD-1 en modelos de ratones inmunocompetentes genéticamente humanizados o en primates. Es importante destacar que, en presencia de la activación endógena de TCR/CD3, TSAxCD28 mejoró notablemente la actividad antitumoral del anticuerpo contra PD-1, asociado con respuestas antitumorales duraderas. La terapia combinada potenció específicamente la activación de células T intratumorales, promoviendo un fenotipo de células T similar a las células efectoras de memoria sin secreción sistémica de citocinas en una variedad de modelos de xenoinjertos de tumores singénicos y humanos. La combinación de esta clase de anticuerpos biespecíficos coestimuladores de CD28 con el tratamiento anti-PD-1 clínicamente validado puede proporcionar terapias de anticuerpos "listas para usar" bien toleradas con una eficacia antitumoral notablemente mejorada.

Introducción

Numerosos anticuerpos monoclonales (mAb) destinados a mejorar la activación de las células T están en desarrollo clínico como terapias antitumorales (M. K. Callahan, M. A. Postow, J. D. Wolchok, Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* **44**, 1069-1078 (2016)). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos actuales enfrentan el desafío de superar la naturaleza inhibidora del microambiente tumoral, por lo que no logran generar una activación eficiente de las células T específicas del tumor y la subsiguiente muerte de las células tumorales (K. G. Anderson, I. M. Stromnes, P. D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Cell* **31**, 311-325 (2017)). Varios mAb de bloqueo dirigidos contra inhibidores de puntos de control, como la proteína asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1)/ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), han sido aprobados clínicamente para melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no pequeño y carcinoma cutáneo de células escamosas, metastásico, avanzado (J. S. Weber y otros, Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375-384 (2015); S. L. Topalian y otros, Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**, 1020-1030 (2014); M. A. Postow, M. K. Callahan, J. D. Wolchok, Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974-1982 (2015); M. R. Migden y otros, PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **379**, 341-351 (2018)). El bloqueo de PD-1 libera la interrupción de la activación de las células T, pero su eficacia como agente único a menudo no es suficiente para obtener la eliminación del tumor y respuestas antitumorales duraderas. Cuando se combinan, anti-PD-1/PD-L1 y anti-CTLA-4 producen tasas de respuesta altas en ciertos tipos de tumores, pero a menudo se observan toxicidades de alto grado (J. Larkin y otros, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **373**, 23-34 (2015); D. B. Johnson y otros, Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **375**, 1749-1755 (2016); M. H. Pollack y otros, Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD1 in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **29**, 250-255 (2018); J. D. Wolchok y otros, Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369**, 122-133 (2013)). En consecuencia, se están realizando esfuerzos

considerables para identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de responder a la inhibición de puntos de control mediante la identificación de biomarcadores que predicen la capacidad de respuesta (R. Cristescu y otros, Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* **362**, (2018)). Además, las terapias de combinación destinadas a mejorar la eficacia del bloqueo de PD-1 y la durabilidad de la respuesta antitumoral mediante la combinación de anticuerpos agonistas que desencadenan receptores coestimuladores o con otras modalidades como la quimioterapia o la radioterapia se encuentran en evaluación preclínica y clínica (S. Hu-Lieskovan, A. Ribas, New Combination Strategies Using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 Checkpoint Inhibitors as a Backbone. *Cancer J* **23**, 10-22 (2017); Y. K. Chae y otros, Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer* **6**, 39 (2018); P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* **283**, 110-120 (2018); B. Wang y otros, Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8(+) T cell dysfunction and maintain memory phenotype. *Sci Immunol* **3**, (2018); S. Chen y otros, Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model. *Cancer Immunol Res* **3**, 149-160 (2015)). La inestabilidad de microsatélites y la alta carga mutacional generan posibles antígenos endógenos que se expresan en ciertos cánceres (K. W. Mouw, M. S. Goldberg, P. A. Konstantinopoulos, A. D. D'Andrea, DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discov* **7**, 675-693 (2017)). Las células T reconocen estos péptidos mutados como neoantígenos (M. Efremova, F. Finotello, D. Rieder, Z. Trajanoski, Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* **8**, 1679 (2017)). Sin embargo, de forma aislada, la presentación de estos antígenos no es suficiente para promover la activación robusta de las células T para generar actividad antitumoral (S. Spranger, R. Bao, T. F. Gajewski, Melanoma-intrinsic beta-catenin signaling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231-235 (2015)). Es probable que esto se deba al microambiente inmunitario inhibitorio del tumor.

En el presente documento se describe una novedosa modalidad inmunoterapéutica que utiliza biospecíficos TSAxCD28 dirigidos contra el cáncer de próstata TSA PSMAxCD28, que cuando se combinaron con el anticuerpo bloqueador de PD-1 indujo

una inmunidad antitumoral de larga duración y promovió una activación robusta de células T intratumorales y células T de memoria sin signos de liberación sistémica de citocinas en modelos de tumores animales. Los estudios de toxicología en ratones inmunocompetentes humanizados genéticamente y en monos cangrejeros demostraron que estos biespecíficos no presentan toxicidad por sí solos o en combinación con el anticuerpo anti-PD-1. En conjunto, estos datos sugieren que la combinación de esta clase de biespecíficos basados en CD28 (TSAxCD28) con la inhibición de PD-1 puede proporcionar soluciones biológicas "listas para usar" bien toleradas con actividad antitumoral marcadamente mejorada, específica y sinérgica.

Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se usaron en el Ejemplo 13.

Diseño del estudio

Un objetivo ilustrativo de esta invención fue desarrollar un anticuerpo biespecífico TSAxCD28 y demostrar que TSAxCD28 potencia la activación de células T inducida por PD-1 *in vitro* y mejora de forma segura la eficacia antitumoral *in vivo*. La actividad *in vitro* se demostró con imágenes de anticuerpos biespecíficos, PD-1 y CD28 localizados en la sinapsis inmunitaria de conjugados de células T y células diana, mejora de la liberación de citocinas de células T PD-1. Se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* en un modelo de tumor de ratón singénico. El volumen tumoral y las citocinas séricas se monitorearon a lo largo del tiempo para demostrar la respuesta al tratamiento con anticuerpos biespecíficos. Un propósito de los estudios en monos cangrejeros fue determinar la seguridad y tolerabilidad (perfil farmacológico y toxicológico) de TSAxCD28 como monoterapia o en combinación con PD-1 en primates no humanos. Los animales se examinaron para determinar la toxicidad mediante observaciones clínicas y muestras de sangre para analizar las citocinas séricas y el fenotipo de las células T.

