

ANTICUERPO TRIESPECÍFICO DIRIGIDO A BCMA, GPRC5D, Y CD3

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los
5 Estados Unidos con número de serie 63/149.921, presentada el 16 de febrero de
2021. Todo el contenido de la solicitud antes mencionada se incorpora en la
presente descripción como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

10 La descripción proporcionada en la presente descripción se relaciona con
anticuerpos multiespecíficos que se unen al antígeno de maduración de células
B (BCMA, por sus siglas en inglés), al receptor acoplado a la proteína G, clase
C, grupo 5, miembro D (GPRC5D) y al determinante de grupo 3 (CD3), con
anticuerpos monoclonales que se unen al BCMA y con métodos de producción y
15 uso de los anticuerpos descritos.

ANTECEDENTES

El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia maligna hematológica
más común y constituye el 2 % de todas las muertes por cáncer. El MM es una
20 enfermedad heterogénea causada principalmente por translocaciones
cromosómicas, entre otras t(11; 14), t(4; 14), t(8; 14), del(13), del(17) (Drach et al.,
(1998) Blood 92(3): 802-809; Gertz et al., (2005) Blood 106(8):2837-2840; Facon
et al., (2001) Blood 97(6): 1566-1571). Los pacientes afectados con MM pueden

experimentar una variedad de síntomas relacionadas con la enfermedad causados por infiltración de la médula ósea, destrucción ósea, insuficiencia renal, inmunodeficiencia, y carga psicosocial de un diagnóstico de cáncer. Hasta el 2006, la tasa de supervivencia relativa de 5 años para el MM fue

5 aproximadamente del 34 %, lo que destaca que el MM es una enfermedad difícil de tratar, para la que en la actualidad no existen opciones curativas.

El antígeno de maduración de células B, también conocido como BCMA, CD269, TNFRSF 17 (Uniprot Q02223), es un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral que se expresan, preferentemente, en las células plasmáticas

10 diferenciadas [Laabi et al. (1992) EMBO J 11(11):3897-3904; Madry et al. (1998) Int Immunol 10(11):1693-1702]. El BCMA es una proteína transmembrana tipo I no glicosilada que participa en la maduración, crecimiento y supervivencia de las células B. El BCMA es un receptor para dos ligandos de la superfamilia del TNF: APRIL (un

15 ligando que induce la proliferación, CD256, TNFSF13), el ligando de alta afinidad para el BCMA, y el factor de activación de células B BAFF (THANK, BlyS, estimulador de linfocitos B, TALL-1 y zTNF4), el ligando de baja afinidad para el

BCMA. APRIL y BAFF muestran similitud estructural y especificidades de unión al receptor superpuestas aunque distintas. El represor TACI también une a BAFF y a APRIL. Las unión coordinada de BAFF y APRIL a BCMA, y/o TACI activa el factor de

20 transcripción NF- κ B y aumenta la expresión de los miembros de la familia prosupervivencia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y regula negativamente la expresión de factores proapoptóticos (por ejemplo, Bid, Bad, Bik, Bim, etc.), y así inhibe la apoptosis y promueve la supervivencia. Esta acción

combinada promueve la diferenciación de las células B, la proliferación, la supervivencia, así como la producción de anticuerpos (revisado en Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133). En línea con este hallazgo, BCMA también soporta el crecimiento y la supervivencia de las células B humanas malignas, lo que
5 incluye a las células de mieloma múltiple (MM). Novak et al. encontraron que las líneas celulares MM y células MM aisladas recientemente expresan BCMA y la proteína TACI en sus superficies celulares y tienen una expresión variable de la proteína BAFF-R en su superficie celular (Novak et al., (2004) Blood 103(2):689-694).

El uso de anticuerpos anti-BCMA para el tratamiento de linfomas y mieloma
10 múltiple se menciona en las patentes núm. WO2002066516 y WO2010104949. Anticuerpos contra BCMA se describen, por ejemplo, en Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, y en las patentes núm. WO200124811 y WO200124812. No obstante, a pesar del hecho de que el BCMA, BAFF-R y TACI, es decir, los receptores de las células B que pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF,
15 y sus ligandos BAFF y APRIL, son objeto de las terapias para luchar contra el cáncer, se necesitan más opciones para el tratamiento de tales condiciones médicas.

El receptor acoplado a la proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPCR5D) es un GPCR huérfano, atípico, de clase C, identificado por primera vez en 2001 (Bräuner-Osborne et al. Biochim Biophys Acta. 1518(3):237-248, 2001). El GPCR5D
20 y otros GPCR del grupo 5 inusualmente tienen dominios aminoterminal cortos para los receptores de clase C y, por lo tanto, está previsto que tendrán configuraciones moleculares similares a los receptores de clase A. En este sentido, son únicos, con homología de secuencias respecto de los GPCR de clase C y una topología

estructural prevista comparable a la de los receptores de clase A. La consecuencia funcional de la activación de GPRC5D no se ha descrito y el ligando aún se desconoce. El gen tiene tres exones y está ubicado en el cromosoma 12p13.3 en humanos. El receptor de GPRC5D está altamente conservado entre varias especies
5 y comparte 92 % de identidad con el GPRC5D de mono cynomolgus.

El uso de anticuerpos anti-GPRC5D para el tratamiento de mieloma múltiple se menciona en las patentes núms. WO2018017786 y WO2019154890. No obstante, a pesar del hecho de que el GPRC5D es objeto de las terapias para luchar contra el cáncer, se necesitan otras opciones para el tratamiento de
10 tales condiciones médicas.

El ARNm de GPRC5D se expresa mayormente en todas las células plasmáticas malignas de pacientes con MM (Atamaniuk JA et al. Eur J Clin Invest 42(9) 953-960; 2012; Frigyesi-blood and Cohen, et al. Hematology 18(6): 348-35; 2013). La expresión de GPRC5D es variable entre los pacientes y está bien
15 correlacionada con la carga celular plasmática y aberraciones genéticas tal como la delección de Rb-1 (Atamaniuk JA et al. Eur J Clin Invest 42(9) 953-960; 2012).

La resistencia clonal es un mecanismo común en el mieloma refractario en recaída. El direccionamiento a más de un antígeno tumoral de mieloma y el acoplamiento a las células T podría conducir a la destrucción eficiente de las
20 células plasmáticas malignas y a la negatividad mínima de la enfermedad residual (MRD, por sus siglas en inglés). El direccionamiento doble al BCMA y GPRC5D mejora la avidéz y potencia de los anticuerpos, maximiza la erradicación tumoral en presencia de una población celular heterogénea,

previene el escape del antígeno tumoral (p. ej., captura las células de MM que no expresan suficiente BCMA o GPRC5D solo), mejora la eficacia tumoral y puede mitigar el potencial para generar el síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés). En consecuencia, existe una necesidad de anticuerpos terapéuticos que se dirijan tanto al BCMA como al GPRC5D para el tratamiento de mieloma múltiple y/o condiciones médicas relacionadas.

SUMARIO

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos multiespecíficos que se unen, o se unen específicamente, al BCMA, GPRC5D y CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos triespecíficos que se unen, o se unen específicamente, al BCMA, GPRC5D y CD3 y fragmentos de unión al antígeno triespecíficos de estos. También se describen polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos, células que expresan los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno proporcionados, así como vectores asociados y anticuerpos multiespecíficos marcados de manera detectable o fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos. Adicionalmente, se describen los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos pueden usarse para tratar el cáncer (p. ej., cáncer que expresa BCMA y/o GPRC5D); los anticuerpos multiespecíficos

para BCMA x GPRC5D x CD3 pueden usarse para diagnosticar o monitorear la progresión, regresión o estabilidad del cáncer que expresa GPRC5D; para determinar si un paciente debe o no tratarse para el cáncer; o para determinar si un sujeto está afectado o no de un cáncer que expresa BCMA y/o GPRC5D y, por lo tanto, podría ser susceptible de tratamiento con un agente terapéutico contra el cáncer específico para BCMA y/o GPRC5D, tal como los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos en la presente descripción.

Anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3

En la presente descripción se describen anticuerpos multiespecíficos aislados que se unen al BCMA, GPRC5D y CD3 (“anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3”) y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos.

En modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno trispecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 aislado, o fragmento de unión trispecífico de este, comprende: (a) un primer brazo de unión al antígeno que comprende un primer dominio variable de cadena pesada (VH1) y un primer dominio variable de cadena ligera (VL1); (b) un segundo brazo de unión al antígeno que comprende un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2); y (c) un tercer brazo de unión al antígeno que comprende un tercer dominio variable de cadena pesada (VH3) y un tercer dominio variable de cadena ligera (VL3). En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno se une a

un epítipo en CD3, el segundo brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en GPRC5D, y el tercer brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en BCMA.

En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno del anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este comprende una primera
5 porción de cadena pesada (HC1) que comprende el VH1 y una porción de cadena ligera que comprende el VL1. El VH1 y el VL1 forman un primer dominio de unión al antígeno que se une a un primer antígeno. El segundo brazo de unión al antígeno del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de este comprende una
10 segunda porción de cadena pesada (HC2) que comprende el VH2. El VH2 de la HC2 forma un segundo dominio de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno. La HC1 o la HC2 se acopla además al tercer brazo de unión al antígeno que comprende el VH3 que forma un tercer dominio de unión al antígeno que se une a un tercer antígeno. La HC1 y la HC2 comprenden cada una opcionalmente un dominio de fragmento cristizable (Fc), donde el dominio Fc comprende una región constante
15 de cadena pesada 2 (CH2) y CH3. En algunas modalidades, el primer antígeno es el cúmulo de diferenciación 3 (CD3) y el segundo antígeno es antígeno de maduración de células B (BCMA), y el tercer antígeno es el miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D). En algunas modalidades, el primer antígeno es el cúmulo de diferenciación 3 (CD3) y el segundo antígeno es el
20 miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D), y el tercer antígeno es antígeno de maduración de células B (BCMA). Algunos aspectos del anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3, o un

fragmento de unión trispecífico de este, se describen adicionalmente en la descripción detallada y las secciones de ejemplos más abajo.

En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA humano pero no al BCMA de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA se une a un epítipo que incluye uno o más residuos del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) del BCMA. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA (o “brazo específico para BCMA”) del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 se deriva de un anticuerpo para BCMA descrito en la presente descripción (por ejemplo, de un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR enumeradas en la Tabla 1).

En algunas modalidades, el brazo específico para GPRC5D del anticuerpo multiespecífico se une al GPRC5D humano pero no al GPRC5D de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo específico para GPRC5D de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno se unen al dominio extracelular del GPRC5D humano. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D (o “brazo específico para GPRC5D”) del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 se deriva de un anticuerpo para GPRC5D descrito en la presente descripción (p. ej., de un anticuerpo que tiene las secuencias de la CDR enumeradas en la Tabla 2).

La redirección de los linfocitos T a las células de MM que expresan BCMA y/o GPRC5D a través del complejo TCR/CD3 representa un enfoque alternativo atractivo. El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en un heterodímero del TCR alfa (α)/beta (β) o heterodímero del TCR gamma (γ)/delta (δ) que se

coexpresa en la superficie celular con las subunidades invariantes de CD3 gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), zeta (ζ), y eta (η) marcadas. En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos descritos en la presente descripción se unen a CD3 ϵ . En

5 algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 (o “brazo específico para CD3”) del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 se deriva del anticuerpo monoclonal CD3B376. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 (o “brazo específico para CD3”) del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 se deriva del anticuerpo monoclonal SP34, un isotipo

10 IgG3/lambda de ratón. (K.R. Abhinandan and A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839). En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende las CDR de la cadena pesada y/o CDR de la cadena ligera descritas en la Tabla 3, o un cualquier dominio VH y/o un cualquier dominio VL seleccionado de la Tabla 3.

15 En algunas modalidades, los brazos específico para BCMA, GPRC5D y/o CD3 de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de esta. La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc pero muestran

20 grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los

receptores de Fc (FcγR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias tales como las células destructoras naturales y los macrófagos, lo que conduce a la fagocitosis o lisis de las células diana. En la CDC, los anticuerpos matan las células diana mediante la activación de la cascada de complemento en la superficie celular.

5 Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones efectoras mediadas por Fc no forman parte del mecanismo de acción. Estas funciones efectoras mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan, potencialmente, un riesgo de seguridad al provocar toxicidad fuera del mecanismo. La modificación de las funciones efectoras puede lograrse mediante
10 el diseño por ingeniería de las regiones Fc para reducir su unión a los FcγR o los factores del complemento. La unión de IgG a los FcγR activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 y IgG4 para reducir
15 o silenciar las funcionalidades de Fc.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida para el FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb y/o el FcγRIIIa, (c) afinidad reducida para el FcγRI, (d) afinidad
20 reducida para el FcγRIIa, (e) afinidad reducida para el FcγRIIb, (f) afinidad reducida para el FcγRIIIb o (g) afinidad reducida para el FcγRIIIa.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo

multiespecífico es IgG, o un derivado de este. En algunas modalidades, el anticuerpo específico para CD3 o fragmento de unión al antígeno, del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico, es IgG1 o un derivado de esta. En algunas modalidades, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo IgG1 específico para CD3 del que se deriva el brazo de unión al CD3 comprende las sustituciones L234A, L235A y D265S en su región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo específico para CD3 o fragmento de unión al antígeno, del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico, es IgG4 o un derivado de esta. En algunas modalidades, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo IgG4 específico para CD3 del que se deriva el brazo de unión a CD3 comprende las sustituciones S228P, L234A, L235A, F405L, y R409K en la región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico se une a CD3 ϵ en células T humanas primarias y/o en células T de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico activa las células T CD4⁺ humanas primarias y/o las células T CD4⁺ de cynomolgus primarias.

Además de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos, también se proporcionan secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos. En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido sintético aislado que codifica la una o más CDR del dominio variable de cadena pesada y/o una o más CDR del dominio variable de cadena ligera de cada brazo de unión al antígeno del anticuerpo

triespecífico BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión triespecífico. En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido sintético aislado que codifica uno o más dominios variables de cadena pesada y/o uno o más dominios variables de cadena ligera del anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión triespecífico. En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido sintético aislado que codifica una o más cadenas polipeptídicas del primer, segundo, y/o tercer brazo de unión al antígeno del anticuerpo triespecífico BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión triespecífico. También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así como células que expresan los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 que se proporcionan en la presente descripción. En otra modalidad, se proporciona una célula aislada que expresa el anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión multiespecífico. Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como las células 293, células 293F, células de CHO), células de insecto (tales como las células Sf7), células de levadura, células de plantas o células bacterianas (tales como de E. coli). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para generar el anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o el fragmento de unión triespecífico mediante el cultivo de células.

Además, en la presente descripción se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

Métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3

También se describen métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos y fragmentos de unión al antígeno

5 multiespecíficos de estos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos pueden ser útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es un linfoma, tal como el mieloma múltiple que incluye el mieloma múltiple

10 quiescente (SMM, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple.

Los métodos descritos para tratar un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA en un sujeto que los necesita incluyen administrar al sujeto una cantidad

15 terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito o fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este. En algunas modalidades, el paciente es un mamífero, preferentemente, un ser humano. En modalidades preferidas, se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene cáncer mediante la administración de una cantidad

20 terapéuticamente efectiva del anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión al antígeno trispecífico de este a un paciente que lo necesita durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión trispecífico para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas.

En la presente descripción también se proporcionan métodos para redirigir una célula T a una célula cancerosa que expresa GPRC5D y/o BCMA mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión trispecífico para redirigir una célula T a un cáncer.

El experto en la técnica entenderá que los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos pueden especificarse en un formato de uso médico, por ejemplo, en la forma de anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos para usar en el tratamiento de la enfermedad como se define en la presente descripción, en particular el cáncer. Este experto en la técnica también comprenderá que los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos pueden especificarse en el llamado formato de Swiss, por ejemplo, en el formato del uso de anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos para la fabricación de un medicamento para el

tratamiento de una enfermedad como se define en la presente descripción, en particular el cáncer. Esto se aplica a lo largo de la descripción.

Kits con anticuerpos específicos para BCMA x GPRC5D x CD3

5 En la presente descripción se describen kits que incluyen los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos. Los kits descritos pueden usarse para llevar a cabo los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 proporcionados en la presente descripción, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas
10 modalidades, los kits descritos pueden incluir los anticuerpos descritos en la presente descripción y los reactivos para usar en el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA. En consecuencia, los kits descritos pueden incluir uno o más de los anticuerpos multiespecíficos, o un(os) fragmento(s) de unión al antígeno multiespecífico(s) de estos, descritos en la presente descripción y un
15 recipiente para conservar el anticuerpo o fragmento mientras no esté en uso, y/o las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento fijado a un soporte sólido y/o las formas marcadas detectables del anticuerpo, como se describe en la presente descripción.

20 Anticuerpos específicos para BCMA

En la presente descripción también se proporcionan anticuerpos que se unen al BCMA y fragmentos de unión al antígeno de estos. También se describen polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos

específicos para BCMA proporcionados y fragmentos de unión al antígeno, células que expresan los anticuerpos proporcionados y los fragmentos de unión al antígeno, así como también vectores asociados y anticuerpos marcados de manera detectable y fragmentos de unión al antígeno. Adicionalmente, se

5 describen métodos para usar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para BCMA y fragmentos de unión al antígeno podrían usarse para tratar el cáncer (p. ej., cáncer que expresa BCMA); los anticuerpos específicos para BCMA y fragmentos de unión al antígeno podrían usarse para diagnosticar o monitorear

10 la progresión, regresión o estabilidad del cáncer que expresa BCMA; para determinar si un paciente debe o no tratarse para el cáncer; o para determinar si un sujeto está afectado o no de un cáncer que expresa BCMA y, por lo tanto, podría ser susceptible al tratamiento con un agente terapéutico contra el cáncer específico para BCMA, tal como los anticuerpos multiespecíficos contra BCMA y

15 CD3 descritos en la presente descripción. Algunos aspectos del anticuerpo específico para BCMA, o un fragmento de unión al antígeno, se describen adicionalmente en la descripción detallada y secciones de ejemplos más abajo.

Métodos para usar anticuerpos específicos para BCMA

20 Se describen, además, métodos para usar los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA. Los anticuerpos particulares para usar en los métodos que se describen en esta sección incluyen aquellos que tienen el conjunto de CDR descrito para los anticuerpos en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519). Por

ejemplo, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser útiles para tratar el cáncer, al interferir con la interacción BCMA-receptor o en donde el anticuerpo se conjuga a una toxina, lo que dirige así la toxina al cáncer que expresa BCMA. Además, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno podrían ser

5 útiles para detectar la presencia de BCMA en una muestra biológica, tal como sangre o suero; para cuantificar la cantidad de BCMA en una muestra biológica, tal como sangre o suero; para diagnosticar cáncer que exprese BCMA; determinar un método para tratar a un sujeto que sufre de cáncer; o monitorear la progresión del cáncer que exprese BCMA en un sujeto. En algunas modalidades, el cáncer que expresa BCMA

10 puede ser un linfoma, tal como un mieloma múltiple (MM) que incluye el mieloma múltiple quiescente (SMM). En algunas modalidades, el cáncer que expresa BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. Los métodos descritos pueden llevarse a cabo antes de que el sujeto reciba tratamiento para el cáncer que expresa BCMA, tal como el

15 tratamiento con un anticuerpo multiespecífico contra BCMA y CD3. Además, los métodos descritos pueden llevarse a cabo después de que el sujeto recibe el tratamiento para cáncer que expresa BCMA, tal como el tratamiento con un anticuerpo multiespecífico contra BCMA y CD3 descrito en la presente descripción.

Los métodos descritos para detectar BCMA en una muestra biológica

20 incluyen exponer la muestra biológica a uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos en la presente descripción.

Los métodos descritos para diagnosticar cáncer que expresa BCMA en un sujeto incluyen, además, exponer la muestra biológica a uno o más de los

anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos de BCMA descritos en la presente descripción; sin embargo, los métodos incluyen, además, cuantificar la cantidad de BCMA presente en la muestra; comparar la cantidad de BCMA presente en la muestra con una muestra conocida estándar o de referencia; y determinar si los niveles de BCMA del sujeto entra dentro de los niveles de BCMA asociados con el cáncer.

En la presente descripción se describen, además, métodos para monitorear un cáncer que expresa BCMA en un sujeto. Los métodos descritos incluyen exponer la muestra biológica a uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos en la presente descripción; cuantificar la cantidad de BCMA presente en la muestra que se une al anticuerpo, o al fragmento de unión al antígeno de este; comparar la cantidad de BCMA presente en la muestra con una muestra conocida estándar o de referencia o la cantidad de BCMA en una muestra similar obtenida previamente del sujeto; y determinar si los niveles de BCMA del sujeto indican progresión, regresión o estabilidad del cáncer sobre la base de la diferencia en la cantidad de BCMA en las muestras comparadas.

Las muestras obtenidas, o derivadas de los sujetos son muestras biológicas tales como orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, o preparaciones histológicas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos pueden marcarse para el uso con los métodos descritos, u otros métodos

conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente descripción, o fragmentos de unión al antígeno de estos, pueden marcarse con un radiomarcador, un marcador fluorescente, una etiqueta de epítipo, biotina, un marcador cromóforo, un marcador ECL, una enzima, rutenio, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-ácido dietilenetriaminapentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, o polihistidina o tales marcadores similares conocidos en la técnica.

Kits con anticuerpos específicos para BCMA

En la presente descripción se describen kits que incluyen los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de estos específicos para BCMA descritos. Los kits descritos pueden usarse para llevar a cabo los métodos para usar los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA proporcionados en la presente descripción, u otros métodos conocidos por los expertos la materia. En algunas modalidades, los kits descritos pueden incluir los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción y los reactivos para el uso en la detección de la presencia de BCMA en una muestra biológica. En consecuencia, los kits descritos pueden incluir uno o más de los anticuerpos, o un(os) fragmento(s) de unión al antígeno de estos, descritos en la presente descripción y un recipiente para conservar el anticuerpo o fragmento mientras no se use, las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento fijado a un soporte sólido, y/o las formas marcadas detectables del anticuerpo o fragmento, como se describe en la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1B. Ilustración del anticuerpo triespecífico BGCB463 (Figura 1A) y modo de acción propuesto (Figura 1B).

Figuras 2A-2D. El BGCB463 (círculos) o control negativo B23B251 (triángulos) se incubaron con células silvestres (WT, por sus siglas en inglés) H929 (Figura 2A), inactivación (KO) H929-GPRC5D (Figura 2B), KO de H929-BCMA (Figura 2C), y KO de H929-GPRC5D/BCMA (Figura 2D) durante 1 hora a 37 °C a una concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con material marcado con AF647, la señal de MFI se analizó para generar una CE_{50} y CE_{90} . Las curvas son representativas de cinco experimentos independientes. Los valores de CE_{50} o CE_{90} son promedios de estos.

Figuras 3A-3D. El BGCB463 (círculos) o control negativo B23B251 (triángulos) se incubaron todos con células WT MM.1R (Figura 3A), KO de MM.1R -GPRC5D (Figura 3B), KO de MM.1R -BCMA (Figura 3C), y KO de MM.1R -GPRC5D/BCMA (Figura 3D) durante 1 hora a 37 °C a una concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con material marcado con AF647, la señal de MFI se analizó para generar una CE_{50} y CE_{90} . Las curvas son representativas de cinco experimentos independientes.

Figuras 4A-4C. El BGCB463 (círculos) o control negativo B23B251 (triángulos) se incubaron todos con células Pan T (3 donantes aleatorios, Figuras 4A-4C) durante 1 hora a 37 °C a una concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con material marcado con AF647, la señal

de MFI se analizó para generar una CE_{50} y CE_{90} . Los datos son representativos de dos ejecuciones individuales, ambas con tres donantes.

Figuras 5A-5C. El BGCB463 se incubó con células Pan T (3 donantes aleatorios, Figura 5A, Figura 5B, y Figura 5C) durante 1 hora a 4 °C (círculos) o 37 °C (triángulos) a una concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con material marcado con AF647, la señal de MFI se analizó para generar una CE_{50} .

Figuras 6A-6C. El BGCB463.003 (círculos), BGCB463.004 (cuadrados) y control negativo B23B251 (triángulos) se probaron con células H929 (Figura 6A), MM.1R (Figura 6B) y Pan T (Figura 6C) de 3 donantes. Las moléculas se incubaron durante 1 hora a 37 °C a una concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con material marcado con AF647, se analizó la señal de MFI.

Figuras 7A-7D. Las células H929 (Figura 7A), KO H929 de GPRC5D (Figura 7B), KO H929 de BCMA (Figura 7C) y KO H929 de GPRC5D/BCMA (Figura 7D) se incubaron durante 1 hora, 3 h, 5 h y 24 h a tres concentraciones optimizadas de BGCB463 a 37 °C. Después, las células se lavaron y se incubaron durante 30 min en hielo con anti-IgG humana AF647. La lectura es MFI de la señal de AF647.

Figuras 8A-8D. Los células WT MM.1R (Figura 8A), KO MM.1R de GPRC5D (Figura 8B), KO MM.1R de BCMA (Figura 8C) y KO MM.1R de GPRC5D/BCMA (Figura 8D) se incubaron durante 1 hora, 3 h, 5 h y 24 h a tres concentraciones optimizadas de BGCB463 a 37 °C. Después, las células se lavaron y se incubaron durante 30 min en hielo con anti-IgG humana AF647. La lectura es MFI de la señal de AF647.

Figuras 9A-E. El BGCB463 (círculos) o control negativo B23B251 (triángulos) se incubaron todos con células K562 que expresan el GPRC5D humano (Figura 9A), el BCMA humano (Figura 9B), el GPRC5D de cynomolgus (Figura 9C) o el BCMA de cynomolgus (Figura 9D) durante 1 hora a 37 °C a una
 5 concentración inicial de 2 μ M. Después de la detección secundaria con anti-IgG humana AF647, la señal de MFI se analizó para generar una CE_{50} y CE_{90} (Figura 9E). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Figuras 10A-10B. El BGCB463 (círculos) o control negativo B23B251 (triángulos), a una concentración inicial de 10 nM, se incubaron con células
 10 K562 que expresan el GPRC5D humano o de cynomolgus, o de 100 nM para K562 que expresan el BCMA humano/de cynomolgus como células dianas. Activación y citotoxicidad humanas en la Figura 10A. Activación y citotoxicidad de cynomolgus en la Figura 10B. Se añadieron células Pan T humanas (1 donante) con una relación de efector a diana (E:D) de 3:1 y se incubaron
 15 durante 72 h a 37 °C. La citotoxicidad se determinó usando tinte live/dead fijable y el CD25 se midió usando anti-CD25 conjugado con BV421.

Figura 11. Las células H929 se incubaron con una concentración creciente de BGCB463 o control negativo B23B251 durante 1 hora a 37 °C con anti-IgG humana AF647 en la presencia del medio (RPMI que contiene FBS al
 20 10 %) o RPMI que contiene suero humano al 90 %. La unión a BGCB463 no se ve afectada por la presencia de suero.

Figura 12. Las células T se incubaron con una concentración creciente de BGCB463 o control negativo B23B251 durante 1 hora a 37 °C con anti-IgG

humana AF647 en la presencia del medio (RPMI que contiene FBS al 10 %) o RPMI que contiene suero humano al 90 %. Los datos son representativos de tres donantes probados en dos experimentos. La unión a BGCB463 no se ve afectada por la presencia de suero.

5 **Figuras 13A-13B.** Las células H929 de GFP se incubaron con BGCB463 y células Pan T humanas de 3 donantes a una relación de E:D de 3:1 con anti-CD25 AF647 añadido para rastrear la activación de células T (Figura 13A). El porcentaje de citólisis se calculó basada en la señal de GFP en los pocillos tratados en comparación con los no tratados (Figura 13B). La incubación duró
10 aproximadamente 140 horas con imágenes adquiridas cada tres horas.

Figuras 14A-14F. Las células H929 de GFP se incubaron con moléculas de BGCB463 o B23B251 (control de isotipo) y las células Pan T humanas de cuatro donantes a una relación E:D de 1:1 y 5:1 con anti-CD25 AF647 añadido para rastrear la activación de células T. El porcentaje de citólisis se calculó basada en la señal de
15 GFP en los pocillos tratados en comparación con los no tratados. La incubación duró aproximadamente 140 horas con imágenes adquiridas cada tres horas. BGCB463, relación 1:1, citólisis (Figura 14A). BGCB463, relación 1:1, intensidad integrada total (Figura 14B). BGCB463, relación 5:1, citólisis (Figura 14C). BGCB463, relación 5:1, intensidad integrada total (Figura 14D). B23B251, relación 5:1, citólisis (Figura 14E).
20 B23B251, relación 5:1, intensidad integrada total (Figura 14F).

Figuras 15A-15D. Determinación de la interferencia de BCMA soluble usando sueros de pacientes. Donante 1 (Figura 15A); Donante 2 (Figura 15B); Donante 3 (Figura 15C); y suero normal (Figura 15D). Los sueros de paciente con niveles

conocidos de BCMA soluble se incubaron (suero al 90 % a media del 10 %) con BGCB463-AF647 marcado directamente y el control de isotipo B23B251-AF647 durante 1 hora a 37 °C en células H929. El suero de paciente al 50 % y al 10 % se diluyó con suero normal a una concentración final de 50 % y 10 %, respectivamente.

5 **Figura 16.** Ilustración de anticuerpos triespecíficos BGCB491

Figuras 17A-17B. El BGCB463, BGCB491 y tres controles (BGCB482 (CD3xNullxNull), BGCB483 (CD3xNullxBCMA), BGCB484 (CD3xGPRC5DxNull)) se evaluaron frente a células de BCMA⁺ GPRC5D⁺ (Figura 17A) y células de BCM⁻ GPRC5D⁻ (Figura 17B). La relación efector a diana (E/D) fue de 3:1; n = 1 donantes
10 de células T, 72 horas de incubación, concentración superior 53 nM, dilución de 1-5. Se realizaron pruebas para determinar la citotoxicidad y la activación de células T.

Figuras 18A-18B. El BGCB463 y BGCB491 agotaron las líneas celulares WT de H929, KO de GPRC5D y KO de BCMA 72 y 96 horas después de la incubación primaria (Figura 18A). La relación E:D fue 3:1, n = 5 donadores de
15 células T; 72(5) y 96(4) horas de incubación; concentración superior de 532 mM, gradiente de dilución 1-5. Ambos anticuerpos muestran un aumento de la activación de células T tanto a 72 como a 96 horas en las mismas células WT H929, KO GPRC5D y KO BCMA como se indicó anteriormente (Figura 18B).

Figura 19. El BGCB463 y BGCB491 se probaron en ensayos de
20 citotoxicidad y activación de células T con líneas de células H929, RAMOS y GRANTA-519. E:D fue 5:1, n = 1 donante de células T; 72 horas de incubación solamente; concentración superior de 53 nM; y una dilución de 1-5.

Figura 20. El BGCB463 y BGCB491 se probaron en ensayos de sangre entera para determinar la citotoxicidad y la activación de células T con células H292. E:D fue 5:1, n = 2 donantes de sangre entera; 48 horas de incubación; concentración superior de 532 nM; y una dilución de 1-5.

5 **Figuras 21A-21B.** Se demostró que el BGCB463 reduce el crecimiento tumoral en modelos de ratón con xenoinjerto de MM.1S y RPMI 8226 si se administra en una dosis suficientemente alta: ya sea 2 ug o 10 ug en el modelo con MM.1S (Figura 21A) o 5 ug o 10 ug en el modelo con RPMI 8226 (Figura 21B).

10 **Figura 22.** Se demostró que el BGCB463 y BGCB491 reducen el crecimiento tumoral en modelos de ratón con xenoinjerto profiláctico H929. En comparación con los controles de PBS, ambas dosis de 0,5 ug y 5 ug redujeron el crecimiento tumoral en modelos de KO H929 BCMA y KO H929 GPRC5D, con la mayor concentración de 5 ug que muestra más efecto.

15 **Figura 23.** El BGCB463 y BGCB491 se probaron en un ensayo de unión de Pan-T DRC de 1 hora, a 37 °C. Se usaron dos donantes de células Pan T humanas, y las moléculas de prueba tuvieron concentraciones iniciales de 2 uM con una dilución 1:3 y DRC de 11 puntos.

20 **Figuras 24A-24D.** El BGCB463, BGCB491 y un control nulo (null, en inglés) se probaron frente a células WT H929 (Figura 24A), KO H929 BCMA (Figura 24B), KO H929 GPRC5D (Figura 24C) y KO H929 dobles BCMA/GPRC5D (Figura 24D) en un ensayo de unión al conjunto de DRC, de 1 hora, a 37 °C.

Figura 25. Los perfiles de unión representativos de BGCB491 en las células WT H929, KO H929 BCMA, KO H929 GPRC5D y/o las células KO H929

dobles BCMA/GPRC5D después de 1 hora de incubación a 37 °C. El BGCB491 se indica con ● y el control negativo CD3xNullxNull BGCB510 se indica con ■. Las curvas son representativas de 5 experimentos independientes. El clon H15 de KO H929 GPRC5D es una línea de KO heterocigótica con 2 copias del gen de la distribución de 30 % y de 61 %. El clon J8 de KO H929 BCMA es una línea de KO heterocigótica con 2 copias de un gen de distribución igual a 50 %.

Figura 26. Perfiles de unión a células T primarias de BGCB491 en preparaciones de células de 7 donantes después de 1 hora de incubación a 37 °C. MFI: intensidad de fluorescencia media

10 **Figura 27.** Extrapolación de la curva de unión bioinformática representativa con el anticuerpo de control CD3B376xNull (GCDB381).