Estudios con animales

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los NIH. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Regeneron Pharmaceuticals.

Líneas celulares

Se cultivaron células Jurkat Clon E6-1 (ATCC, núm. TIB-152), Raji (ATCC, núm. CCL-86™), línea celular HEK293 (ATCC, núm. CRL-1573) y A-431 (ATCC, CRL-1555™) de acuerdo con el protocolo recomendado por la ATCC. La línea celular HEK293/hCD20 se generó mediante el uso de un vector de mamífero que codifica una hCD20 dirigida por un promotor de ubiquitina (aminoácidos M1 a P297 del número de acceso NP_068769.2). Las células transfectadas se cultivaron en 500 µg/ml de Geneticina A (G418) para seleccionar líneas celulares de expresión estable. Para generar células que expresan hCD80 o hPDL1, se utilizó un plásmido lentiviral que codifica CD80 humano (288aa de largo; número de acceso NM_005191.4) y un gen de resistencia a la neomicina o PDL1 humano (290aa de largo; número de acceso NM_14143.4) y se usó un gen de resistencia a puromicina para transfectar células HEK293T, facilitando la producción de partículas virales, que posteriormente se utilizaron para infectar células HEK293/hCD20 o Raji. Se aislaron células positivas a CD80 o PDL1 humanos mediante FACS. Las células Jurkat se transdujeron con NFκB-Luc mediante el uso de un lentivirus de Qiagen (Cat núm. CLS-013L) y un plásmido lentiviral que codifica PD-1 humano y un gen de resistencia a puromicina. Todas las líneas celulares generadas se mantuvieron en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G + NEAA suplementado con 500 µg/ml de G418 y/o 0,5 µg/ml de puromicina.

La línea celular DU145/hPSMA se generó mediante la transducción de células DU145 (ATCC, HTB-81) con partículas virales que fueron producidas por células HEK293T transfectadas con un plásmido lentiviral que codifica PSMA humano (aminoácidos M1 a A750 del número de acceso Q04609) y un gen de resistencia a neomicina. Después de la infección, las células se cultivaron en Geneticina A (G418) a 500 µg/ml para seleccionar las células que expresan PSMA de manera estable. La línea celular generada, DU145/PSMA, se mantuvo en MEM + FBS al 10 % + P/S/G con G418 a 500 µg/ml.

Para generar líneas de células tumorales modificadas para expresar ligandos coestimuladores, el plásmido lentiviral pLVX con el promotor EF1a que codifica CD86 de ratón o un vector vacío y un gen de resistencia a puromicina (pLVX.EF1a.CD86-puro y pLVX.EF1a.EV-puro, respectivamente) se utilizó para transfectar células HEK293T, facilitando la producción de partículas virales, que posteriormente se utilizaron para infectar MC38 (National Cancer Institute, Laboratory of Tumor Immunology & Biology). Las líneas celulares modificadas que expresan CD86 se aislaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las

células se mantuvieron en las condiciones recomendadas por la ATCC en presencia de Puromicina a 0,5 µg/ml. Las líneas celulares resultantes se denominaron MC38/CD86 y MC38/EV.

Para la generación de células MC38/hPSMA, se utilizó un plásmido lentiviral que codifica PSMA humano (aminoácidos M1 a A750 del número de acceso Q04609) y un gen de resistencia a neomicina para transfectar células HEK293T, facilitando la producción de partículas virales, que posteriormente se utilizaron para infectar células originales MC38. Las células positivas a PSMA humano se aislaron mediante FACS. MC38/hPMA se mantuvieron en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G + NEAA suplementado con G418 a 500 µg/ml.

Secuencia de imágenes de Amnis ImageStream

La secuencia de imágenes de Amnis ImageStream se realizó como se describe en el Ejemplo 7.

Aislamiento de células T CD3⁺ primarias humanas

El aislamiento de células T se realizó como se describe en el Ejemplo 8.

Liberación de IL-2 de células T CD3⁺ primarias en una reacción MLR con células DU145/PSMA

Las células T CD3⁺ humanas previamente aisladas y congeladas se descongelaron el día del ensayo en medio de estimulación (medio de cultivo celular X-VIVO 15 complementado con FBS al 10 %, HEPES, NaPyr, NEAA y BME 0,01 mM) que contenía nucleasa benzonasa a 50 U/ml. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en medio de estimulación y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Las células originales DU145 o las células DU145 modificadas para expresar PSMA humano se trataron con mitomicina C a 25 µg/ml en medio de estimulación primaria a una concentración de 10×10^6 células/ml. Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5 %, las células tratadas con mitomicina C se lavaron 3 veces con D-PBS que contenía FBS al 2 % y se añadieron a los pocillos que contenían células T CD3⁺ a una concentración final de 5×10^4 células por pocillo. Para evitar que se produzca una posible actividad agonista de CD28 a través del anclaje del Fc del anticuerpo de CD28 a los receptores de Fc, se incluyó en cada pocillo de ensayo una cantidad saturante de anticuerpo IgG humano no específico (100 nM de cada uno de:

hIgG1, hIgG4 e hIgG4s). Posteriormente, los anticuerpos de PSMA x CD28, control no objetivo x CD28 o control de isotipo hIgG4s se titularon de 30 pM a 200 nM en una dilución 1:3 y se añadieron a los pocillos. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpos titulados. Como las células DU145 expresan endógenamente PD-L1, se evaluó el impacto de la supresión de PD-1 de la actividad de las células T mediante la adición de 20 nM constante del antagonista de PD-1 REGN2810 a los pocillos. También se incluyó una condición en ausencia de inhibición de PD-1, en la que se usó 20 nM de un control de isotipo hIgG4 correspondiente. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y posteriormente se centrifugaron para sedimentar las células. Se recogieron 50 µl de sobrenadante del medio y de esto, se analizaron 5 µl en un ensayo de IL-2 humana AlphaLISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones se adquirieron en el lector de placas de múltiples etiquetas Envision de Perkin Elmer. Se generó una curva patrón de concentraciones conocidas de IL-2 con el fin de extrapolar los pg/ml de IL-2 generados en los pocillos de ensayo. Todas las diluciones en serie se probaron por duplicado. Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de dosis-respuesta de 10 puntos mediante el uso del software GraphPad Prism™.

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS

El ensayo de citotoxicidad basado en FACS se realizó como se describió previamente (Ejemplo 8).