Figuras 28A-28B. Citotoxicidad celular (Figura 28B) y activación de células T (Figura 28B) mediadas por BGCB491 de líneas celulares dobles positivas para BCMA y GPRC5D y dobles negativas para BCMA y GPRC5D. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull, y CD3xNullxNull se añadieron a diversas concentraciones (0,00005 a 533,33 nM, eje X) en la presencia de células pan T de 6 donantes sanos (ident. de donante: 20063323, 20063309, 20062062, 20063310, 20062105 y 20061963) y bloqueador de Fc (2 mg/ml) y se incubaron durante 72 horas. La relación E:D óptima de 3:1 se evaluó en estos estudios (para la evaluación de la relación E:D ver las Figuras 33A-33B). Los gráficos se generaron usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. Los puntos de datos se alinearon estrechamente a lo largo de la curva de ajuste generada y se observó poca variabilidad entre los donantes de células T (se representaron

promedios de 6 donantes). En la Figura 28A, la muerte de células diana se midió y se expresó como porcentaje de citotoxicidad en el eje Y. En la Figura 28B, la activación de células T se midió como porcentaje de células T CD25+CD3+.

Figura 29. Citotoxicidad celular clonal de KO CRISPR H929 y activación de células T mediadas por BGCB491. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull se añadieron a diversas concentraciones (0,00005 a 533,33 nM, eje X) en la presencia de células pan T de 4 donantes sanos (ident. de donante: 20063323, 20063309, 20062062 y 20063310) y bloqueador de Fc (2 mg/ml) y se incubaron durante 72 horas. La relación E:D de 3:1 se probó en estos estudios. Los gráficos se generaron usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. Los puntos de datos se alinearon estrechamente a lo largo de la curva de ajuste generada y se observó poca variabilidad entre los donantes de células T (se representaron promedios de 4 donantes). La muerte de células diana se midió y se expresó como porcentaje de citotoxicidad en la fila superior y la activación de células T medida como porcentaje de CD25 que expresa células positivas para CD3 se mostró en la fila inferior (eje Y).

Figura 30. Citotoxicidad de células diana mediada por BGCB491 en sangre entera enriquecida con células de MM H929 (ensayo MABEL). MABEL, nivel de efecto biológico esperado mínimo. El BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull se añadieron a diversas concentraciones (0,00005 a 533,33 nM, eje X) a sangre entera de 7 donantes sanos (ident. de donante: 10145, 10403, 10420, 10083, 10463, 10493 y 10145; fuente de células T) en presencia de células de mieloma diana H929 a una relación E:D ajustada de 5:1 durante 48 horas. Los

gráficos se generaron usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. Los puntos de datos se alinearon estrechamente a lo largo de la curva de ajuste generada y se observó poca variabilidad entre los donantes de células T (se representaron promedios de 7 donantes). La muerte de células diana se midió y se expresó como porcentaje de citotoxicidad y la activación de células T se midió como porcentaje de células positivas para CD25 y CD3. En este experimento, se probaron teclistamab y talquetamab como controles positivos.

Figura 31. Perfiles de citocinas de BGCB491 del ensayo MABEL. MSD, descubrimiento de mesoescala. BGCB491, BCMAxGPC5DxNull y CD3xNullxNull se añadieron a diversas concentraciones (0,00005 a 533,33 nM, eje X) a sangre entera de 3 donantes sanos. Los sobrenadantes de células H929 del experimento de citotoxicidad anterior (Figura 7; 3 donantes de células T: Ident. del donante: 10083, 10463 y 10493) se recolectaron y se analizaron para determinar los niveles de citocinas usando un ensayo multiplex basado en MSD (cat. núm. K15049D). Los niveles de citocinas se midieron como pg/ml. Los gráficos se generaron usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. Los puntos de datos se alinearon estrechamente a lo largo de la curva de ajuste generada y se observó poca variabilidad entre los donantes de células T (se representaron promedios de 3 donantes). En este experimento, se probaron teclistamab y talquetamab como controles positivos.

Figura 32. Potencia citotóxica de BGCB491 frente a las células positivas para CD138 de MM primarias humanas. MNC, célula mononuclear. Se usaron células mononucleares derivadas de la médula ósea congeladas de 4 pacientes con

mieloma diferente (MNC de BM de MM 626, 649, 652 y 653) para evaluar la reducción de células plasmáticas (fila superior) y el potencial de activación de células T (fila inferior) con BGCB491. Células T de un donante sano normal (ident. de donante: 20063309) se añadieron exógenamente a las muestras de MNC de BM (relación E:D de 1:1) del paciente y se incubaron con BGCB491, CD3xNullxNull, teclistamab o talquetamab (0,00005 a 533,33 nM, eje X) durante 48 horas. Se observó la pérdida de células plasmáticas vivas (positivas para CD138) y la regulación ascendente concomitante de CD25 en las células T en respuesta al tratamiento con BGCB491. Se observó variabilidad en el recuento total inicial de células plasmáticas entre los donantes. Se enumeran los valores de densidad de receptores diana individuales y el porcentaje de población positiva para diana.

Figuras 33A-33B. Potencial de citotoxicidad de BGCB491 a diversas relaciones E:D y tiempos de incubación (línea celular H929). (Figura 33A) BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull se probaron en presencia de células pan T de 1 donante sano (ident. de donante: 20063323) a 4 relaciones E:D diferentes (5:1, 3:1, 1:1 y 0,5:1) durante 72 horas. (Figura 33B) BGCB491 se probó a una relación E:D de 3:1 y 1:1 durante diversos puntos de tiempo (24 horas (círculo), 48 horas (triángulo hacia arriba), 72 horas (triángulo hacia abajo), 96 horas (hexágono), 120 horas (rombo), 144 horas (estrella) y 168 horas (cuadrado)) usando 4 donantes de células T diferentes (ident. de donante: 20062105, 20063309, 20061963 y 20063310). La muerte de células diana y la activación de células T se midieron y se expresaron como porcentaje de citotoxicidad y porcentaje de células T CD25+CD3+. Los gráficos se generaron

usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. Los puntos de datos se alinearon estrechamente a lo largo de la curva de ajuste generada y se observó poca variabilidad entre los donantes de células T. Se representó promedios de 1 (Figura 33A) y 4 (Figura 33B) donantes.

5 **Figuras 34A-34C.** Efecto de BGCB491 en la activación de células T en la ausencia de células diana. Se realizó un ensayo de activación de células T usando (Figura 34A) células T de 6 donantes sanos normales (ident. de donante: 20063323, 20063309, 20062062, 20063310, 20062105 y 20061963) o (Figura 34B) 6 muestras de sangre entera de donante normal (ident. de donante: 10274, 10402, 10427, 10470, 10500 y 10509). (Figura 34C) se midió la citotoxicidad no
10 específica para diversos subconjuntos. Se añadieron BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull a diversas concentraciones (0,00005 a 533,33 nM, eje X) durante (Figura 34A) 72 horas y (Figura 34B, 34C) 48 horas.

Figura 35. Eficacia antitumoral de BGCB491, teclistamab y talquetamab
15 en xenoinjertos subcutáneos (SC) de RPMI 8226 en ratones NSG humanizados con células T (Estudio A). KO, Knock-out; NSG, ratones gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg *Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*; PBS, solución salina regulada con fosfato; SEM, error estándar de la media A
20 los ratones NSG humanizados con células T que portaban tumores SC de RPMI 8226 establecidos se les administró por vía intraperitoneal (IP) dosis de BGCB491 a 0,1, 0,4, 1 y 2,5 mg/kg. El teclistamab se dosificó para vía IP a 0,4, 1 y 2,5 mg/kg. El talquetamab se dosificó para vía IP a 2,5 mg/kg. Los

tratamientos se administraron los días 19, 21, 25, 28, 31, 34, 38 y 41 (indicado por la línea negra debajo del eje X). El volumen de tumor se midió dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio de tumor $\pm$ SEM para cada grupo. Los datos se representaron gráficamente para cada grupo con al menos 70 % de los animales restantes en el estudio.

Figura 36. Eficacia antitumoral de BGCB491, teclistamab y talquetamab en xenoinjertos subcutáneos (SC) de KO H929 BCMA y KO H929 GPRC5D en ratones NSG humanizados con células T (estudio B). KO, Knock-out; NSG, ratones gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg *Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*; PBS, solución salina regulada con fosfato; SEM, error estándar de la media A los ratones NSG humanizados con células T que portaban tumores de KO H929 BCMA (flanco izquierdo) y KO H929 GPRC5D (flanco derecho) se les administró por vía intraperitoneal (IP) dosis de BGCB491 de 0,025, 0,1, 0,25 y 0,5 mg/kg. El teclistamab y talquetamab se administraron por vía IP en dosis de 0,1 y 0,25 mg/kg. Los tratamientos se administraron los días 1, 5, 9, 13, 16, 19 y 22 (indicado con la línea negra debajo del eje X). El volumen de tumor se midió dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio de tumor $\pm$ SEM para cada grupo. Los datos se representaron gráficamente para cada grupo con al menos 70 % de los animales restantes en el estudio.

Figuras 37-38. Concentración en suero de BGCB491 individual – Perfiles de tiempo después de una dosis intravenosa (IV) única de 0,5 mg/kg en monocynomolgus hembra (Figura 37) y modelo predicho (Figura 38). BQL, por debajo

del límite de cuantificación. Los puntos de datos con concentraciones por debajo de la concentración cuantificable más baja no se muestran en el gráfico.

Figuras 39A-39B. Concentración media (SD) de BGCB491 – Perfiles de tiempo después de una dosis única de BGCB491 en minicerdos masculinos y predicción de modelo. BQL, debajo del límite de cuantificación; DE, desviación estándar. Los puntos de datos con concentraciones por debajo de la concentración cuantificable más baja no se muestran en el gráfico. Grupo 1: Dosis = 0,01 mg/kg, administración subcutánea (SC). Grupo 2: Dosis = 0,1 mg/kg, SC. Grupo 3: Dosis = 0,1 mg/kg, IV.

Figura 40 Perfiles de unión cinética de BGCB463 en líneas de células WT H929 y WT MM.1R durante 24 horas de incubación a 37 °C. MFI: intensidad de fluorescencia media

Figura 41. BGCB491 se une a líneas celulares que expresan BCMA y GPRC5D endógenas. Geo, geométrica. Se añadieron BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull a diversas concentraciones (0,096 a 1000 nM, eje X) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los gráficos se generaron usando el software Prism 8 al ajustar modelos 4PL separados a los datos observados. La intensidad de unión se expresa como media geométrica (eje Y).

Figura 42. Citotoxicidad cinética y activación de células T de BGCB491 y CD3B2271 (control nulo) usando células T de 3 donantes de células T a relaciones E:D (Figura 42A) 1:1 y (Figura 42B) 1:3. La medición de CD25 en el sistema Incucyte es una medida del recuento de células T y la expresión de CD25 (intensidad integrada total). CD25 es un marcador tardío de la activación

de células T, típicamente detectable 24 horas después de la activación y alcanza su punto máximo aproximadamente las 96 horas. No necesariamente se alinea con la citotoxicidad con respecto al tiempo. El porcentaje de citólisis se calculó basada en la señal de proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) en los pocillos tratados frente a los no tratados.

Figura 43. Porcentaje de citólisis y activación de células T de BGCB491 y CD3B2271 (control nulo) en puntos de tiempo de 72, 93 y 120 horas a una relación de efector a diana (E:D) de 1:1.

Figura 44. Porcentaje de citólisis y activación de células T de BGCB491 y CD3B2271 (control nulo) en puntos de tiempo de 72, 93 y 120 horas a una relación E:D de 1:3.

Figura 45. Eficacia antitumoral de JNJ-79635322, teclistamab, y talquetamab en xenoinjertos subcutáneos de MM.1S en ratones NSG humanizados con células T (estudio C). NSG, gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*; PBS, solución salina regulada con fosfato; SEM, error estándar de la media A ratones NSG humanizados con células T que portaban tumores SC de MM.1S establecidos se les dosificó IP con BGCB491 de 0,025, 0,1, 0,5 y 1 mg/kg. El talquetamab se administró por vía IP en dosis de 0,025 y 0,1 mg/kg. El teclistamab se administró por vía IP en dosis de 0,1 y 0,5 mg/kg y los tratamientos se administraron los días 15, 19, 22, 26, 30, 34 y 37 (indicado por la línea negra debajo del eje X). El volumen del tumor se midió dos veces por semana y los resultados se

presentaron como el volumen tumoral medio $\pm$ SEM para cada grupo. Los datos se representaron gráficamente para cada grupo con al menos 70 % de los animales restantes en el estudio. Los animales se monitorearon después del tratamiento hasta que los signos de morbilidad relacionada con la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en inglés) se manifestaron, momento en el cual los animales se sacrificaron y el estudio concluyó el día 51.

Figuras 46A-46B. El anticuerpo principal para BCMA (BCMB519) demuestra una unión y citotoxicidad comparables a las de Teclistamab con propiedades biofísicas de scFv ideales.

Figuras 47. El anticuerpo principal para GPRC5D (GC5B680) demuestra una unión específica y mejorada en comparación con la de Talquetamab con propiedades biofísicas de scFv ideales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

Definiciones

Varios términos relacionados con aspectos de la descripción se usan en toda la especificación y las reivindicaciones. Se asignará a dichos términos su significado común en la técnica a menos que se indique de otra manera. Otros términos específicamente definidos se interpretarán de manera consistente con las definiciones proporcionadas en la presente descripción.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto determine claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células y lo similar.

El término “aproximadamente” como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y lo similar, se entiende que comprende las variaciones hasta $\pm 10\%$ del valor especificado, debido a que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, y así sucesivamente usados en la descripción y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente.” En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se describen en la siguiente especificación y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar de acuerdo con las propiedades deseadas que se pretenden obtener

mediante la presente invención. Al menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse en virtud del número de dígitos significativos reportados y al aplicar técnicas comunes de redondeo.

5 A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros establecidos para el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos que se describen en los ejemplos específicos se reportan de la manera más precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar
10 encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

 “Aislado” significa un componente biológico (tal como ácido nucleico, péptido o proteína) que se ha separado sustancialmente, producido separado de, o purificado fuera de los componentes biológicos de los organismos en los que el componente es de origen natural, es decir, otro ADN y ARN cromosómico
15 y extracromosómico, y proteínas. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se han “aislado” incluyen, por lo tanto, ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas “aislados” pueden ser parte de una composición y aún estar aislados si tal composición no es parte del entorno nativo del ácido nucleico, péptido o
20 proteína. El término abarca, además, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como los ácidos nucleicos químicamente sintetizados. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno “aislado”, como se usa en la presente descripción, se destina

para referirse a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tengan diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a BCMA está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a BCMA). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de BCMA o GPRC5D puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como los homólogos de especies de BCMA o GPRC5D).

“Polinucleótido”, mencionado como sinónimo de “molécula de ácido nucleico”, “nucleótidos” o “ácidos nucleicos”, se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. “Polinucleótido” incluye, sin limitación, ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido incluye, además, los ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Podrían realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo

tanto, “polinucleótido” abarca formas de polinucleótidos química, enzimática o metabólicamente modificadas como se encuentran, típicamente, en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células.

“Polinucleótido” abarca, además, cadenas de ácido nucleico relativamente cortas,
5 denominadas, frecuentemente, oligonucleótidos.

El significado de “sustancialmente lo mismo” puede diferir en dependencia del contexto en el que usa el término. Debido a la probabilidad de que la variación de secuencia natural exista entre las cadenas pesada y ligera y los genes que las codifican, se podría esperar encontrar cierto nivel de variación
10 dentro de las secuencias de aminoácidos o los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, con poco o ningún impacto en sus propiedades de unión únicas (p. ej., especificidad y afinidad). Tal expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como además al éxito evolutivo de las variaciones de la
15 secuencia de aminoácidos conservadora, lo que no altera de forma apreciable la naturaleza de la proteína codificada. En consecuencia, en el contexto de las secuencias de ácido nucleico, “sustancialmente lo mismo” significa al menos 65 % de identidad entre dos o más secuencias. Preferentemente, el término se refiere a al menos 70 % de identidad entre dos o más secuencias, con mayor
20 preferencia, al menos 75 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 80 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 85 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 90 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 91 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 92 % de identidad, con mayor

preferencia, al menos 93 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 94 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 95 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 96 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 97 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 98 % de identidad y, con mayor preferencia, al menos 99 % o más de identidad. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % homología = $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{núm. total de posiciones} \times 100$), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Solic. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado en el software ALIGN (versión 2.0), que usa una tabla de peso PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4. Adicionalmente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

El grado de variación que puede ocurrir dentro de la secuencia de aminoácido de una proteína sin tener un efecto sustancial sobre la función de la proteína es mucho más inferior que una secuencia de ácido nucleico, ya que los mismos principios de degeneración no aplican a las secuencias de aminoácidos. En consecuencia, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, “sustancialmente lo mismo” significa anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno

que tienen 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Otras modalidades incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, que tienen marco, supercóntigo u otras regiones no de unión que no comparten identidad

5 significativa con los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, pero incorporan una o más CDR u otras secuencias necesarias para conferir la unión que son 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a tales secuencias descritas en la presente descripción.

Un “clon” es una población de células derivadas de una sola célula o

10 ancestro común por mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable in vitro por muchas generaciones. En algunos ejemplos proporcionados en la presente descripción, las células se transforman al transfectar las células con ADN.

Los términos “expresar” y “producir” se usan en forma de sinónimo en la

15 presente descripción, y se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos comprenden la transcripción de un gen en ARN. Estos términos abarcan, además, la traducción de ARN en uno o más polipéptidos y abarcan, además, todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de origen natural. La expresión y producción de un anticuerpo o fragmento de unión

20 al antígeno de este puede ser dentro del citoplasma de la célula, o en el medio extracelular tal como el medio de crecimiento de un cultivo celular.

Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a cualquier éxito o marcas distintivas de éxito en la atenuación o mejoramiento de una lesión, patología o

afección, que incluyen cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como, abatimiento, remisión y disminución de los síntomas o hacer la afección más tolerable para el paciente, por medio de reducir el índice de degeneración o deterioro, hacer el punto final de la degeneración menos debilitante, mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto o prolongar la duración de la supervivencia. El tratamiento podría evaluarse mediante parámetros objetivos o subjetivos; que incluyen los resultados de un examen físico, examen neurológico o evaluaciones psiquiátricas.

Una “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo para BCMA x GPRC5D x CD3 puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género y el peso de los individuos, y la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es, además, una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente benéficos.

“Anticuerpo” se refiere a todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD, e IgY) que incluyen varias formas monoméricas, poliméricas y quiméricas a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales (mAb), y los polipéptidos similares a anticuerpos, tales como los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados están comprendidos específicamente en el término “anticuerpo”.

El término “brazo de unión al antígeno” se refiere a una porción de un anticuerpo que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno (p. ej., BCMA, GPRC5D o CD3) e incluye, opcionalmente, una o más regiones de anticuerpo (p. ej., dominio de Fc).

5 El término “fragmento de unión al antígeno” se refiere a un fragmento del brazo de unión al antígeno que contiene un dominio de unión al antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen los proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tales como técnicas de clivaje, de síntesis de péptidos, y recombinantes. Algunos fragmentos de unión al antígeno se componen de

10 porciones de anticuerpos intactos que retienen la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo parental. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender al menos una región variable (ya sea una región variable de cadena pesada o cadena ligera) o una o más CDR de un anticuerpo conocido para unirse a un antígeno particular. Los ejemplos de fragmentos de

15 unión al antígeno adecuados incluyen, sin limitarse a, diacuerpos y moléculas monocatenarias así como moléculas de Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc y Fv, anticuerpos monocatenarios (Sc), cadenas ligeras individuales de anticuerpo, cadenas pesadas individuales de anticuerpo, fusiones quiméricas entre cadenas o CDR de anticuerpo y otras proteínas, supercántigos de proteína, monómeros o dímeros de cadena

20 pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en la patente núm. WO2007059782, fragmentos bivalentes que comprenden dos

fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, y un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb (Ward y otros, Nature 341, 544-546 (1989)), que

5 consiste esencialmente en un dominio VH y se denomina, además, anticuerpos de dominios (Holt y otros; Trends Biotechnol. noviembre de 2003; 21(11):484-90); camélido o nanocuerpos (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. enero de 2005; 5(1):111-24); una región determinante de complementariedad aislada (CDR, por sus siglas en inglés), y lo similar. y anticuerpos triespecíficos formados a partir de

10 fragmentos de anticuerpo. Todos los isotipos de los anticuerpos pueden usarse para producir fragmentos de unión al antígeno. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden incluir marcos proteicos que no son anticuerpos que pueden incorporar los segmentos de polipéptidos en una orientación que confiere afinidad por un antígeno dado de interés, tales como los andamios de proteínas. Los

15 fragmentos de unión al antígeno pueden producirse de manera recombinante o producirse mediante clivaje enzimático o químico de anticuerpos intactos. La frase “un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este” podría usarse para indicar que un fragmento de unión al antígeno dado incorpora uno o más segmentos de aminoácidos del anticuerpo al que se hace referencia en la frase.

20 El término “dominio de unión al antígeno” se refiere a la estructura proteinácea de un brazo de unión al antígeno que exhibe afinidad de unión para un antígeno particular. Esta estructura proteinácea está mediada por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio de unión al antígeno.

El término “CDR” se refiere a una región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de la cual tres componen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres componen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen con la actividad funcional de una molécula de anticuerpos y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden andamiaje o regiones de marco. Los límites de CDR de definiciones exactas y las longitudes se someten a sistemas diferentes de clasificación y numeración. Por lo tanto, se puede hacer referencia a las CDR en la presente descripción mediante Kabat, Chothia, AbM, Contact o cualquier otra definición de límites. A pesar de diferenciarse en los límites, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de traslape en lo que constituye las denominadas “regiones hipervariables” dentro de las secuencias variables. Las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferenciarse, por lo tanto, en la longitud y las áreas de límites con respecto a la región de marco adyacente. Ver, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,” *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); y MacCallum et al., “Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography”, *J. Mol. Biol.* 262:732 (1996)), cada uno de los cuales se incorpora, en su totalidad, como referencia.

Típicamente, las CDR forman una estructura de bucle que puede clasificarse como una estructura canónica. El término “estructura canónica” se refiere a la

conformación de cadena principal que adoptan los bucles de unión a antígeno (CDR). Se ha descubierto, a partir de estudios estructurales comparativos, que cinco de los seis bucles de unión a antígenos tienen solamente un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica puede caracterizarse por los

5 ángulos de torsión de la cadena principal de polipéptidos. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de secuencias de aminoácidos en la mayoría de las partes de los bucles (Chothia et al., “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J. Mol. Biol.* 196:901

10 (1987); Chothia et al., “Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions”, *J. Mol. Biol.* 342:877 (1989); Martin y Thornton, “Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies,” *J. Mol. Biol.* 263:800 (1996)), cada uno de los cuales se incorpora, en su totalidad, como referencia. Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las

15 secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular se determina por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (es decir, fuera del bucle). La asignación a una clase canónica particular puede, por lo tanto, hacerse en base a la presencia de estos residuos de aminoácidos clave.

20 El término “polipéptido” se usa indistintamente con el término “proteína” y, en su sentido más amplio, se refiere a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidad, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra modalidad, la subunidad puede estar

unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se usa en la presente descripción, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y tanto isómeros ópticos D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina, comúnmente, un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina, comúnmente, un polipéptido o una proteína. Como se usa en la presente descripción, el término “Fc” se refiere al dominio de fragmento cristizable de un anticuerpo, que comprende dos regiones constantes de cadena pesada (CH), CH₂ y CH₃. En la presente descripción, los residuos de aminoácidos de la región Fc se numeran típicamente de acuerdo con el esquema de numeración de la UE (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969). Estos residuos pueden asignarse fácilmente de acuerdo con esquemas de numeración alternativos tales como los de IMGT y Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5.º edición - Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación del NIH núm. 91-3242, págs. 662, 680, 689 (1991)), como apreciaría fácilmente un experto en la técnica. Por ejemplo, L234 de acuerdo con la numeración de la UE también puede representarse como L247 de acuerdo con Kabat.

“Une específicamente específica” o “específicamente une” o derivados de esta, cuando se usa en el contexto de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, representa la unión a través de los dominios codificados por los genes de inmunoglobulinas o los genes de fragmentos de inmunoglobulinas a uno o más epítopos de una proteína de interés sin unirse, preferencialmente, a otras moléculas

en una muestra que contiene una población de moléculas mezcladas. Típicamente, un anticuerpo se une a un antígeno afín con una K_d menor que aproximadamente 1×10^{-8} M, según un ensayo de resonancia de plasmones superficiales o un ensayo de unión a células. Las frases tales como anticuerpo “específico para [antígeno]” (p. 5 ej., anticuerpo específico para BCMA) se refieren a que el anticuerpo mencionado se une específicamente al antígeno mencionado. Dondequiera que se use el término “se une” en la presente descripción, se prevé que este abarque “se une específicamente” y los términos pueden intercambiarse según se desee.

Como se usa en la presente descripción, el término “quimérico” se refiere 10 a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que tiene al menos alguna porción de al menos un dominio variable derivado de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero que no es humano, un roedor, o un reptil, mientras las porciones del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno de este, se derivan de un humano.

15 Un “vector” es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido, o virus en el que puede insertarse operativamente otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación o la expresión del segmento.

Como se usa en la presente descripción, el término “célula huésped” puede ser cualquier tipo de célula, por ejemplo, una célula primaria, una célula en 20 cultivo o una célula de una línea celular. En modalidades específicas, el término “célula huésped” se refiere a una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o la progenie potencial de una célula así. La progenie de una célula así puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la

molécula de ácido nucleico, por ejemplo, debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en generaciones posteriores o la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped. Los términos “expresión” y “producción” se usan como sinónimos en la presente descripción, y
5 se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos comprenden la transcripción de un gen en ARN. Estos términos abarcan, además, la traducción de ARN en uno o más polipéptidos y abarcan, además, todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de origen natural.

El término “sujeto” se refiere a animales humanos y no humanos, que
10 incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como los primates no humanos, ratones, conejos, carnero, perros, gatos, caballos, vacas, gallinas, anfibios, y reptiles. En muchas modalidades de los métodos descritos, el sujeto es un ser humano.

El término “redirigir” o “redireccionamiento”, como se usa en la presente
15 descripción, se refiere a la capacidad del anticuerpo para BCMA x GPRC5D x CD3 de hacer transitar efectivamente la actividad de las células T, desde su especificidad cognada inherente hacia la reactividad contra células que expresan GPRC5D y/o BCMA.

El término “muestra”, como se usa en la presente descripción, se refiere a
20 una colección de fluidos, células o tejidos similares (p. ej., tejido tumoral quirúrgicamente extirpado, biopsias, que incluyen la aspiración con aguja fina), aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. En algunas modalidades la muestra es un fluido biológico. Típicamente, los

fluidos biológicos son líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos de origen natural presentes en, extraídos de, expresados o, de cualquier otra manera, extraídos de un sujeto o fuente biológica. Ciertos fluidos biológicos derivados de tejidos, órganos o regiones localizadas particulares y otros fluidos biológicos pueden situarse de forma global o sistémica en un sujeto o fuente biológica. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, saliva, fluido cístico, gotas de lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosales de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, fluidos de ascitis tales como los asociados con tumores no sólidos, fluidos de la pleura, cavidad pericardial, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, fluidos recolectados mediante lavado bronquial, y lo similar. Los fluidos biológicos pueden incluir, además, soluciones líquidas puestas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo celular y de órganos que incluyen medio celular condicionado y de órganos, fluidos lavados, y lo similar. El término “muestra,” como se usa en la presente descripción, comprende los materiales retirados de un sujeto o materiales presentes en un sujeto. Los aspectos relevantes de la invención pueden realizarse *in vitro* basados en muestras aisladas según se requiera.

Un “estándar conocido” puede ser una solución que tiene una cantidad o concentración conocida de GPRC5D y/o BCMA, en donde la solución puede ser una solución de origen natural, tal como una muestra de un paciente que se conoce que tiene cáncer temprano, moderado, terminal, progresivo o estático, o la solución puede ser una solución sintética tal como agua regulada que tiene una cantidad conocida de GPRC5D y/o BCMA diluido en ella. Los estándares conocidos, descritos

en la presente descripción, pueden incluir GPRC5D y/o BCMA aislado de un sujeto, proteína de GPRC5D y/o BCMA recombinante o purificada, o un valor de concentración de GPRC5D y/o BCMA asociado con una condición de enfermedad.

Los términos “antígeno de maduración de células B” y “BCMA”, como se
5 usan en la presente descripción, incluyen el antígeno de maduración de células B humanas, también conocido como BCMA, CD269 y TNFRSF17 (Uniprot Q02223), que es un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral, que se expresa preferentemente en células plasmáticas diferenciadas. El dominio extracelular del BCMA humano consiste, de acuerdo con UniProt, en
10 los aminoácidos 1 - 54 (o 5-51). El término “anticuerpo contra el BCMA, anticuerpo anti-BCMA”, como se usa en la presente descripción, se relaciona con un anticuerpo que se une específicamente al BCMA .

Los términos “miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G” y “GPRC5D” incluyen específicamente la proteína
15 GPRC5D humana, por ejemplo, como se describe en el acceso a GenBank núm. BC069341, secuencia de referencia de NCBI: NP_061124.1 y núm. de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZD1 (ver, además, Brauner-Osborne, H. et al. 2001, Biochim. Biophys. Acta 1518, 237-248).

Los términos “determinante de grupo 3” y “CD3” incluyen el complejo de
20 múltiples subunidades de la proteína CD3 humana. El complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 se compone de 6 cadenas polipeptídicas distintivas. Estas incluyen una cadena CD3 γ (SwissProt P09693), una cadena CD3 δ (SwissProt P04234), dos cadenas CD3 ϵ (SwissProt P07766), y un

homodímero de la cadena de CD3 ζ (SwissProt 20963), y que se asocia con la cadena α y β del receptor de células T. El término “CD3” incluye cualquier variante, isoforma y especie homóloga de CD3 que se expresa de forma natural por las células (que incluyen las células T) o puede expresarse en células transfectadas
 5 con los genes o ADNc que codifican los polipéptidos, a menos que se indique.

Un “anticuerpo para BCMA x GPRC5D x CD3” es un anticuerpo multiespecífico, opcionalmente un anticuerpo trispecífico, que comprende tres brazos de unión al antígeno diferentes, uno de los cuales se une al antígeno BCMA, otro de los cuales se une al antígeno de GPRC5D y otro más de los cuales
 10 se une al CD3. Un “anticuerpo para BCMA x CD3” es un anticuerpo multiespecífico, opcionalmente un anticuerpo biespecífico, que comprende dos brazos de unión al antígeno diferentes, uno de los cuales se une específicamente al antígeno BCMA y otro de los cuales se une al CD3. Un “anticuerpo para GPRC5D x CD3” es un anticuerpo multiespecífico, opcionalmente un anticuerpo biespecífico,
 15 que comprende dos brazos de unión del antígeno diferentes, uno de los cuales se une al antígeno GPRC5D y otro de los cuales se une al CD3. El término “anticuerpo multiespecífico” se usa en la presente descripción en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Los anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que
 20 comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H donde cada unidad V_HV_L se une a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables

únicos con cada dominio variable único que se une a un epítipo diferente, anticuerpos en toda su extensión y anticuerpos que comprenden uno o más fragmentos de anticuerpo así como anticuerpos que comprenden fragmentos de anticuerpo que se han unido covalentemente o no covalentemente.

5 Un anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo triespecífico o una molécula similar (ver, por ejemplo, *PNAS USA* 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). Los anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos, diacuerpos, y lo similar, que se proporcionan en la presente descripción pueden unirse a cualquier diana
10 adecuada además de a una porción de BCMA o GPRC5D. El término “anticuerpo biespecífico” debe entenderse como un anticuerpo que tiene dos brazos de unión al antígeno diferentes definidos por secuencias de anticuerpo diferentes. El término “anticuerpo triespecífico” debe entenderse como un anticuerpo que tiene tres brazos de unión al antígeno diferentes definidos por secuencias de anticuerpo
15 diferentes. Esto debe entenderse como unión a objetivo diferente pero incluye, además, la unión a epítopos diferentes en un objetivo.

Una “muestra de referencia” es una muestra que puede compararse contra otra muestra, tal como una muestra de prueba, para permitir la caracterización de la muestra comparada. La muestra de referencia tendrá
20 alguna propiedad caracterizada que sirve como la base para la comparación con la muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de referencia puede usarse como un punto de referencia para los niveles de GPRC5D o BCMA que son indicativos de que un sujeto tiene cáncer. La muestra de referencia no

necesariamente tiene que analizarse en paralelo con la muestra de prueba; por lo tanto, en algunos ejemplos la muestra de referencia puede ser un valor o rango numérico determinado previamente para caracterizar una condición dada, tal como los niveles de GPRC5D o BCMA, que son indicativos de cáncer en un sujeto. El término también incluye muestras usadas para propósitos comparativos que se conoce que están asociadas con un estado o condición de enfermedad fisiológica, tal como el cáncer que expresa GPRC5D o BCMA, pero que tienen una cantidad desconocida de GPRC5D o BCMA.

“Recaída” se refiere al regreso de una enfermedad o los signos y síntomas de una enfermedad después de un período de mejora después del tratamiento previo con un agente terapéutico.

“Refractario” se refiere a una enfermedad que no responde a un tratamiento. Una enfermedad refractaria puede ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del tratamiento, o una enfermedad refractaria puede volverse resistente durante un tratamiento.

El término “progresión”, como se usa en el contexto de progresión del cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA, incluye el cambio de un cáncer de un estado menos severo a uno más severo. Este puede incluir un aumento en el número o severidad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que crece o se expande el cáncer, y lo similar. Por ejemplo, “la progresión del cáncer de colon” incluye la progresión del cáncer desde un estado menos severo hasta uno más severo, tal como la progresión desde la etapa I hasta la etapa II, desde la etapa II hasta la etapa III, etc.

El término “regresión”, como se usa en el contexto de regresión del cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA, incluye el cambio de un cáncer de un estado más severo a uno menos severo. Esto podría incluir una disminución en el número o severidad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer crece o se expande, y lo similar. Por ejemplo, “el retroceso del
5 cáncer de colon” incluye el retroceso de un cáncer desde un estado más severo hasta uno menos severo, tal como la progresión desde la etapa III hasta la etapa II, desde la etapa II hasta la etapa I, etc.