Estudios de tumores singénicos

MC38/EV y MC38/CD86 se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. Se implantaron 1x10⁶ MC38/EV o MC38/CD86 por vía subcutánea en ratones C57BL/6. Los ratones se trataron con anticuerpo contra PD-1 (RPM1-14, BioXcell) o control de isotipo IgG2a de rata (BioXcell) a 5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal los días 0, 3, 7, 10 y 14 después del implante del tumor. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana utilizando calibradores (Roboz RS-6466). El volumen tumoral se calculó mediante el uso de la fórmula $X * Y * (X/2)$, donde Y es la dimensión más larga y X es la dimensión perpendicular. Los ratones con tumores mayores de 2000 mm³ o con tumores ulcerados fueron sacrificados por asfixia con CO₂.

Se generaron ratones humanizados para hCD3/hCD28/hPSMA como se describe en el Ejemplo 10. Los tratamientos con anticuerpos también fueron similares, excepto que los anticuerpos indicados o los anticuerpos biespecíficos se administraron como monoterapia o en combinación mediante inyección intraperitoneal los días 0, 7 y 14 (tratamiento profiláctico) o los días 9, 13 y 22 (tratamiento diferido) a 5 mg/kg.

Análisis de citocinas tisulares ex vivo

El día 29 después del implante, los ratones CD3/CD28/PSMA con tumores MC38/hPSMA se sacrificaron mediante asfixia con dióxido de carbono. Los bazos y los tumores se extrajeron y almacenaron en medio sobre hielo. Todos los pasos siguientes se realizaron en hielo o a 4 °C a menos que se indique lo contrario. Los tumores se cortaron en trozos pequeños y los fragmentos se procesaron en una suspensión de células individuales mediante el uso del kit de disociación de tumores de ratón de Miltenyi según el protocolo de fabricación (Miltenyi 130-096-730). Los bazos se procesaron en una suspensión de células individuales mediante el uso de una disociación mecánica suave con MACS (programa 4 para bazo) y machacarlos a través de un filtro de 70 micras con el extremo de goma de una jeringa de 3 ml. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. Los glóbulos rojos se lisaron mediante resuspensión del sedimento celular en 1 ml de tampón de lisis ACK e incubando en hielo durante 5 minutos. El tampón de lisis ACK se inactivó con tampón de FACS. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. La suspensión de células se resuspendió en 1 ml de medio y se sembraron 0,2 ml en placas de 96 pocillos (células tumorales 20-400K o células de bazo 50-70K. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y se recogió el sobrenadante del cultivo. Los niveles de citocinas en el sobrenadante del cultivo de tejidos se midieron mediante el uso del kit V-Plex Proinflammatory MSD según el protocolo del fabricante (Meso Scale Diagnostics K15048D-4). El número de células sembradas por pocillo se determinó mediante análisis de FACS. Los niveles de citocinas se normalizaron con respecto al número de células sembradas. Las perlas de calibración se procesaron junto con las células para medir con precisión el número de células mediante el siguiente cálculo:

Número de células = (número de perlas introducidas x número de células contadas por FACS)/número de perlas contadas por FACS

Medición de los niveles de citocinas en suero en ratones

Las mediciones de los niveles de citocinas en suero en ratones se realizaron como se describió previamente (Ejemplo 10).

Análisis de citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo de los experimentos *in vivo*, se extrajeron los tumores, se prepararon suspensiones de células individuales y se lisaron los glóbulos rojos mediante el uso de tampón de lisis ACK (ThermoFisher Scientific). La discriminación de células vivas/muertas se realizó mediante el uso de un kit de tinción de células muertas fijables en azul Live/Dead (ThermoFisher Scientific). Las muestras se adquirieron en Symphony (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software Cytobank (Cytobank, Santa Clara, CA). Los análisis se realizaron con igual número de eventos por muestra. El rango de eventos fue determinado por la muestra con el menor número de eventos adquiridos. Para agrupar las células T automáticamente en función de marcadores específicos, se utilizó el análisis CITRUS de Cytobank.

Estudios de toxicología en monos cangrejeros

El estudio en monos cangrejeros se realizó como se describió previamente (Ejemplo 11).

Resultados

La inhibición del punto de control de PD-1 aumenta la proporción relativa de CD28 dentro de la sinapsis inmunitaria, lo que permite que los biespecíficos TSAxCD28 mejoren notablemente la capacidad de anti-PD-1 para promover la activación de células T *in vitro*

Para probar si los agonistas biespecíficos coestimuladores podrían complementar la inhibición de puntos de control, se probó un biespecífico PSMAxCD28 ilustrativo de la presente invención (bs16429D) con respecto a su capacidad para mejorar la eficacia del bloqueo de PD-1 en una forma de activación de células T dependiente de TCR/CD3. De hecho, la activación eficaz de las células T depende de la agrupación conjunta de los complejos TCR/CD3 y CD28 en la "sinapsis inmunitaria" (IS). Sin embargo, las señales de activación de TCR/CD3 y CD28 son inhibidas directamente por la fosforilación de PD-1-Shp-2 seguida de la agrupación de PD-1/PD-L1 en la sinapsis (E. Hui y otros, T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* **355**, 1428-1433 (2017); J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, J. L. Riley, SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor

tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945 - 954 (2004)). Para determinar la localización relativa de CD28 y PD-1 en la IS, se desarrolló un ensayo in vitro de secuencia de imágenes de Amnis ImageStream como se describe en el Ejemplo 7, con el uso de células T Jurkat que sobreexpresan PD-1 y células diana tumorales Raji modificadas para sobreexpresar PD-L1. Un anticuerpo CD20xCD3 biespecífico marcado con fluorescencia (E. J. Smith y otros, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)) se utilizó para replicar la unión del péptido MHC/TCR y para visualizar las interacciones de las células T con las células diana que forman una IS. Dos anticuerpos monoclonales contra PD-1 diferentes marcados con fluorescencia (mAb contra PD-1), un bloqueador (mAb contra PD-1, REGN2810, (E. Burova y otros, Characterization of the Anti-PD-1 Antibody REGN2810 and Its Antitumor Activity in Human PD-1 Knock-In Mice. *Mol Cancer Ther* **16**, 861-870 (2017)) y un no bloqueador (NB mAb contra PD-1) se utilizaron para bloquear simultáneamente la interacción con PD-L1 y visualizar la localización de PD-1. Se encontró que en ausencia de expresión de PD-L1 en las células diana, y en presencia de cualquiera de los mAb contra PD-1, no hubo cambios en la cantidad relativa de PD-1 o CD28 en la IS (**Figura 14**). Sin embargo, la expresión de PD-L1 en las células diana en presencia de un mAb contra PD-1 no bloqueador, disminuyó CD28 en la sinapsis y promovió una alta acumulación de PD-1, en la IS. Por el contrario, en presencia de un mAb contra PD-1 bloqueador, la localización de PD-1 se redujo significativamente y los niveles relativos de CD28 se mantuvieron en la IS. La distribución de PD-1 y CD28 se cuantificó calculando la proporción de tinción de anticuerpos dentro y fuera de la IS (**Figura 15**). Estos datos muestran que la expresión de PD-L1 en las células diana mejora la localización de PD-1 en la IS mientras que disminuye CD28. Además, un mAb bloqueador de PD-1 reduce la cantidad relativa de PD-1 en la IS y rescata el nivel de CD28, aumentando así la relación relativa de CD28 a PD-1.