El término “estable”, como se usa en el contexto de cáncer estable que
10 expresa GPRC5D y/o BCMA, pretende describir una condición de enfermedad que no cambia o no ha cambiado significativamente lo suficiente durante un período de tiempo relevante para que un cáncer se considere progresivo o en regresión.

Las modalidades descritas en la presente descripción no son limitantes para métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos
15 particulares que pueden, por supuesto, variar.

Anticuerpos multiespecíficos

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos multiespecíficos que se unen a BCMA, GPRC5D y CD3, y fragmentos de unión trispecíficos de
20 estos. Tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden permitir un direccionamiento más específico a subconjuntos particulares de células en comparación con los anticuerpos dirigidos solamente a una o dos de estas dianas.

Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la elaboración de una molécula que comprende un primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3, un segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D, y un tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA. Los brazos de unión al antígeno

5 pueden tener cualquier forma que permita el reconocimiento específico de la diana, por ejemplo, el brazo de unión puede ser o puede incluir un dominio variable de cadena pesada, un Fv (combinación de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera), un Fv monocatenario (scFv), un Fab, un dominio de unión basado en un dominio tipo III de

10 fibronectina (tal como de fibronectina, o basado en un consenso de los dominios tipo III de fibronectina, o de tenascina o basado en un consenso de los dominios tipo III de tenascina, tales como las moléculas de Centyrin de Janssen Biotech, Inc., ver, *p. ej.*, las patentes núms. WO2010/051274 y WO2010/093627). En ciertas modalidades, el anticuerpo triespecífico comprende tres brazos de unión

15 al antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo triespecífico comprende un anticuerpo (*p. ej.*, en formato de IgG) al cual se fusiona un brazo de unión al antígeno adicional, *p. ej.*, en la forma de un fragmento variable monocatenario, *p. ej.*, en el extremo N-terminal o extremo C-terminal de una de las cadenas pesadas o una de las cadenas ligeras del anticuerpo.

20 En consecuencia, se proporcionan moléculas triespecíficas que comprenden tres brazos de unión al antígeno diferentes que se unen a BCMA, GPRC5D y CD3, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende

- (a) un primer brazo de unión al antígeno que comprende un primer dominio variable de cadena pesada (VH1) y un primer dominio variable de cadena ligera (VL1);
- 5 (b) un segundo brazo de unión al antígeno que comprende un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2); y
- (c) un tercer brazo de unión al antígeno que comprende un tercer dominio variable de la cadena pesada (VH3) y un tercer dominio variable de la cadena
- 10 ligera (VL3).

En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en CD3, el segundo brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en GPRC5D, y el tercer brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en BCMA.

- En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno que se une a
- 15 CD3 comprende una HCDR 1, una HCDR2 y una HCDR3 del VH1 de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 del VL1 de la sec. con núm. de ident.: 7. En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende una HCDR1 que comprende la secuencia
- 20 de aminoácidos de GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6). En algunas modalidades, el primer brazo

de unión al antígeno que se une a CD3 comprende una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3). En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende el VH1 de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende el VL1 de la sec. Con núm. de ident.: 7.

En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 del VH2 de la sec. con núm. de ident.: 16. En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 del VL2 de la sec. con núm. de ident.: 15. En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLTNIRMSVS (sec. con núm. de ident.: 12), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de HIFSNDEKS (sec. con núm. de ident.: 13), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de MRLPYGMDV (sec. con núm. de ident.: 14). En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RSSQSLVHSDGNTYLS (sec. con núm. de ident.: 9), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KISNRFF (sec. con núm. de ident.: 10), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de MQATQFPHT

(sec. con núm. de ident.: 11). En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el VH1 de la sec. con núm. de ident.: 16. En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el VL1 de la sec. con núm. de ident.: 15.

5 En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 del VH3 de la sec. con núm. de ident.: 24. En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 del VL3 de la sec. con núm. de ident.: 23. En algunas modalidades, el tercer brazo de

10 unión al antígeno que se une a BCMA comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm. de ident.: 21), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22); y una LCDR1 que

15 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17) En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT (sec. con núm. de ident.: 18), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHYGSSPMYT (sec. con núm. de

20 ident.: 19). En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende el VH1 de la sec. con núm. de ident.: 24. En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende el VL1 de la sec. con núm. de ident.: 23.

En algunas modalidades, el VH1 y VL1 del brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo de CD3 están presentes en un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds).

5 En algunas modalidades, el VH2 y VL2 del brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo de GPRC5D están presentes en un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds).

10 En algunas modalidades, el VH3 y VL3 del brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo de BCMA están presentes en un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds).

En algunas modalidades, el primer brazo de unión al antígeno del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una primera
 15 porción de cadena pesada (HC1) que comprende el VH1 y una porción de cadena ligera (LC) que comprende el VL1, en donde el VH1 y VL1 se acoplan para formar un primer dominio de unión al antígeno que se une a un primer antígeno. En algunas modalidades, la HC1 comprende, del extremo N-terminal al extremo C-terminal, el VH1, un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un
 20 primer dominio de Fc. En algunas modalidades, el VH1 y CH1 de la HC1 junto con la LC forman un dominio de fragmento de unión al antígeno (Fab).

En algunas modalidades, el VH1 del primer brazo de unión al antígeno se acopla al VH3 del tercer brazo de unión al antígeno a través del primer dominio de

Fc. En algunas modalidades, el primer dominio de Fc del primer brazo de unión al antígeno se acopla, a través de un primer enlazador (L1), al tercer brazo de unión al antígeno, para de esta manera formar un primer y tercer brazo de unión al antígeno acoplados. El primer y tercer brazo de unión al antígeno acoplados
5 pueden comprender, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el VH1, el dominio CH1 y el dominio de Fc del primer brazo de unión al antígeno, el primer enlazador y el tercer brazo de unión al antígeno. En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv) formado a partir del VH3 y VL3 del tercer brazo de unión al antígeno.

10 En algunas modalidades, el segundo brazo de unión al antígeno del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una segunda porción de cadena pesada (HC2) que comprende el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) que forma un segundo dominio de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el
15 segundo brazo de unión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, un fragmento variable monocatenario (scFv) formado a partir del VH2 y VL2, y un segundo dominio de Fc.

En algunas modalidades, el VH2 del segundo brazo de unión al antígeno se acopla al VH3 del tercer brazo de unión al antígeno a través del segundo
20 dominio de Fc. En algunas modalidades, el segundo dominio de Fc del segundo brazo de unión al antígeno se acopla, a través de un enlazador, al tercer brazo de unión al antígeno, para de esta manera formar un segundo y tercer brazo de unión al antígeno acoplados. El segundo y tercer brazos de unión al antígeno

acoplados pueden comprender, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el segundo dominio de Fc, el primer enlazador y el tercer brazo de unión al antígeno. En algunas modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv) formado a partir del VH3 y VL3
 5 del tercer brazo de unión al antígeno.

En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es un anticuerpo triespecífico que comprende un brazo específico para CD3 que comprende una primera porción de la cadena pesada (HC1) que comprende el VH1 y una porción de la cadena ligera (LC) que
 10 comprende el VL1. Los dominios VH1 y VL1 se acoplan para formar un primer dominio de unión al antígeno que se une al CD3. El segundo brazo de unión al antígeno del anticuerpo triespecífico comprende una segunda porción de cadena pesada (HC2) con el VH2 que forma el segundo dominio de unión a antígeno que se une al segundo antígeno. La HC1 del brazo de unión específico para CD3 o la
 15 HC2 del segundo brazo de unión al antígeno se acopla al tercer brazo de unión al antígeno que comprende el dominio VH3, que forma el tercer dominio de unión al antígeno que se une al tercer antígeno. En algunas modalidades, el segundo antígeno es BCMA, y el tercer antígeno es GPRC5D. En algunas modalidades, el segundo antígeno es GPRC5D y el tercer antígeno es BCMA.

20 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es un anticuerpo triespecífico que comprende un brazo de unión específico para CD3 que comprende la HC1 con el VH1 y la LC con el VL1. El VH1 y VL1 se acoplan para formar el primer dominio de unión al antígeno específico para CD3 que se une

al CD3. El segundo brazo de unión al antígeno comprende el VH2 y VL2 que forman el segundo dominio de unión al antígeno que se une al GPRC5D. El tercer brazo de unión al antígeno se acopla al segundo brazo de unión al antígeno y comprende el VH3 y VL3 que forman el tercer dominio de unión al antígeno que se une al BCMA.

5 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es un anticuerpo triespecífico que comprende un brazo de unión específico para CD3 que comprende la HC1 con el VH1 y la LC con el VL1. El VH1 y VL1 se acoplan para formar el primer dominio de unión al antígeno específico para CD3 que se une al CD3. El segundo brazo de unión al antígeno comprende el
10 VH2 y VL2 que forman el segundo dominio de unión al antígeno que se une al BCMA. El tercer brazo de unión al antígeno se acopla al segundo brazo de unión al antígeno y comprende el VH3 y VL3 que forman el tercer dominio de unión al antígeno que se une al GPRC5D.

 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x
15 CD3 es un anticuerpo triespecífico que comprende un brazo de unión específico para CD3 que comprende la HC1 con el VH1 y la LC con el VL1. El VH1 y VL1 se acoplan para formar el primer dominio de unión al antígeno específico para CD3 que se une al CD3. El segundo brazo de unión al antígeno comprende el VH2 y VL2 que forman el segundo dominio de unión al antígeno que se une al
20 GPRC5D. El tercer brazo de unión al antígeno se acopla al primer brazo de unión al antígeno específico para CD3 y comprende el VH3 y VL3 que forman el tercer dominio de unión al antígeno que se une al BCMA.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es un anticuerpo trispecífico que comprende un brazo de unión específico para CD3 que comprende la HC1 con el VH1 y la LC con el VL1. El VH1 y VL1 se acoplan para formar el primer dominio de unión al antígeno específico para CD3 que se une al CD3. El segundo brazo de unión al antígeno comprende el VH2 y VL2 que forman el segundo dominio de unión al antígeno que se une al BCMA. El tercer brazo de unión al antígeno se acopla al primer brazo de unión al antígeno específico para CD3 y comprende el VH3 y VL3 que forman el tercer dominio de unión al antígeno que se une al GPRC5D.

En algunas modalidades, la HC1 con el VH1 y la LC con los dominios VL1 del primer brazo de unión al antígeno forman un fragmento de unión al antígeno (Fab) que comprende el primer dominio de unión al antígeno. En algunas modalidades, el VH2 y VL2 del segundo brazo de unión al antígeno forman un fragmento variable monocatenario (scFv) que comprende el segundo dominio de unión al antígeno. En algunas modalidades, el VH3 y VL3 del tercer brazo de unión al antígeno forman un fragmento variable monocatenario (scFv) que comprende el tercer dominio de unión al antígeno.

En una modalidad, el brazo de unión a CD3 comprende un fragmento de unión al antígeno (Fab), el brazo de unión al BCMA comprende un fragmento variable monocatenario (scFv), y el brazo de unión al GPRC5D comprende un fragmento variable monocatenario (scFv).

En una modalidad, el brazo de unión a CD3 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv), el brazo de unión al BCMA comprende un

fragmento de unión al antígeno (Fab), y el brazo de unión al GPRC5D comprende un fragmento variable de cadena única (scFv).

En una modalidad, el brazo de unión a CD3 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv), el brazo de unión al BCMA comprende un
5 fragmento variable de cadena única (scFv), y el brazo de unión al GPRC5D comprende un fragmento de unión al antígeno (Fab).

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 del anticuerpo trispecífico comprende la HC1 y la LC. La HC1 puede comprender regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3) y el VH1. La LC puede comprender el VL1. El
10 VH1 y VL1 se combinan para formar el dominio de unión al antígeno CD3.

En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D del anticuerpo trispecífico comprende la HC2. La HC2 puede comprender regiones constantes de cadena pesada (CH2 y CH3), y un fragmento variable monocatenario (scFv) unido al extremo N-terminal de la región CH2, en donde el scFv comprende el
15 dominio de unión al antígeno GPRC5D.

En algunas modalidades, el anticuerpo trispecífico comprende además el brazo de unión al antígeno BCMA unido al extremo C-terminal de la región CH3 del brazo de unión al GPRC5D para formar un brazo de unión al GPRC5D/BCMA. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno BCMA comprende un segundo
20 fragmento variable de cadena única (scFv). En algunas modalidades, el brazo para GPRC5D/BCMA puede tener la estructura: scFv que contiene el dominio de unión al GPRC5D, las regiones CH2 y CH3, scFv que contiene el dominio de unión al BCMA.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 del anticuerpo triespecífico comprende la HC1 y la LC. La HC1 puede comprender regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3) y el VH1. La LC puede comprender el VL1. El VH1 y VL1 se combinan para formar el dominio de unión al antígeno CD3.

5 En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA del anticuerpo triespecífico comprende la HC2. La HC2 puede comprender regiones constantes de la cadena pesada (CH2 y CH3) y un fragmento variable de cadena única (scFv) unido al extremo N-terminal de la región CH2, en donde el scFv comprende el dominio de unión al antígeno BCMA.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo triespecífico comprende además el brazo de unión al antígeno GPRC5D unido al extremo C-terminal de la región CH3 del brazo de unión a CD3 para formar un brazo de unión a CD3/GPRC5D. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno BCMA comprende un segundo fragmento variable de cadena única (scFv). En algunas modalidades, el brazo para
15 CD3/GPRC5D puede tener la estructura: Fab que contiene el dominio de unión a CD3, regiones CH2 y CH3, scFv que contiene el dominio de unión al GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de la invención incluyen los anticuerpos que tienen una estructura de anticuerpo en toda su extensión. Un “anticuerpo en toda su extensión” como se usa en la presente
20 descripción se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas del anticuerpo en toda su extensión y dos cadenas ligeras del anticuerpo en toda su extensión. Una cadena pesada completa (HC) del anticuerpo incluye los dominios variables y constantes de la cadena pesada VH, CH1, CH2, y CH3. Una cadena

ligera del anticuerpo en toda su extensión (LC) incluye los dominios variables y constantes de la cadena ligera VL y CL. El anticuerpo en toda su extensión puede carecer de la lisina (K) del extremo C-terminal lo mismo en una que en ambas cadenas pesadas. El término “brazo Fab” o “media molécula” se refiere a un par
 5 de cadena pesada y cadena ligera que se une específicamente a un antígeno. En algunas modalidades, uno de los dominios de unión al antígeno es un dominio de unión que no se basa en un anticuerpo, *por ejemplo*, un dominio de unión que se basa en un dominio de fibronectina tipo 3, *por ejemplo*, Centyrin.

Brazo de unión al BCMA

10 El anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción comprende un brazo de unión al antígeno específico para BCMA. En algunas modalidades, el brazo unión al BCMA se une al BCMA humano. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA humano y/o al BCMA de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA
 15 se une al BCMA humano pero no al BCMA de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA se une a un epítipo que incluye uno o más residuos del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) del BCMA. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA se une a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

20 Los brazos de unión al BCMA pueden unirse al BCMA con una afinidad de 5×10^{-7} M o menor, tal como 1×10^{-7} M o menor, 5×10^{-8} M o menor, 1×10^{-8} M o menor, 5×10^{-9} M o menor, o 1×10^{-9} M, o 5×10^{-10} o menor. En una modalidad, el brazo de unión a BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente

1 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ a $1 \times 10^{-7} \text{M}$ En una modalidad, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $2 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $3 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $4 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $5 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $6 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $7 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $8 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $9 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $2 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $3 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $4 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $5 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $6 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $7 \times 10^{-9} \text{M}$, aproximadamente $8 \times 10^{-9} \text{M}$, o aproximadamente $9 \times 10^{-9} \text{M}$. En una modalidad, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} a $5 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente 1×10^{-10} a $8 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente 2×10^{-10} a $9 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente 3×10^{-10} a $10 \times 10^{-10} \text{M}$, aproximadamente 4×10^{-10} a $10 \times 10^{-10} \text{M}$, o aproximadamente 5×10^{-10} a $10 \times 10^{-10} \text{M}$. En una modalidad, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente $8,4 \times 10^{-10} \text{M}$ según lo determinado por un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR). En una modalidad, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente $2,1 \times 10^{-10} \text{M}$ según lo determinado por un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR).

La Tabla 1 proporciona una síntesis de los ejemplos de algunos anticuerpos específicos para BCMA descritos en la presente descripción:

Tabla 1. Secuencias de CDR de mAb ilustrativos generados para actuar contra el BCMA humano

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB519	GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.:20)	AISGSGGST Y (sec. con núm. de ident.:21)	DEGYSSGHY YGMDV (sec. con núm. de ident.:22)	RASQSISSSF LT (sec. con núm. de ident.:17)	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:18)	QHYGSSPMYT (sec. con núm. de ident.:19)
BCMB69	SGSYFWG (sec. con núm. de ident.:32)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:33)	HDGAVAGLF DY (sec. con núm. de ident.:34)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB117	SGSYFWG (sec. con núm. de ident.:32)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:33)	HDGAVAGLF DY (sec. con núm. de ident.:34)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB123	SSSYFWG (sec. con núm. de ident.:38)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:33)	HDGAVAGLF DY (sec. con núm. de ident.:34)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB128	SGSYFWG (sec. con núm. de ident.:32)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:33)	HDGATAGLF DY (sec. con núm. de ident.:37)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB129	SGSYFWG (sec. con núm. de ident.:32)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:36)	HDGAVAGLF DY (sec. con núm. de ident.:34)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB176	SSSYFWG (sec. con núm. de ident.:38)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:33)	HDGATAGLF DY (sec. con núm. de ident.:37)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)
BCMB177	SSSYFWG (sec. con núm. de ident.:38)	SIYYSGITYY NPSLKS (sec. con núm. de ident.:164)	HDGATAGLF DY (sec. con núm. de ident.:37)	GGNNIGSKS VH (sec. con núm. de ident.:39)	DDSDRPS (sec. con núm. de ident.:40)	QVWDSSSDHV V (sec. con núm. de ident.:41)

Las características de algunos anticuerpos específicos para BCMA o fragmentos de unión al antígeno pueden encontrarse, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 10.072.088, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la

- Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio
- 5 variable de la cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA compite por la
- 10 unión al BCMA con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR1 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR1 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.
- 15 En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de
- 20 los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y

una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del clon BCMB519, BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 o BCMB177. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 o BCMB177. En una modalidad, el brazo de unión al BCMA comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon BCMB519.

En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de la cadena pesada derivado de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera derivados del clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera del clon BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176 o BCMB177. En una modalidad, el brazo de unión al BCMA comprende el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera del clon BCMB519.

En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 20, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 21, y una CDR3 de

cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 22. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 20, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 21, una CDR3 de cadena pesada que

5 comprende la sec. con núm. de ident.: 22, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 19. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de

10 unión a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 24. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 24 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 23.

15 En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada

20 que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que

comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente
5 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1
10 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de cadena pesada que
15 comprende la sec. con núm. de ident.: 33, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA puede
20 comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente

igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de
 5 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 37. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, una CDR3 de cadena pesada que
 10 comprende la sec. con núm. de ident.: 37, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de
 15 unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 44. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 44 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

20 En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 36, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34. En algunas

modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 32, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 36, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 34, una CDR1 de cadena ligera que

5 comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA comprende secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o

10 idéntico a la sec. con núm. de ident.: 45. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 45 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1

15 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 33, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 37. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de cadena pesada que

20 comprende la sec. con núm. de ident.: 33, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 37, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que

comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 46. En algunas modalidades, el brazo de
5 unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 46 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de
10 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 164, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 37. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 38, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 164, una CDR3 de cadena pesada que
15 comprende la sec. con núm. de ident.: 37, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 39, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 40, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 41. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de
20 unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 47. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente

igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 47 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 48.

El brazo de unión al BCMA puede derivarse de cualquier especie mediante medios recombinantes. Por ejemplo, el brazo de unión al antígeno BCMA puede derivarse de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovinos, gallina, conejo, camélido, asno, humano, o versiones quiméricas de estos. Para el uso en la administración a humanos, los fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos después de la administración a un paciente humano. En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende fragmentos de unión al antígeno que es quimérico.

En algunas modalidades, el brazo de unión al BCMA comprende fragmentos de unión al antígeno humanizados. Los fragmentos de unión al antígeno humanizados pueden derivarse de inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina que no es humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) o fragmentos de unión al antígeno cuyos residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Generalmente, los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpo humanizado comprenderán sustancialmente la totalidad de al menos uno,

y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpo humanizado pueden incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

Brazo de unión a GPRC5D

El anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción comprende un brazo de unión al antígeno específico para GPRC5D. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D se une al GPRC5D humano. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D se une al GPRC5D humano y al GPRC5D de mono cynomolgus, preferentemente al dominio extracelular de este. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D se une al GPRC5D humano pero no al GPRC5D de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D se une a uno o más residuos de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 116.

La Tabla 2 proporciona una síntesis de los ejemplos de algunos anticuerpos específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción:

Tabla 2. Secuencias de CDR de mAb ilustrativos generados para actuar contra el GPRC5D humano

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B680	GFSLTNIRMS VS (sec. con	HIFSNDEKS	MRLPYGMDV	RSSQSLVHS DGNTYLS (sec. con	KISNRFF (sec. con	MQATQFPHT (sec. con

	núm. de ident.:12)	(sec. con núm. de ident.: 13)	(sec. con núm. de ident.: 14)	núm. de ident.:9)	núm. de ident.:10)	núm. de ident.:11)
GC5B81	SYAIS (sec. con núm. de ident.:49)	GIIPFGTANY AQKFQG (sec. con núm. de ident.:53)	ESRWRGYKL D (sec. con núm. de ident.:57)	RASQSISSYL N (sec. con núm. de ident.:61)	AASSLQS (sec. con núm. de ident.:64)	QQSYSTPLT (sec. con núm. de ident.:67)
GC5B597 de GC5B465 GC5B598	NYWMS (sec. con núm. de ident.:50)	GISYSGGSK YYASSVKG (sec. con núm. de ident.:54)	AAFDGRRRA VRLD (sec. con núm. de ident.:58)	RASQSISSYL N (sec. con núm. de ident.:61)	AASSLQS (sec. con núm. de ident.:64)	QQSYSTPLT (sec. con núm. de ident.:67)
GC5B599 de GC5B483	SYFIG (sec. con núm. de ident.:51)	IIPGKSDTR YSPSFQG (sec. con núm. de ident.:55)	VYSFGGRHK ALFDY (sec. con núm. de ident.:59)	RASQSVSSYL A (sec. con núm. de ident.:62)	DASNRAT (sec. con núm. de ident.:65)	QQRSNWPLT (sec. con núm. de ident.:68)
GC5B596	GYTMN (sec. con núm. de ident.:52)	LINPYNSDTN YAQKLQG (sec. con núm. de ident.:56)	VALRVALDY (sec. con núm. de ident.:60)	KASQNVATH VG (sec. con núm. de ident.:63)	SASYRYS (sec. con núm. de ident.:66)	QQYNRYPYT (sec. con núm. de ident.:69)
GC5B382	DYGMH (sec. con núm. de ident.:70)	AIKYSGGSTY YADSVKG (sec. con núm. de ident.:77)	RAESGPGLD Y (sec. con núm. de ident.:84)	KSSQSVLYS SNNKNYLA (sec. con núm. de ident.:91)	WASTRES (sec. con núm. de ident.:93)	QQYYSTPLT (sec. con núm. de ident.:95)
GC5B379	NYWMS (sec. con núm. de ident.:50)	GISYSGGSK YYADSVKG (sec. con núm. de ident.:78)	AAWDFGRRRA VRLDY (sec. con núm. de ident.:85)	RASQSISSYL N (sec. con núm. de ident.:61)	AASSLQS (sec. con núm. de ident.:64)	QQSYSTPLT (sec. con núm. de ident.:67)
GC5B373	SYWIG (sec. con núm. de ident.:71)	IIPGDS DTR YSPSFQG (sec. con núm. de ident.:79)	IGFYGRSFR FDY (sec. con núm. de ident.:86)	RASQSVSSYL A (sec. con núm. de ident.:62)	DASNRAT (sec. con núm. de ident.:65)	QQRSNWPLT (sec. con núm. de ident.:68)
GC5B376	SYWIG (sec. con núm. de ident.:71)	IIPGDS DTR YSPSFQG (sec. con núm. de ident.:79)	VYSFGGRHK ALFDY (sec. con núm. de ident.:59)	RASQSVSSYL A (sec. con núm. de ident.:62)	DASNRAT (sec. con núm. de ident.:65)	QQRSNWPLT (sec. con núm. de ident.:68)
GC5B385	GYAMS (sec. con núm. de ident.:72)	AISGSGGST YYADSVKG (sec. con núm. de ident.:80)	VDRSFRSR YTL DY (sec. con núm. de ident.:87)	RASQSVSSYL A (sec. con núm. de ident.:62)	DASNRAT (sec. con núm. de ident.:65)	QQRSNWPLT (sec. con núm. de ident.:68)
GC5B370	SYGIS	GIIPFGNINY AQKFQG (sec. con	VSRFRKRA YYFDY (sec.	KSSQSVLYS SNNKNYLA (sec. con	WASTRES	QQYYSTPLT (sec. con

	(sec. con núm. de ident.:73)	núm. de ident.:81)	con núm. de ident.:88)	núm. de ident.:91)	(sec. con núm. de ident.:93)	núm. de ident.:95)
GC5B602	GYSFTGYTM N (sec. con núm. de ident.:74)	LINPYNGDTN (sec. con núm. de ident.:82)	VALRVALDY (sec. con núm. de ident.:60)	KASQNVATH VG (sec. con núm. de ident.:63)	SASYRYS (sec. con núm. de ident.:66)	QQYNRYPYT (sec. con núm. de ident.:69)
GC5B603	SYAMS (sec. con núm. de ident.:75)	AISGSGGST YYADSVKG (sec. con núm. de ident.:80)	SNFLPVVFD Y (sec. con núm. de ident.:89)	RASQSVRKS LA (sec. con núm. de ident.:92)	TASN RAT (sec. con núm. de ident.:94)	QQYFRAPIT (sec. con núm. de ident.:96)
GC5B601	GFSLTSYNV H (sec. con núm. de ident.:76)	VIWAGGSTN YNSALMS (sec. con núm. de ident.:83)	DGIRLRFAY (sec. con núm. de ident.:90)	KASQNVATH VG (sec. con núm. de ident.:63)	SASYRYS (sec. con núm. de ident.:66)	QQYNRYPYT (sec. con núm. de ident.:69)

Las características de algunos anticuerpos específicos para GPRC5D o fragmentos de unión al antígeno pueden encontrarse, p. ej., en la patente de los Estados Unidos núm. 10.562.968, solicitud publicada de los Estados Unidos

5 núm. US020/0231686, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

10 En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 and una CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3

15 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2

y un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D compite por la unión al GPRC5D con un anticuerpo o una unión al antígeno que comprende
5 una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2 y una cadena ligera que comprende una CDR, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
10 cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de
15 unión GPRC5D comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2 y una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende una
20 CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada derivada de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera derivada de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 2. En algunas modalidades,

el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera derivadas de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 2. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del clon GC5B680, GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B385, GC5B599, GC5B601, GC5B598, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597. En una modalidad, el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon GC5B680.

En algunas modalidades ilustrativas, el brazo de unión al GPRC5D comprende un dominio variable de la cadena pesada derivado de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 2. En algunas modalidades ilustrativas, el brazo de unión al GPRC5D comprende el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera derivados de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 2. En algunas modalidades ilustrativas, el brazo de unión al GPRC5D comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera del clon GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370,

GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597. En una modalidad, el brazo de unión al GPRC5D comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera del clon GC5B680. En algunas modalidades, el clon de anticuerpo específico para GPRC5D puede

5 inducir la ADCC in vitro con una CE_{50} de 28 nM o menor.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 14. En algunas

10 modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, una CDR2 de cadena ligera que comprende

15 la sec. con núm. de ident.: 10, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 11. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 16. En algunas modalidades, el brazo de unión a

20 GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 16 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 15.

- En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 49, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 53, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 57. En
- 5 algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 49, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 53, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 57, una CDR1 de
- 10 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 64, una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 67. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas
- modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 97.
- 15 En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 97 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 101.

- En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
- 20 CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 50, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 54, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 58. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de

- cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 50, una CDR2 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 54, una CDR3 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 58, una CDR1 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de
5 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 64 y una CDR3 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 67. El brazo de unión a
GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas
modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de
cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 98.
10 En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio
variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm.
de ident.: 98 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o
idéntico a la sec. con núm. de ident.: 101.

- En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
15 CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 51, una
CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 55, y una
CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 59. En
algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 51, una CDR2 de
20 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 55, una CDR3 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 59, una CDR1 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, y una CDR3 de

cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 68. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 99.

- 5 En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 99 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 102.

- En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
- 10 CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 52, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 56, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 60. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 52, una CDR2 de
- 15 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 56, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 60, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 66, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 69. El brazo de unión a
- 20 GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 100. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un

dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 100 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 103.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una

5 CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 70, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 77, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 84. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de

10 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 70, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 77, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 84, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 91, una CDR2 de

cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 93, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 95. El brazo de unión a

15 GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 104. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un

dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 104 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente

20 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 113.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 50, una

CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 78, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 85. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 50, una CDR2 de

5 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 78, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 85, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 64, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 67. El brazo de unión a

10 GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 105. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec.

15 con núm. de ident.: 105 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 101.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 79, y una

20 CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 86. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 79, una CDR3 de

cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 86, una CDR1 de
 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de
 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, y una CDR3 de
 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 68. El brazo de unión a
 5 GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas
 modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de
 cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.:
 106. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un
 dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec.
 10 con núm. de ident.: 106 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente
 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 102.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
 CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71, una
 CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 79, y una
 15 CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 59. En
 algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de
 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71, una CDR2 de
 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 79, una CDR3 de
 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 59, una CDR1 de
 20 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de
 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, y una CDR3 de
 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 68. El brazo de unión a
 GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas

modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 107. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 107 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 102.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 72, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 80, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 87. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 72, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 80, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 87, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 68. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 108. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec.

con núm. de ident.: 108 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 102.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 73, una

5 CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 81, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 88. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 73, una CDR2 de

10 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 81, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 88, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 91, una CDR2 de

cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 93, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 95. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas

15 modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 109. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec.

con núm. de ident.: 109 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente

20 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 113.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 74, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 82, y una

CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 60. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 74, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 82, una CDR3 de

5 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 60, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 66, una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 69. El brazo de unión a GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas

10 modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 110. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 110 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente

15 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 103.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 75, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 80, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 89. En

20 algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 75, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 80, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 89, una CDR1 de

cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 92, una CDR2 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 94, y una CDR3 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 96. El brazo de unión a
GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas
5 modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de
cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.:
111. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un
dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec.
con núm. de ident.: 111 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente
10 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 114.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una
CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 76, una
CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 83, y una
CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 90. En
15 algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende una CDR1 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 76, una CDR2 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 83, una CDR3 de
cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 90, una CDR1 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de
20 cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 66, y una CDR3 de
cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 69. El brazo de unión a
GPRC5D puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas
modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de

cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.:

112. En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 112 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente
5 igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 115.

El brazo de unión al GPRC5D puede derivarse de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, el brazo de unión al antígeno GPRC5D puede derivarse de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovinos, gallina, conejo, camélido, asno, humano, o versiones quiméricas de estos. Para el uso en la administración a
10 humanos, los fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos después de la administración a un paciente humano. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende fragmentos de unión al antígeno que es quimérico.

En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende
15 fragmentos de unión al antígeno humanizados. Los fragmentos de unión al antígeno humanizados pueden derivarse de inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina que no es humana. En su mayor parte, los
20 anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) o fragmentos de unión al antígeno cuyos residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie que no es humana (anticuerpo

donante) tal como de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Generalmente, los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpo humanizado comprenderán sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpo humanizado pueden incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

10

Brazo de unión a CD3

Los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos en la presente descripción comprenden un brazo de unión al antígeno que se une al CD3. En algunas modalidades, el primer brazo de unión a CD3 se une al CD3 humano. En algunas modalidades preferidas, el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 se deriva de un anticuerpo específico para CD3 que se une y activa las células T primarias humanas y/o las células T primarias de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se une a un epítipo en el N-terminal de CD3ε. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se une a los residuos 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena CD3ε.

20

Tales brazos de unión a CD3 pueden unirse a CD3 con una afinidad de 5×10^{-7} M o menor, tal como 1×10^{-7} M o menor, 5×10^{-8} M o menor, 1×10^{-8} M o menor, 5×10^{-9}

M o menor, o 1×10^{-9} M o menor. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se une al CD3 con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 2×10^{-8} M, aproximadamente 3×10^{-8} M, aproximadamente 4×10^{-8} M, aproximadamente 5×10^{-8} M, aproximadamente 6×10^{-8} M, aproximadamente 7×10^{-8} M, aproximadamente 8×10^{-8} M, aproximadamente 9×10^{-8} M, o aproximadamente 1×10^{-8} M. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se une al CD3 con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-8} M to aproximadamente 3×10^{-8} M, aproximadamente 2×10^{-8} M a aproximadamente 4×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 5×10^{-8} M, aproximadamente 2×10^{-8} M a aproximadamente 6×10^{-8} M, o aproximadamente 3×10^{-8} M a aproximadamente 8×10^{-8} M. En una modalidad, el brazo de unión a CD3 se une al CD3 con una afinidad de aproximadamente $2,5 \times 10^{-8}$ M. En una modalidad, el brazo de unión a CD3 se une al CD3 con una afinidad de aproximadamente $3,1 \times 10^{-8}$ M. En algunas modalidades, la afinidad de unión al CD3 se determina mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR).