A continuación, se probó si PSMAxCD28 puede mejorar el efecto del bloqueo de PD-1 sobre la muerte de células tumorales inducida por la activación de células T. Con este fin, se utilizó la línea de cáncer de próstata 22RV1. Las células 22RV1 expresan PSMA de forma endógena y se diseñaron para expresar PD-L1 (22RV1/PD-L1). Debido a la ausencia de estimulación de TCR/CD3 a través de una respuesta de células T alogénicas, se utilizó PSMAxCD3 (patente de los Estados Unidos núm.

10,179,819) para proporcionar un estímulo primario. En cocultivos de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, que contienen células T humanas) y células 22RV1/PD-L1, PSMAxCD3 solo indujo ~ 40 % de destrucción de células tumorales (**Figura 16**, rombos, EC₅₀ de 8E-10). La adición de mAb contra PD-1 a PSMAxCD3 aumentó la destrucción de células tumorales a ~ 55 % (**Figura 16**, triángulos sólidos, EC₅₀ de 4E-10). Curiosamente, la combinación de PSMAxCD28 con PSMAxCD3 aumentó de manera similar el grado de destrucción de las células tumorales a ~ 55 % con una mayor potencia (**Figura 16**, círculos sólidos, EC₅₀ de 6E-11), lo que sugiere que PSMAxCD28 puede anular la inhibición mediada por PD-1/PD-L1. Curiosamente, la combinación triple de PSMAxCD28, mAb contra PD-1 y PSMAxCD3 logró la mayor destrucción de células tumorales con ~ 70 %, lo que demuestra el efecto sinérgico de esta combinación (**Figura 16**, cuadrados sólidos, EC₅₀ de 7E-11). Como era de esperar, ni PSMAxCD28 solo, mAb contra PD-1 ni la combinación de PSMAxCD28 más mAb contra PD-1 indujeron la destrucción de células tumorales (**Figura 16**, símbolos abiertos). De acuerdo con esto, se observó el máximo incremento en la liberación de IFN γ con el tratamiento de combinación triple (**Figura 17**).

A continuación, se determinó el efecto de la combinación de PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 sobre la activación de células T humanas primarias *in vitro*. Para replicar la expresión fisiológica de PD-L1 y la estimulación de TCR/CD3, se empleó una reacción mixta linfocitaria (MLR). En una MLR unidireccional, la incompatibilidad de determinantes alogénicos conduce a la activación de las células T, que puede cuantificarse mediante la producción de citocinas. Aquí, las células T de donantes sanos se incubaron con células DU145/PSMA, una línea celular de cáncer de próstata modificada que expresa de forma endógena PD-L1 y sobreexpresa PSMA y los anticuerpos indicados (**Figura 18**). En presencia de células DU145/PSMA y células T, el PSMAxCD28 biespecífico conduce a un aumento dependiente de la dosis en la liberación de IL-2 ~ 3-4 veces sobre el control de isotipo IgG4 (**Figura 18**, círculos). De manera similar, la adición de mAb contra PD-1 20 nM en el ensayo de MLR también aumentó la liberación de IL-2 ~ 3-4 veces sobre el control de isotipo IgG4 (**Figura 18**, triángulos). En combinación, PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 20 nM potenciaron notablemente la activación inducida por PSMAxCD28 biespecífico con niveles máximos de IL-2 que aumentaron ~ 20 veces sobre el control de isotipo (**Figura 18**, cuadrados), lo que demuestra que el PSMAxCD28 biespecífico en combinación con un mAb que bloquea PD-1 activa potente y sinérgicamente las células T en presencia de

células tumorales con niveles endógenos de activación de TCR/CD3 e inhibición de PD-L1.

En conjunto, estos resultados demostraron que el PSMAxCD28 biespecífico puede mejorar de manera potente la capacidad del mAb contra PD-1 para promover la activación de las células T en presencia de la señalización de TCR/CD3 (impulsada por un biespecífico para CD3 o una alo-respuesta), lo que da como resultado una mayor liberación de citocinas y destrucción de células tumorales que expresan PSMA y PD-L1 *in vitro*.

La sobreexpresión de un ligando de CD28 natural en células tumorales actúa en sinergia con el tratamiento con mAb contra PD-1 para inducir inmunidad antitumoral duradera dependiente de células T CD8 *in vivo*

Para determinar si la interacción de CD28 con su(s) ligando(s) natural(es) podría potenciar la eficacia antitumoral del mAb contra PD-1 *in vivo*, las células tumorales MC38 se modificaron para sobreexpresar CD86, uno de los ligandos coestimuladores para CD28 (datos no mostrados). La combinación de las células MC38/CD86 y el tratamiento con mAb contra PD-1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral (**Figura 19A**), lo que dio como resultado una regresión tumoral completa asociada con un consistente beneficio de supervivencia (**Figura 19B**) en comparación con células MC38 como control negativo transfectadas con un control de vector vacío (MC38/EV). El agotamiento de las células T CD8⁺ durante el curso del tratamiento anuló por completo la eficacia antitumoral resultante de la combinación de la terapia con mAb contra PD-1 y células MC38/CD86, lo que demuestra una dependencia de las células T CD8⁺ (**Figura 19C**). Es de destacar que los ratones libres de tumores a los que inicialmente se les implantaron células MC38/CD86 y se trataron con mAb contra PD-1 rechazaron un segundo tumor original MC38 que se implantó más de 60 días después de la implantación del tumor primario, lo que indica la presencia de una respuesta de células T de memoria (**Figura 19D**). En consecuencia, estos datos demuestran que el efecto sinérgico de la expresión constitutiva del ligando de CD28 y la terapia anti-PD-1 puede dar como resultado una inmunidad antitumoral dependiente de CD8 duradera *in vivo*.