El CD3ε humano se describe bajo el código Uniprot P07766 (CD3E_HUMAN). Un anticuerpo anti CD3 ε descrito en el estado de la materia es SP34 (Yang, SJ, el Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 reacciona con el CD3 de primates y humanos. SP34 está disponible en Pharmingen. Otro anticuerpo anti CD3 descrito en el estado de la materia es UCHT-1 (ver la patente núm. WO2000041474). Un anticuerpo anti-CD3 adicional descrito en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; que se usó en ensayos clínicos Fase I/II de la GvHD, Anasetti et al, Transplantation 54.: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1 y BC-3 en que SP-34

reconoce un epítopo presente en únicamente la cadena ϵ de CD3 (ver Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítopo que es contribuido tanto por la cadena ϵ como la γ . La secuencia de un anticuerpo con la misma secuencia que la del anticuerpo SP34 se menciona en

5 las patentes núm. WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 y WO2010037838. Una secuencia que es idéntica en un 96 % al VH del anticuerpo SP34 se menciona en la patente de los EE. UU. núm. 8236308 (patente núm. WO2007042261).

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se pone en contacto un

10 epítopo que incluye los seis aminoácidos del extremo N-terminal de CD3 ϵ . En algunas modalidades, el brazo de unión específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico se deriva del anticuerpo monoclonal SP34 de ratón, un isotipo IgG3/lambda de ratón. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende las CDR del anticuerpo SP34. Tales brazos de unión a CD3 pueden unirse a CD3

15 con una afinidad de $5 \times 10^{-7} \text{M}$ o menor, tal como $1 \times 10^{-7} \text{M}$ o menor, $5 \times 10^{-8} \text{M}$ o menor, $1 \times 10^{-8} \text{M}$ o menor, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ o menor, o $1 \times 10^{-9} \text{M}$ o menor. El brazo de unión específico a CD3 puede ser una versión humanizada de un brazo del anticuerpo monoclonal SP34 de ratón. El marco de adaptación humana (HFA) puede usarse para humanizar el anticuerpo anti-CD3 del que se deriva el brazo específico a CD3.

20 La Tabla 3 proporciona una síntesis de los ejemplos de algunos anticuerpos específicos para CD3 descritos en la presente descripción:

Tabla 3. Cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpos específicos para CD3 ilustrativos y fragmentos de unión al antígeno

	Cadena pesada	Cadena ligera
CD3B376	CDR 1: GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4)	CDR 1: TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1)
	CDR 2: RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5)	CDR 2: EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2)
	CDR 3: GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6)	CDR 3: VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3)
	VH: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVF NNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNS VTPEDTALYYCARGYSSSFYDWGQGTLLV VSS (sec. con núm. de ident.: 8)	VL: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS NIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEV SKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVL (sec. con núm. de ident.: 7)
	Cadena pesada: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVF NNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK WLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNS VTPEDTALYYCARGYSSSFYDWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVTLHQLDNLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFVMSHHEALHNRFTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 26)	Cadena ligera: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS NIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEV SKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS (sec. con núm. de ident.: 27)
CD3B219	CDR 1: TYAMN (sec. con núm. de ident.: 117)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (sec. con núm. de ident.: 122)
	CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (sec. con núm. de ident.: 118)	CDR 2: GTNKRAP (sec. con núm. de ident.: 123)
	CDR 3: HGNFGNSYVSWFAY (sec. con núm. de ident.: 119)	CDR 3: ALWYSNLWV (sec. con núm. de ident.: 124)
	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNS LKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSS (sec. con núm. de ident.: 120)	VL: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRST GAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GKLTTLV (sec. con núm. de ident.: 125)
	Cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNS LKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN	Cadena ligera: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRST GAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GKLTTLVQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS (sec. con núm. de ident.: 126)

	AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK (sec. con núm. de ident.: 121)	
--	--	--

Las características de algunos anticuerpos específicos para CD3 o fragmentos de unión al antígeno pueden encontrarse, p. ej., en las patentes de los Estados Unidos núm. 10.562.968 y 10.072.088, la solicitud publicada de los Estados Unidos núm. US2019/0382481, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 compite por la unión a CD3 con un anticuerpo o antígeno de unión que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR1 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3 y una cadena

ligera que comprende una CDR1, una CDR1 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión CD3 comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD33 comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades de los anticuerpos multiespecíficos, el brazo de unión a CD3 comprende un par de cadena pesada y cadena ligera seleccionado de la Tabla 3. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D

comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon CD3B376. En algunas modalidades, el brazo de unión al GPRC5D comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del clon CD3B219.

- 5 En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 6. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada
- 10 que comprende la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 6, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, y una CDR3 de cadena ligera que
- 15 comprende la sec. con núm. de ident.: 3. El brazo de unión a CD3 puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de
- 20 cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 8 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 7. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena pesada sustancialmente igual o idéntica a la sec. con

núm. de ident.: 26. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena pesada sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 26 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 27.

- 5 En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 117, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 118, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 119. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada
- 10 que comprende la sec. con núm. de ident.: 117, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 118, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 119, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 123, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 124, y una CDR3 de cadena ligera que
- 15 comprende la sec. con núm. de ident.: 125. El brazo de unión a CD3 puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 120. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende un dominio variable de
- 20 cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 120 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 125. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena pesada sustancialmente igual o idéntica a la sec. con

núm. de ident.: 121. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende una cadena pesada sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 121 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 126.

- 5 En algunas modalidades, las CDR de la cadena pesada y/o la cadena ligera se derivan de los anticuerpos anti-CD3 conocidos, tales como, por ejemplo, muromonab-CD3 (OKT3), oteixizumab (TRX4), tepizumab (MGA031), visiizumab (Nuvion), TR-66 o X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YT12,5, FL 11-409, CLB-T3,4.2, TR-66, WT32, SPV-T3B, 1D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, 10 T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKTCH3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-L y WT-31.

- En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 es IgG, o un derivado de esta. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 es IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En algunas modalidades, en donde el brazo de unión a CD3 tiene un isotipo IgG4, este contiene las sustituciones S228P, L234A, L235A, F405L, y 15 R409K en su región Fc. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ sobre las células T humanas primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ sobre las células T de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ 20 sobre células T humanas y de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno activan las células T CD3+ humanas primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno activan las células T CD4+ de cynomolgus primarias.

En algunas modalidades, los anticuerpos triespecíficos descritos en la presente descripción pueden adoptar cualquier formato que se haya descrito en la técnica para anticuerpos triespecíficos. En algunas modalidades, los anticuerpos triespecíficos descritos en la presente descripción se construyen basados en un
5 formato de anticuerpo biespecífico. Esto puede lograrse mediante la adición de un tercer brazo de unión al antígeno a un anticuerpo biespecífico. Se han descrito formatos diferentes de anticuerpos biespecíficos y se publicaron recientemente por Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276. En algunas modalidades, el anticuerpo triespecífico comprende un anticuerpo biespecífico que es un diacuerpo,
10 un cuerpo cruzado o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio de brazos Fab controlado como los descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, los anticuerpos triespecíficos incluyen moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; moléculas de orientación doble similares a IgG recombinantes,
15 en donde los dos lados de la molécula contienen, cada uno, el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión a IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a un fragmento Fab extra o partes del fragmento Fab; moléculas de fusión a Fc, en donde las moléculas Fv de cadena simple o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios
20 constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión a Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos basados en ScFv y diacuerpos, y de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos), en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o diferentes

diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula portadora.

En algunas modalidades, las moléculas similares a IgG con moléculas de dominios CH3 complementarios incluyen las mutaciones de Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), las de botón en ojal (Genentech), las de CrossMAb (Roche) y las pareadas electrostáticamente (Amgen), LUZ-Y (Genentech), las de cuerpo de dominio diseñado por ingeniería por intercambio de cadenas (SEEDbody) (EMD Serono), las de Biclonic (Merus), las de DuoBody (Genmab A/S), y otras mutaciones asimétricas (p. ej., Zymeworks).

En algunas modalidades, las moléculas de direccionamiento doble similares a IgG-recombinante incluyen direccionamiento doble (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech), Mab reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a IgG incluyen dominio variable doble (DVD)-Ig (Abbott), biespecífico tipo IgG (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a Fc incluyen a ScFv/Fc Fusions (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) y Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine--China).

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de fusión a Fab incluyen F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-

and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos de dominio basados en ScFv, diacuerpos incluyen, pero no se limitan a, Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet), Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble orientación (Ablynx), anticuerpos de dominio solo de cadena pesada de orientación doble.

Los anticuerpos triespecíficos en toda su extensión de la presente descripción pueden generarse, por ejemplo, usando el intercambio de brazos Fab (o intercambio de medias moléculas) entre dos anticuerpos bivalentes específicos mediante la introducción de sustituciones en la interfaz de cadena pesada CH3 en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímeros de dos medias moléculas de anticuerpo que tienen distinta especificidad ya sea en un ambiente libre de células in vitro o usando la coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y la disociación-asociación de dominios CH3. Los puentes disulfuro de la cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y se reforman por disociación-asociación. Los

dominios CH3 de los brazos Fab pueden diseñarse para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas cada una de las cuales se une a un epítipo distinto, p. ej., a un epítipo en el BCMA (o GPRC5D)y a un epítipo en el CD3. Después, puede introducirse un tercer brazo de unión al antígeno en el anticuerpo biespecífico, por ejemplo, en el extremo C-terminal de la primera cadena pesada o segunda cadena pesada, que puede unirse a un tercer epítipo, p. ej., GPRC5D (o BCMA).

La “homodimerización”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas. Un “homodímero”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas.

La “heterodimerización”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas. Un “heterodímero”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas.

La estrategia de “botón en ojal” (ver, p. ej., la publicación internacional EE.UU. núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos en toda su extensión. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfase de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en las posiciones que afectan las interacciones de los dominios CH3 para promover la

formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ojal) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (botón) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un “ojal” con la cadena pesada con un “botón”. Los pares de sustituciones de CH3 ilustrativas que forman un botón son (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): T366Y/F405A, T366W/ F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

En algunas modalidades del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico descrito en la presente descripción, uno de los dominios de Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V y el otro dominio de Fc comprende la mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio de Fc de la primera porción de cadena pesada (HC1) del primer brazo de unión al antígeno (p. ej., brazo de unión a CD3) comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, y el dominio de Fc de la segunda porción de cadena pesada (HC2) del segundo brazo de unión al antígeno y/o tercer brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al GPRC5D/BCMA, o brazo de unión al BCMA) comprende la mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio de Fc de la HC2 del segundo brazo de unión al antígeno y/o tercer brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al GPRC5D/BCMA, o el brazo de unión al BCMA) comprende las mutaciones T366S,

L368A e Y407V, y el dominio de Fc de la HC1 del primer brazo de unión al antígeno (p. ej., brazo de unión a CD3) comprende la mutación T366W.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas mediante el uso de interacciones electrostáticas al sustituir

5 residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados negativamente en una segunda superficie de CH3, como se describe en la publicación de los EE. UU. núm. US2010/0015133; publicación de EE.UU. núm. US2009/0182127; publicación de EE.UU. núm. US2010/028637 o publicación de patente de los EE.UU. núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la

10 heterodimerización puede promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F,

15 L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, o T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la publ. EE.UU. núm. US2012/0149876 o publ. de patente EE.UU. núm. US2013/0195849 (Zymeworks).

Además de los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos triespecíficos de la invención pueden generarse in vitro en un ambiente libre de

20 células mediante la introducción de mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y la formación del anticuerpo heterodimérico triespecífico a partir de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones reductoras para permitir la

isomerización de enlaces disulfuro de acuerdo con los métodos descritos en la publicación de los EE.UU. núm. W02011/131746. En los métodos, el primer anticuerpo bivalente monoespecífico (p. ej., anticuerpo anti-GPRC5D) y el segundo anticuerpo bivalente monoespecífico (p. ej., anticuerpo anti-CD3) se diseñan por ingeniería para tener ciertas sustituciones en el dominio de CH3 que promueve la estabilidad del heterodímero; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlaces disulfuro; lo que de esta manera genera el anticuerpo triespecífico mediante el intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restablecerse de forma óptima a condiciones no reductoras. Los agentes reductores ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión, tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol y tris (2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, puede usarse una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

En algunas modalidades, los anticuerpos triespecíficos o los fragmentos de unión al antígeno son IgG o derivados de esta. La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc pero muestran grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región

bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores de Fc (FcγR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias tales como las células destructoras naturales y los macrófagos, lo que conduce a la fagocitosis o lisis de las células diana. En la CDC, los anticuerpos matan las células diana mediante la activación de la cascada de complemento en la superficie celular. Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen los anticuerpos con las características descritas de los dominios variables en combinación con cualquiera de los isotipos IgG, que incluyen versiones modificadas en las que la secuencia Fc se ha modificado para lograr las funciones efectoras.

Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones efectoras mediadas por Fc no forman parte del mecanismo de acción. Estas funciones efectoras mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan, potencialmente, un riesgo de seguridad al provocar toxicidad fuera del mecanismo. La modificación de las funciones efectoras puede lograrse mediante el diseño por ingeniería de las regiones Fc para reducir su unión a los FcγR o los factores del complemento. La unión de IgG a los FcγR activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 y IgG4 para reducir o silenciar las funcionalidades de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida para el FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb y/o el FcγRIIIa, (c) afinidad reducida para el FcγRI, (d) afinidad

5 reducida para el FcγRIIa, (e) afinidad reducida para el FcγRIIb, (f) afinidad reducida para el FcγRIIIb o (g) afinidad reducida para el FcγRIIIa.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo tiene un isotipo IgG1, el anticuerpo

10 contiene la(s) sustitución(es) L234A, L235A, D265S y/o K409R en su región Fc. En algunas modalidades en donde el anticuerpo has un isotipo IgG4, el anticuerpo contiene sustituciones de S228P, L234A, y L235A en su región de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En algunas modalidades, los dominios de Fc de un anticuerpo multiespecífico

15 descrito en la presente descripción comprenden cada uno una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S. En algunas modalidades, los dominios de Fc de la HC1 y HC2 comprenden cada uno las mutaciones L234A, L235A y D265S.

En algunas modalidades, el dominio de Fc de una de las porciones de cadena pesada de un anticuerpo multiespecífico descrito en la presente descripción

20 comprende además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a la proteína A. En algunas modalidades, el dominio de Fc de una de las porciones de cadena pesada comprenden las mutaciones H435R y/o Y436F. En algunas modalidades, el dominio de Fc de la HC2 del segundo brazo de unión al antígeno

y/o el tercer brazo de unión al antígeno (p. ej., brazo de unión al GPRC5D/BCMA, o brazo de unión al BCMA) comprende las mutaciones H435R y/o Y436F.

En varias modalidades, el tercer brazo de unión al antígeno se une operativamente a los dominios de Fc del primer brazo de unión al antígeno o

5 segundo brazo de unión al antígeno a través de un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador peptídico y puede incluir cualquier aminoácido de origen natural. Los aminoácidos ilustrativos que pueden incluirse en el enlazador son Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His y The. El enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir el tercer brazo de unión al antígeno y

10 el primer brazo de unión al antígeno o el segundo brazo de unión al antígeno de tal manera que formen la conformación correcta entre sí para que mantengan la actividad deseada, tal como la unión a un tercer antígeno (p. ej., BCMA o GPRC5D).

En algunas modalidades de un anticuerpo triespecífico descrito en la presente descripción, la HC1 comprende, del N al C-terminal, el VH1 del primer

15 brazo de unión al antígeno, un dominio CH1, el dominio de Fc, un enlazador, y el tercer brazo de unión al antígeno.

En algunas modalidades de un anticuerpo triespecífico descrito en la presente descripción, la HC2 comprende, del N al C-terminal, el segundo brazo de unión al antígeno, el dominio de Fc, un enlazador, y el tercer brazo de unión al antígeno.

20 En diversas modalidades, los scFv usados en anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente descripción comprenden, del N al C-terminal, un VH, un enlazador, y un VL (VH-L-VL), o el VL, el enlazador, y el VH (VL-L-VH). En algunas modalidades, el scFv comprende, desde el extremo N-

terminal al extremo C-terminal, el VL, el enlazador y el VH (VL-L-VH). En algunas modalidades, el scFv comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el VH, el enlazador y el VL (VH-L-VL).

El enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 5-50

- 5 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-40 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-35 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-30 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-25
- 10 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15-20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 6 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 7 aminoácidos. En algunas modalidades, el
- 15 enlazador tiene una longitud de 8 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 9 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 10 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 11 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 12 aminoácidos. En algunas modalidades, el
- 20 enlazador tiene una longitud de 13 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 14 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 15 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 16 aminoácidos. En algunas modalidades, el

enlazador tiene una longitud de 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 18 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 19 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 21 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 22 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 23 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 24 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 25 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 26 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 27 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 28 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 29 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 30 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 31 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 32 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 33 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 34 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 35 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 36 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 37 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 38 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 39 aminoácidos. En algunas modalidades, el

enlazador tiene una longitud de 40 aminoácidos. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse son enlazadores abundantes en Gly, enlazadores que contienen Gly y Ser, enlazadores que contienen Gly y Ala, enlazadores que contienen Ala y Ser, y otros enlazadores flexibles.