PSMAxCD28 se sinergia con el tratamiento con mAb contra PD-1 para inducir inmunidad antitumoral en un modelo de tumor singénico

Los hallazgos descritos anteriormente se ampliaron a continuación para demostrar la eficacia antitumoral del tratamiento con el uso de un anticuerpo biespecífico TSAxCD28 solo o en combinación con un mAb contra PD-1 en modelos de tumores singénicos. Con el uso del modelo de tumor MC38 singénico C57BL6 establecido como se describe en el presente documento, el gen hPSMA (pLVX.EF1a.hPSMA) se introdujo genéticamente en las células MC38, para crear el antígeno específico del tumor MC38/hPSMA como se describe en este documento. Para evitar la posibilidad de que los ratones rechacen espontáneamente estos tumores singénicos que expresan un antígeno tumoral humano introducido, estos ratones se humanizaron genéticamente para PSMA. Además, los genes de CD3 γ - δ - ϵ y CD28 también se humanizaron con el uso de la tecnología VelociGene como se describió anteriormente (D. M. Valenzuela y otros, High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 652-659 (2003); W. T. Poueymirou y otros, F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* **25**, 91-99 (2007)), para que los biespecíficos reconozcan las células T del huésped (a través de hCD3 o hCD28), así como los antígenos tumorales humanos tanto en tejidos normales como en los tumores (es decir, hPSMA), que representa la situación clínica real (Y. Kinoshita y otros, Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg* **30**, 628-636 (2006)). En este modelo, la combinación del PSMAxCD28 biespecífico y el mAb contra PD-1 proporcionó el mayor control del crecimiento tumoral, lo que se tradujo en un consistente beneficio de supervivencia.

El tratamiento inmediato con una combinación de anti-CD28 X anti-PSMA y anti-PD1 inhibe sinérgicamente el crecimiento tumoral

En un estudio con tratamiento inmediato, se administraron anti-CD28 x anti-PSMA, anti-PD1 o de control de isotipo IgG2a de rata como monoterapia o en combinación mediante inyección intraperitoneal los días 0, 7 y 14 a 5 mg/kg. El crecimiento tumoral se controló a lo largo del tiempo mediante el uso de mediciones con calibre de diámetro X e Y. Se calculó el volumen tumoral ($X \times Y \times (X/2)$). Los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor era superior a 2000 mm³.

Como se muestra en las **Figuras 20A a 20E**, los anticuerpos anti-CD28 x anti-PSMA suprimieron el crecimiento tumoral y aumentaron la supervivencia en ratones cuando se usaron solos, pero también actuaron en sinergia con anticuerpos anti-PD-1 para

promover el rechazo del tumor y aumentar la supervivencia incluso más que cuando se utilizaron en ausencia de un anticuerpo contra PD-1.

El tratamiento con una combinación de CD28xPSMA y PD1 induce una inmunidad antitumoral de larga duración contra una exposición tumoral secundaria

Además, los ratones libres de tumores que fueron implantados y tratados con la combinación de PSMAxCD28 biespecífico y mAb contra PD-1 rechazaron una segunda línea tumoral original MC38 que se implantó después de más de 60 días del implante del tumor primario, lo que demuestra la generación de memoria inmunitaria (**Figura 21A**) consistente con la observación descrita en este documento. Estos resultados sugieren que se está generando una señal de TCR específica del antígeno endógeno (Señal 1) a partir del complejo de péptido MHC en las células tumorales implantadas MC38/PSMA. Se ha demostrado que las células tumorales MC38 expresan altos niveles de proteínas retrovirales endógenas reactivadas como p15E, y que las células T intratumorales en ratones C57BL6 responden a este antígeno p15E (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). De acuerdo con este hallazgo, se encontró que la terapia de combinación de PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 indujo células T periféricas reactivas a al menos un antígeno endógeno P15E, lo que apoya la generación de memoria inmunitaria antitumoral (**Figura 21B**). En particular, en experimentos similares en los que el tratamiento con PSMAxCD28 en combinación con PSMAxCD3 indujo el rechazo de tumores MC38/hPSMA, esos ratones libres de tumor no pudieron rechazar una reexposición secundaria al tumor (**Figura 21C**). En conjunto, estos datos muestran que los biespecíficos para CD28 actúan en sinergia con el mAb contra PD-1 en este modelo de tumor singénico para PSMA y pueden potenciar las respuestas endógenas de linfocitos T dependientes de TCR/CD3.

El tratamiento terapéutico con una combinación de anti-CD28xanti-PSMA y anti-PD1 inhibe sinérgicamente el crecimiento tumoral

De manera similar, en un protocolo de tratamiento retrasado, la combinación de PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 10 días después de la implantación inhibió el crecimiento de tumores MC38/hPSMA establecidos (**Figura 22A**) y también resultó en

un aumento significativo en la supervivencia (**Figura 22C**) y reducción en el volumen tumoral (**Figura 22D**). Curiosamente, la terapia de combinación dirigida al tumor aumentó selectivamente las citocinas intratumorales como se muestra para el IFN γ (**Figura 22B**). No se observó inducción de citocinas esplénicas o sistémicas en los mismos ratones (**Figuras 23A y 23B**). Además, el perfil de expresión de los marcadores de activación de células T mostró que la expresión de PD-1 intratumoral se incrementó con el tratamiento con PSMAxCD28 (**Figura 24**) en apoyo de este tratamiento de combinación. Para caracterizar aún más los subconjuntos de células T que responden tras el tratamiento de la combinación, se obtuvo el perfil de células T CD8⁺ infiltrantes del tumor el día 17 después de la exposición al tumor mediante citometría de flujo de alta dimensionalidad. Se usó CITRUS (identificación, caracterización y regresión de agrupamientos) para estratificar de forma independiente diferentes agrupamientos de células T estadísticamente significativos. Es importante destacar que se encontró que el bloqueo de PD-1 expandió las células T CD8⁺ efectoras (CD44^{alto}CD62L^{bajo}) (agrupamiento C1) que expresan un alto nivel de marcadores de activación/agotamiento (PD-1, TIM3, LAG3, Ki67) (**Figura 25**). Sin embargo, solo el tratamiento combinado pudo impulsar una expansión de las células T CD8⁺ intratumorales (agrupamiento C2) con un fenotipo similar al de memoria (EOMES, CD62L, Tcf1 altos, CD122 y CD127 intermedios) y un fenotipo menos agotado (LAG3, TIM3, CD38, KLRG1, PD-1 bajos, CD5 superior) (**Figura 25**) (M. Philip y otros, Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452-456 (2017)). Estos datos demuestran que la terapia de combinación con PSMAxCD28 biespecífico y anti-PD-1 impulsa una sólida inmunidad antitumoral asociada con la activación de células T intratumorales con un fenotipo similar al de memoria y un beneficio de supervivencia.

TSAXCD28 solo o en combinación con una terapia con mAb contra PD-1 no induce la activación sistémica de células T en comparación con el superagonista de CD28 en monos cangrejeros

Los datos de los primeros ensayos clínicos mostraron que los anticuerpos bivalentes que activan CD28, denominados "superagonistas de CD28" (CD28-SA), activaron ampliamente las células T y dieron como resultado una toxicidad profunda asociada con el síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un grupo de voluntarios sanos (G. Suntharalingam y otros, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)). Para evaluar la

tolerabilidad de los biespecíficos TSAxCD28 solos, o el potencial de una farmacología de sinergia en combinación con mAb contra PD-1, se llevaron a cabo estudios exploratorios en ratones triple humanizados modificados genéticamente y monos cangrejeros. Tres monos por grupo de tratamiento recibieron una dosis única (10 mg/kg) de PSMAxCD28 solo o en combinación con mAb contra PD-1 (REGN2810) (10 mg/kg) mediante infusión intravenosa (los grupos de combinación recibieron infusiones secuenciales) (**Tabla 20, Figuras 26A-26C y 27**).

Además, tres monos por grupo recibieron una dosis única (01. mg/kg) de anticuerpo biespecífico anti-PSMAxCD3 y una dosis única (10 mg/kg) de anticuerpo superagonista de CD28 como se describe en el presente documento (**Tabla 20, Figuras 26A-26C y 27**). La evaluación de la toxicidad se basó en observaciones clínicas, consumo cualitativo de alimentos, peso corporal, signos vitales (temperatura corporal, frecuencia cardíaca, oximetría de pulso y frecuencia respiratoria), patología clínica y anatómica al finalizar el experimento. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de inmunofenotipado de citocinas y FACS. PSMAxCD28 solo o en combinación con PD-1 fue bien tolerado y todos los animales sobrevivieron durante todo el estudio. No se observaron signos clínicos relacionados con el artículo de prueba (datos no mostrados). No se encontraron cambios en el peso de los órganos, ni se observaron cambios macroscópicos en la necropsia terminal (datos no mostrados). Además, no se observó liberación significativa de citocinas, marginación o activación de células T (**Tabla 23, Figuras 26A-26C**). Por el contrario, se observó una liberación significativa de citocinas, marginación de linfocitos y activación de células T en los monos que recibieron el “superagonista” de CD28 solo (**Figuras 29A y 29B**). Se observó una infiltración masiva de células inmunitarias en el riñón, el cerebro y las vesículas seminales de los animales tratados con el superagonista de CD28. Por el contrario, no se observaron cambios histológicos significativos relacionados con el tratamiento en los animales que recibieron PSMAxCD28 solo o en combinación con PD-1 (datos no mostrados).

Tabla 23: No se observaron signos clínicos significativos o liberación de citocinas con anti-PSMAXCD28 solo o en combinación con anti-PD-1 en el estudio exploratorio de toxicología por dosis única en monos

Molécula	Descripción	Dosis (mg/kg)	Dia 1 - Observaciones clínicas	Cualquier Obs.,	Células T absolutas (E3/μL)		Células T en proliferación Ki67+ (E3/μL)		Células T activadas (E3/μL)-ICOS		CRP (mg/dl)	Citocina plasmática a las 5 horas después de la dosis (pg/ml)							
					Previo a la prueba	5 horas	Previo a la prueba	96 horas	Previo a la prueba	96 horas		IL-6	IL-8	IL-10	IFN-γ	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-5
bs15780D	anti-PSMAxCD3	0,1		HUN	4,15	0,11	0,24	1,21	0,42	0,82	13,6	4449	531	2878	159	BLQ*	BLQ	BLQ	BLQ
					7,41	0,15	0,88	1,69	0,40	0,64	14,9	11239	3910	22140	1800	BLQ	357	BLQ	152
bs16429D	anti-PSMAxCD28	1			5,68	0,01	0,42	3,87	0,68	3,75	15,4	10529	776	24784	1176	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					6,58	7,22	0,62	0,41	0,33	0,32	0,5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
bs16429D	anti-PSMAxCD28	10			4,91	5,09	0,42	0,23	0,26	0,17	0,5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					4,50	4,04	0,63	0,39	0,51	0,48	1,1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					6,03	5,73	0,33	0,44	0,33	0,22	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					4,64	4,53	0,38	0,60	0,58	0,50	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
REGN2329 (TeGenero)	Superagonista anti-CD28	10			10,06	7,16	0,88	0,49	0,84	0,48	1,3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
					7,02	0,26	0,60	2,57	0,51	1,94	15,4	764	BLQ	3364	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1169
bs16429D + REGN2810	anti-PSMAxCD28 + PD-1	10 + 10			7,06	0,19	0,79	1,55	0,43	1,11	15	2907	1095	17155	333	BLQ	238	BLQ	615
					11,87	0,66	1,13	3,61	0,48	2,09	15,3	5226	5324	7918	1509	163	522	342	198
bs16431D + REGN2810	anti-PSMAxCD28 + PD-1	10 + 10			3,76	1,90	0,38	0,37	0,34	0,28	10,8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					3,66	2,07	0,54	0,52	0,22	0,20	1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	195	BLQ	323	BLQ
bs16431D + REGN2810	anti-PSMAxCD28 + PD-1	10 + 10			3,54	1,34	0,39	0,40	0,12	0,10	11,9	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					3,63	4,23	0,36	0,42	0,24	0,38	5,1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	333	BLQ
mAb10154P3	EGFRVIIIab				3,53	1,90	0,35	0,19	0,13	0,15	2,9	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
					4,16	3,16	0,42	0,32	0,26	0,33	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	187	BLQ	323	BLQ
mAb10154P3	EGFRVIIIab				6,21	5,62	0,60	0,58	0,32	0,39	0,8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	151	BLQ	335	BLQ
					7,22	7,72	0,84	0,77	0,39	0,41	11	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	267	BLQ	378	BLQ
mAb10154P3	EGFRVIIIab				3,55	4,61	0,51	0,75	0,26	0,44	0,2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

*BLQ: por debajo del límite inferior de cuantificación

De acuerdo con los estudios anteriores en monos cangrejeros, no se observó elevación de citocinas en ratones triple humanizados vírgenes (hCD3/hCD28/hPSMA) con o sin tumor, dosificados con PSMAxCD28 solo o en combinación con PD-1 (**Figura 27 y Figuras 29A y 29B**). Por el contrario, la dosificación con el superagonista de CD28 indujo un aumento significativo de IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-5 4 horas después de la dosis (**Figura 27 y Figuras 29A y 29B**). De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se ha demostrado previamente que el TSAxCD28 biespecífico (así como los anticuerpos contra CD28 bivalentes no superagonistas originales utilizados para fabricar estos biespecíficos), no logró inducir la proliferación de células T humanas en el ensayo de recubrimiento en seco y en húmedo *in vitro* recomendado por la FDA (R. Stebbings, D. Eastwood, S. Poole, R. Thorpe, After TGN1412: recent developments in cytokine release assays. *J Immunotoxicol* **10**, 75-82 (2013)) en comparación con la fuerte proliferación inducida por CD28-SA (datos no mostrados). En general, estos datos sugieren que los biespecíficos TSAxCD28 se toleran bien. Además, como se describió anteriormente (Ejemplo 10, **Figura 28**), el tratamiento anti-PSMAxCD28 solo o en combinación con anti-PD1 no elevó las citocinas séricas en ratones con tumores, mientras que el tratamiento anti-PSMAxCD3, solo o en combinación con anti-PD1, aumentó el nivel de citocinas en suero en ratones portadores de tumores.

Análisis

En el presente documento se introduce y valida una novedosa inmunoterapia dirigida a tumores que utiliza biespecíficos TSAxCD28 en combinación con mAb bloqueador de PD-1, que induce una inmunidad antitumoral de larga duración y promueve la activación consistente de células T intratumorales en modelos de tumores animales. Los estudios de toxicología en ratones inmunocompetentes humanizados genéticamente y en monos cangrejeros demostraron que estos biespecíficos no presentan toxicidad por sí solos o en combinación con mAb contra PD-1, lo que sugiere que este enfoque terapéutico puede proporcionar soluciones biológicas bien toleradas y “listas para usar” con actividad antitumoral marcadamente mejorada, específica y sinérgica.

Se sabe que la inhibición de puntos de control con mAb bloqueador de PD-1 libera la interrupción de la activación de las células T, pero su eficacia como agente único a menudo no es suficiente para obtener la eliminación del tumor y una respuesta antitumoral duradera en muchos cánceres. Actualmente se están evaluando varios

enfoques para mejorar la tasa de respuesta a la inhibición de PD-1. De hecho, la identificación de biomarcadores para predecir la capacidad de respuesta a mAb contra PD-1 (R. Cristescu y otros, Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* **362**, (2018)), las terapias de combinación no dirigidas a tumores que utilizan la inhibición de PD-1 junto con anticuerpos agonistas que desencadenan receptores coestimuladores para mejorar la activación de las células T, o con quimioterapia o radioterapia, se están sometiendo actualmente a pruebas preclínicas y clínicas (S. Hu-Lieskovan, A. Ribas, New Combination Strategies Using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 Checkpoint Inhibitors as a Backbone. *Cancer J* **23**, 10-22 (2017); Y. K. Chae y otros, Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer* **6**, 39 (2018); P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* **283**, 110-120 (2018)). Sin embargo, el desafío es que muchas de estas combinaciones a menudo se basan en la disponibilidad de un fármaco preexistente y en una racionalidad post-hoc para combinar las terapias, en lugar de un enfoque verdaderamente dirigido por hipótesis, que en algunos casos ha llevado a peores resultados para el paciente (M. J. Ahn, J. M. Sun, S. H. Lee, J. S. Ahn, K. Park, EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* **16**, 465-469 (2017)). Es evidente que la inhibición de puntos de control y la reactivación del sistema inmunitario ofrecen el potencial de remisión a largo plazo en varios pacientes (J. S. Weber y otros, Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375-384 (2015); S. L. Topalian y otros, Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**, 1020-1030 (2014); M. A. Postow, M. K. Callahan, J. D. Wolchok, Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974-1982 (2015); M. R. Migden y otros, PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **379**, 341-351 (2018)), por lo tanto, se justifican los métodos para mejorar aún más o aumentar la actividad de las células T para promover una respuesta más duradera. Aquí, para mejorar la eficacia antitumoral de un mAb contra PD-1, se introdujo el concepto de utilizar un biespecífico TSAxCD28 para mejorar la señalización y activación de las células T. De hecho, esta novedosa inmunoterapia de

combinación se validó con el uso de una diana tumoral (por ejemplo, PSMA) y demostró que los anticuerpos biespecíficos coestimuladores CD28 actúan en sinergia con un mAb contra PD-1 no solo para generar una activación consistente de las células T, sino también para proporcionar respuestas antitumorales duraderas sin toxicidad sistémica. En consecuencia, esta terapia de combinación dirigida al tumor puede proporcionar una ventaja considerable sobre los enfoques no dirigidos descritos anteriormente. El uso de anticuerpos biespecíficos para CD28, que no activan directamente CD28 a menos que estén agrupados en las superficies de las células tumorales, ofreció la posibilidad de promover la coestimulación solo en el sitio del tumor, evitando la toxicidad sistémica de los anticuerpos activadores de CD28 convencionales (G. Suntharalingam y otros, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**, 1018-1028 (2006)), la toxicidad que a menudo se observa con la combinación del bloqueo de CTLA-4 y PD-1 (J. Larkin y otros, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **373**, 23-34 (2015); D. B. Johnson y otros, Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **375**, 1749-1755 (2016); M. H. Pollack y otros, Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD1 in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **29**, 250-255 (2018)) u otros anticuerpos bivalentes agonistas coestimulantes (N. H. Segal y otros, Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res* **23**, 1929-1936 (2017)). Los estudios de toxicología en ratones inmunocompetentes humanizados genéticamente, así como en monos cangrejeros, mostraron que estos biespecíficos no exhiben toxicidad como agentes únicos o en combinación con mAb contra PD-1. El perfil de seguridad junto con la mejora de la eficacia antitumoral de los anticuerpos biespecíficos anti-PSMAxCD28 de la invención con mAb contra PD-1 en modelos singénicos sugiere que esta modalidad terapéutica es consistente y podría tener una utilidad más amplia como una novedosa clase de combinación para la inmunoterapia.

Para mejorar la destrucción de células tumorales mediada por células T, se están desarrollando enfoques dirigidos a tumores (E. Dahlen, N. Veitonmaki, P. Norlen, Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Ther Adv Vaccines Immunother* **6**, 3-17 (2018)). De hecho, los anticuerpos biespecíficos basados en CD3 representan una clase emergente de anticuerpos que pueden desencadenar eficazmente la activación de las células T, mediante la unión de una célula T a una célula tumoral y la activación

de TCR/CD3 (E. J. Smith y otros, A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci Rep* **5**, 17943 (2015)), imitando así la "señal 1" normal. Sin embargo, a pesar de su prometedora eficacia clínica, los biespecíficos para CD3 pueden asociarse con el síndrome de liberación de citocinas (CRS) debido a la activación directa de las células T y la falta de especificidad solo del tumor (S. L. Maude, D. Barrett, D. T. Teachey, S. A. Grupp, Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J* **20**, 119-122 (2014)). Aquí se demostró por primera vez que la terapia de combinación con TSAxCD28 biespecífico y mAb contra PD-1 induce una activación de células T específicas del tumor que se asocia con una respuesta de memoria a largo plazo en un modelo de tumor de ratón inmunocompetente. Los anticuerpos biespecíficos TSAxCD28 tienen actividad limitada o nula en ausencia de la "señal 1" y el bloqueo de PD-1 se basa en la respuesta de células T específicas de antígenos endógenos a péptidos tumorales (W. Hugo y otros, Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35-44 (2016); N. A. Rizvi y otros, Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128 (2015); J. M. Mehnert y otros, Immune activation and response to pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer. *J Clin Invest* **126**, 2334-2340 (2016); D. T. Le y otros, Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409-413 (2017)). Por lo tanto, la "señal 1" proporcionada por los antígenos tumorales endógenos es importante para el tratamiento de combinación con PSMAxCD28 y mAb contra PD-1. Esto contrasta con los biespecíficos para CD3 que activan las células T independientemente de su especificidad de TCR y, por lo tanto, pueden no generar una inmunidad específica del tumor, de larga duración. De hecho, se encontró que aunque el tratamiento combinado de PSMAxCD3 y PSMAxCD28 induce una fuerte eficacia antitumoral, no genera una fuerte respuesta de memoria. Además, se ha demostrado que las células tumorales MC38 expresan altos niveles de péptidos retrovirales endógenos reactivados como p15E, y los ratones C57BL6 pueden generar células T endógenas que reconocen y responden a este neoepítipo (J. C. Yang, D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother* **23**, 177-183 (2000); H. J. Zeh, 3rd, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, J. C. Yang, High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* **162**, 989-994 (1999)). En el

modelo de MC38 descrito en el presente documento, se demostró que la terapia de combinación con PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 aumentó el número de células T que respondían a este neoantígeno p15E. Además, en este documento se encontró a través de un perfil extenso de las células T infiltrantes del tumor que la combinación con PSMAxCD28 y mAb contra PD-1 da como resultado una célula T CD8 menos disfuncional y promueve un fuerte fenotipo de células T de memoria intratumorales. Por tanto, los biespecíficos para CD28 junto con el bloqueo de PD-1 pueden potenciar las respuestas de linfocitos T dependientes de TCR/CD3 endógenos que conducen a respuestas antitumorales duraderas.

Los datos en este documento demuestran que PD-1 se acumula en la sinapsis inmunitaria cuando las células diana expresan PD-L1 y su acumulación se asocia con una reducción de CD28 en la sinapsis, lo que sugiere que PD-1 podría ejercer la inhibición de las células T, al prevenir la localización de CD28 en la sinapsis. Además, se encontró en el presente documento que el bloqueo de PD-1 impedía la localización sináptica de PD-1 mientras que la acumulación de CD28 en la sinapsis aumentaba, lo que permitió que el biespecífico TSAxCD28 mejorara notablemente la capacidad del mAb de PD-1 para promover la activación de las células T. Este puede ser uno de los mecanismos por los que el anticuerpo bloqueador de PD-1 promueve la activación de las células T. En general, la visualización de la localización de PD-1 y CD28 en la sinapsis inmunitaria después de la interacción PD-1-PD-L1 y/o la inhibición de PD-1, también permite comprender mejor el efecto del bloqueo de PD-1 en la activación de las células T, así como la sinergia entre TSAxCD28 y mAb contra PD-1 al nivel de la sinapsis inmunitaria.

Aunque los mAb contra PD-1 son una nueva clase importante de inmunoterapia, en muchos casos seguramente será importante una mayor optimización de la actividad antitumoral. Así como los enfoques CAR-T han empleado receptores quiméricos que activan artificialmente tanto la "señal 1" como la "señal 2" para mejorar su actividad antitumoral (E. A. Zhukovsky, R. J. Morse, M. V. Maus, Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol* **40**, 24-35 (2016); A. I. Salter y otros, Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* **11**, (2018)), ahora se muestra el posible beneficio de combinar la inhibición de PD-1 con biespecíficos para CD28 (que proporcionan la "señal 2") para mejorar la actividad antitumoral. Este enfoque tiene varios beneficios prácticos sobre las terapias CAR-T, ya que no requiere una preparación laboriosa de la terapia celular

la cual debe personalizarse individualmente para cada paciente, ni requiere el "agotamiento de los linfocitos" de los pacientes de manera preventiva a través de una quimioterapia tóxica que a menudo se asocia con efectos adversos por lo que no pueden aceptar la terapia celular (C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361-1365 (2018)). Este enfoque biespecífico ofrece el potencial de aumentar la eficacia y la seguridad a través de su especificidad de acción. En conjunto, estos datos sugieren que la combinación de biespecíficos basados en CD28 con el mAb contra PD-1 clínicamente validado, tal como cemiplimab, puede proporcionar soluciones biológicas "listas para usar" bien toleradas con actividad antitumoral notablemente mejorada y sinérgica.

El alcance de la presente invención no se limita a las formas de realización descritas en la presente. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de aquellas que se describen en la presente, serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.