5 Otras secuencias del enlazador pueden incluir porciones del área de bisagra de la inmunoglobulina, CL o CH1 derivado de cualquier isotipo de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse se muestran en la **Tabla 4**. Se describen enlazadores adicionales, por ejemplo, en la publicación de patente EE.UU. núm. WO2019/060695.

10 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25.

 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 163.

 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 127.

 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 128.

 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 129.

20 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 130.

 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 131.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 132.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 133.

5 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 134.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 135.

10 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 136.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 137.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 138.

15 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 139.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 140.

20 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 141.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 142.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 143.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 144.

5 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 145.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 146.

10 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 147.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 148.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 149.

15 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 150.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 151.

20 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 152.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 153.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 154.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 155.

5 En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 156.

En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 157.

Tabla 4. Secuencias de enlazador ilustrativas

Nombre del enlazador	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
Enlazador 1	GGSEKSSGSGSESKSTGGS	25
Enlazador 2	GGGSGGGS	127
Enlazador 3	GGGSGGGSGGGS	128
Enlazador 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	129
Enlazador 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	130
Enlazador 6	GGGSGGGSGGGSGGGS	131
Enlazador 7	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	163
Enlazador 8	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	132
Enlazador 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	133
Enlazador 10	IRPRAIGGSKPRVA	134
Enlazador 11	GKGGSGKGGSGKGGS	135
Enlazador 12	GGKSGGKGSGGKGGS	136
Enlazador 13	GGGKSGGKGSGGKGS	137
Enlazador 14	GKGKSGKGKSGKGKS	138
Enlazador 15	GGGKSGGKGSGKGGS	139
Enlazador 16	GKPGSGKPGSGKPGS	140
Enlazador 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	141
Enlazador 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	142
Enlazador 19	STAGDTHLGGEDFD	143
Enlazador 20	GEGGSGEGGSGEGGS	144
Enlazador 21	GGEGSGGEGSGGEGS	145

Enlazador 22	GEGESGEGESGEGES	146
Enlazador 23	GGGESGEGSGEGGS	147
Enlazador 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	148
Enlazador 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	149
Enlazador 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	150
Enlazador 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	151
Enlazador 28	GTSGSSGSGSGSGSGGGG	152
Enlazador 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	153
Enlazador 30	GSGS	154
Enlazador 31	APAPAPAPAP	155
Enlazador 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	156
Enlazador 33	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA	157

En una modalidad, la HC1 de un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 26.

- 5 En una modalidad, la LC de un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 27.

- En una modalidad, el brazo de unión al GPRC5D/BCMA de un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 28.
- 10

En una modalidad, una HC1 acoplada a CD3/GPRC5D de anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 29.

- En una modalidad, la LC de un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 30.
- 15

En una modalidad, el brazo de unión al BCMA comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 31.

En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un anticuerpo triespecífico aislado, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

5 a) un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada (HC1) y una cadena ligera (LC); y

 b) un brazo de unión al GPRC5D/BCMA,

 en donde HC1 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 26, LC comprende
10 una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 27, y el brazo de unión a GPRC5D/BCMA comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 28.

En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un anticuerpo triespecífico aislado, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

15 a) un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada (HC1) y una cadena ligera (LC); y

 b) un brazo de unión al GPRC5D/BCMA,

 en donde HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26, LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
20 núm. de ident.: 27, y el brazo de unión a GPRC5D/BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un anticuerpo triespecífico aislado, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

a) un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada (HC1) y una cadena ligera (LC), en donde la HC1 comprende además el brazo de unión al GPRC5D; y

b) un brazo de unión al BCMA,

5 en donde HC1 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 29, LC comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 30, y el brazo de unión a BCMA comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o idéntica a la sec. con núm. de ident.: 31.

10 En una modalidad, se proporciona en la presente descripción un anticuerpo triespecífico aislado, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

a) un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada (HC1) y una cadena ligera (LC), en donde la HC1 comprende además el brazo de unión al GPRC5D; y

15 b) un brazo de unión al BCMA,

en donde HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29, LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30, y el brazo de unión a BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31.

20 En una modalidad, el anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es BGCB463.

En una modalidad, el anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 es BGCB491.

Además de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos, también se proporcionan secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos. También
5 se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así como las células que expresan los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente descripción. Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser células de mamífero (tales como células
10 293F, células CHO), células de insecto (tales como células Sf7), células de levadura, células vegetales o células bacterianas (tales como *E. coli*). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas. Los anticuerpos descritos también pueden producirse de manera recombinante.

Los polinucleótidos que codifican proteínas recombinantes de unión al
15 antígeno están, además, dentro del alcance de la descripción. En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos (y los polipéptidos que ellos codifican) incluyen una secuencia líder. Puede usarse cualquier secuencia líder conocida en la técnica. La secuencia líder puede incluir, pero sin limitarse a, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

20 Los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones, o adiciones de aminoácidos únicas o múltiples que retienen las propiedades biológicas (p. ej., la afinidad de unión o la

actividad efectora inmunitaria) de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos. En el contexto de la presente invención, las siguientes notaciones se usan, a menos que se indique de cualquier otra forma, para describir una mutación; i) la sustitución de un aminoácido en una posición dada se escribe como, por ejemplo K409R, lo que significa una sustitución de una lisina en la posición 409 con una arginina; y ii) para variantes específicas los códigos específicos de una o tres letras, que incluyen los códigos Xaa y X, se usan para indicar cualquier residuo de aminoácidos. Por lo tanto, la sustitución de Arginina por Lisina en la posición 409 se designa como: K409R, o la sustitución de cualquier residuo de aminoácido por Lisina en la posición 409 se designa como K409X. En el caso de delección de Lisina en la posición 409 esta se indica por K409*. La persona con experiencia puede producir variantes que tienen sustituciones, delecciones, o adiciones únicas o múltiples de aminoácidos.

Estas variantes pueden incluir: (a) variantes en las que se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden o se delecionan uno o más aminoácidos del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que se fusiona el polipéptido con otro péptido o polipéptido tales como una pareja de fusión, una etiqueta de proteína u otra porción química, que pueden conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, una porción de biotina y lo similar. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden

incluir variantes en las que se sustituyen los residuos de aminoácidos de una especie por el residuo correspondiente en otras especies, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas se sustituyen con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas para obtener estas variantes, que incluyen técnicas genéticas (deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, se conocen bien por las personas con experiencia en la materia.

Los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden incorporar varios isotipos de anticuerpo, tales como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En algunas modalidades el isotipo de anticuerpos es isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, preferentemente, isotipo IgG1 o IgG4. La especificidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se determina en buena parte por la secuencia de aminoácido, por la disposición, o las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo pueden transferirse a otro isotipo sin alterar la especificidad por el antígeno. Alternativamente, las técnicas se han establecido para producir hibridomas que cambien la producción de un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad por el antígeno. En consecuencia, tales isotipos de anticuerpo están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos.

Los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden tener los valores de IC_{50} de al menos 5,9 nM para la unión a APRIL. El IC_{50} de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos, o

fragmentos de unión al antígeno, puede determinarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como métodos basados en ELISA o mediante citometría de flujo (FACS). Los ensayos para medir el IC₅₀ mediante ELISA tienen el BCMA unido a placas en la presencia y ausencia de un

5 anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 y se usan concentraciones variables del APRIL. Un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3, o fragmento de unión al antígeno, que bloquea la unión de APRIL al BCMA es para “bloquear APRIL según lo medido por ELISA”.

Además, se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos

10 descritos en la presente descripción. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés se consideran dentro del alcance de esta descripción. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero sin limitarse a, secuencias reguladoras (p. ej., promotoras, potenciadoras), un

15 marcador de selección y una señal de poliadenilación. Los vectores para transformar una amplia variedad de células huésped se conocen bien e incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como además otros vectores bacterianos, de levaduras y virales.

20 Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos, o derivados de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados. Tales

elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos, puede incluir, además, uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado unido al gen a expresar, otras secuencias flanqueantes 5' o 3' sin transcribir, secuencias 5' o 3' sin transcribir (tales como los sitios necesarios de unión a ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios de corte donantes y aceptores, o secuencias de terminación transcripcional. También puede incorporarse un origen de replicación que confiere la capacidad de replicarse en un huésped.

Las secuencias control transcripcionales y traduccionales en los vectores de expresión para usarlas en las células de vertebrados transformantes pueden proporcionarse por fuentes virales. Los vectores ilustrativos pueden construirse como se describe por Okayama y Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

En algunas modalidades, la secuencia que codifica el anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo poderoso, tal como los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y otros. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. Tales promotores virales incluyen sin limitación,

citomegalovirus (CMV) promotor temprano inmediato, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Maloney, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del

5 sarcoma de Rous (RSV), et al. retrovirus, y el promotor cinasa de timidina del virus del herpes simple. En una modalidad, la secuencia de codificación del anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión al antígeno de este se coloca bajo el control de un promotor inducible tal como el promotor de metalotioneína, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible

10 por doxíciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE, por sus siglas en inglés) tales como la proteína cinasa R, 2',5'-oligoadenilato sintetasas, genes Mx, ADAR1, y lo similar.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden contener uno o más sitios de entrada al ribosoma internos (IRES). La inclusión de una

15 secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para potenciar la expresión de algunas proteínas. En algunas modalidades, el sistema de vectores incluirá uno o más sitios de poliadenilación (p. ej., SV40), que puede estar corriente arriba o corriente abajo de cualquier secuencia de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente. Los componentes vectoriales

20 pueden unirse contiguamente o disponerse de una manera que proporcione la separación óptima para expresar los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos “espaciadores” entre los ORF), o colocarse de otra

manera. Los elementos regulatorios, tales como los motivos IRES, pueden disponerse, además, para proporcionar espacio óptimo para la expresión.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección, que se conocen bien en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección
5 positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a penicilina, un gen de resistencia a la puromicina, un gen de resistencia la blasticidina), genes de la glutamato sintasa, derivados de HSV-TK, HSV-TK para la
10 selección con ganciclovir, o gen de la purina nucleósido fosforilasa bacteriana para la selección con 6-metilpurina (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

15 Los vectores descritos en la presente descripción pueden usarse para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, pueden usarse los vectores para generar las células productoras del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3. Por lo tanto,
20 otro aspecto presenta células huésped transformadas con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al BCMA,

GPRC5D, y CD3, tales como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos y ejemplificados en la presente descripción.

Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células y pueden usarse para construir las células recombinantes para propósitos de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las varias modalidades descritas y ejemplificadas en la presente descripción. La técnica usada proporcionaría la transferencia estable de la secuencia de genes heterólogos a la célula huésped, tal que la secuencia de genes heterólogos sea heredable y expresable por la progenie celular, y de manera que no se afecten las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la transferencia de cromosomas (p. ej., fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por micro células), métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, portador de liposomas), transferencia de vectores virales (p. ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y lo similar (descritas en Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)). La precipitación con fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamíferos pueden usarse para transformar células.

Las células adecuadas para usar en la expresión de los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción son, preferentemente, células eucarióticas, con mayor preferencia, células de plantas, de roedores o de origen humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, células

HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0, y líneas celulares BHK, entre otras. En adición, la expresión de anticuerpos puede lograrse mediante el uso de células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

5 Las células transformadas con vectores de expresión descritos en la presente descripción pueden seleccionarse o examinarse para determinar la expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción. Las células recombinantes positivas se expanden y se examinan para determinar los subclones que exhiben un fenotipo deseado, tales como una expresión de alto nivel, propiedades de crecimiento mejoradas, o la capacidad para producir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de la proteína o modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a las propiedades inherentes de un subclón dado o la mutación. Las mutaciones pueden efectuarse a través del uso de productos químicos, luz UV de longitud de onda, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación ADN no coincidente, o una combinación de tales métodos.

Composición terapéutica y métodos para el tratamiento usando anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos

Los anticuerpos multiespecíficos descritos anteriormente, por ejemplo, los anticuerpos trisespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 descritos anteriormente, son útiles en la terapia. Particularmente, los anticuerpos multiespecíficos son útiles en el

tratamiento del cáncer. La presente descripción proporciona, además, composiciones terapéuticas para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno multiespecífico descritos en la presente descripción

5 y un portador farmacéuticamente aceptable. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un

10 fragmento de unión al antígeno trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este. En una modalidad, dicha composición farmacéutica es para tratar un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA, que incluye (pero no se limita a) los siguientes: cánceres de células B que expresan GPRC5D y/o BCMA, tales como mieloma múltiple (MM) que incluye el mieloma múltiple quiescente (SMM); y otros cánceres

15 que aún no se han determinado en los cuales se expresa GPRC5D y/o BCMA. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. Los anticuerpos trispecíficos particulares que pueden usarse para tratar el cáncer, tal como el cáncer hematológico, que incluyen los cánceres

20 específicos descritos anteriormente, incluyen los anticuerpos BGCB463 y BGCB491.

En algunas modalidades, el anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o el fragmento de unión de este se usa para el tratamiento del mieloma múltiple R/R.

En algunas modalidades, el sujeto que recibe el anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 o fragmento de unión de este ha recibido un tratamiento previo. Por ejemplo, el sujeto puede haber recibido uno o más agentes terapéuticos, tales como inhibidores de proteasoma (PI, por sus siglas en inglés) (p. ej., marizomib (salinosporamida A), carfilzomib, ixazomib), fármacos 5 inmunomoduladores (IMiD, por sus siglas en inglés), agentes biespecíficos, terapias con CAR-T y/o anticuerpos anti-CD38, para tratar el mieloma múltiple.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción comprenden: a) una cantidad efectiva de un anticuerpo multiespecífico o fragmento 10 de anticuerpo de la presente invención, y b) un portador farmacéuticamente aceptable, que puede estar inerte o activo fisiológicamente. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un 15 anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este. Como se usa en la presente descripción, el término “portadores farmacéuticamente aceptables” incluye cualquiera de y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y 20 antimicóticos, y lo similar, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y lo similar, así como cualquier combinación de estos. En muchos casos, será

preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. Particularmente, los ejemplos relevantes de portador adecuado incluyen: (1) salina regulada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina sérica humana, (2) 0,9 % de salina (0,9 % p/v de cloruro de sodio (NaCl)), y (3) 5 % (p/v) de dextrosa; y también podría contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20®.

Las composiciones de la presente descripción pueden contener, además, un agente terapéutico adicional, cuando sea necesario para el trastorno particular que se trata. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico y el compuesto activo complementario tendrán actividades complementarias que no afectan adversamente uno a otro. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es citarabina, un antraciclina, dihidrocloruro de histamina, o interleucina 2. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD, por sus siglas en inglés), un inhibidor del punto de regulación inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de células T, o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente anti-CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38 (p. ej., daratumumab). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), tal como lenalidomida y pomalidomida. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un inhibidor del punto de regulación inmunitario tal como el

inmunorreceptor anti-PD-1 y anticélulas T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente de coestimulación inmunitaria, tal como agentes dirigidos a CD137 (p. ej., anticuerpo biespecífico coestimulador para CD137). En algunas modalidades, el agente
5 terapéutico adicional es un potenciador de células T, tal como la adición de IL-2.

Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, pero la forma preferida depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de
10 soluciones inyectables o infusibles. El modo de administración preferido es por vía parenteral (p. ej., por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea). En una modalidad preferida, las composiciones de la invención se administran de forma intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En otra modalidad preferida, estas se inyectan por vía intramuscular,
15 subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos.

Las composiciones estériles para administración parenteral pueden prepararse al incorporar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o anticuerpo conjugado de la presente invención en la cantidad requerida en un solvente
20 adecuado, seguido por la esterilización mediante la microfiltración. Como solvente o vehículo, se puede usar agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y lo similar, así como una combinación de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares,

polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. Estas composiciones pueden contener, además, adyuvantes, particularmente, agentes humectantes, isotonizantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral pueden prepararse, además, en forma de

5 composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el tiempo para el uso en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico puede administrarse, además, por vía oral. Como composiciones sólidas para la administración oral, pueden usarse tabletas, píldoras, polvos (cápsulas de

10 gelatina, sobres) o gránulos. En estas composiciones, el ingrediente activo de acuerdo con la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes, tal como almidón, celulosa, sucrosa, lactosa o sílice, bajo una corriente de argón. Estas composiciones pueden comprender, además, sustancias diferentes a los diluyentes, por ejemplo uno o más lubricantes, tal como estearato de magnesio

15 o talco, un colorante, un revestimiento (tableta revestida con azúcar) o un barniz.

Como composiciones líquidas para administración oral, pueden usarse soluciones farmacéuticamente aceptables, suspensiones, emulsiones, jarabes y elíxires que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden

20 comprender sustancias diferentes a diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saborizantes o estabilizantes.

Las dosis dependen del efecto deseado, la duración del tratamiento y la ruta de administración usada; generalmente, se encuentran entre 5 mg y 1000 mg por día

oralmente para un adulto con dosis únicas en el intervalo de 1 mg a 250 mg de sustancia activa. Generalmente, el médico determinará la dosificación adecuada en dependencia de la edad, peso y algunos otros factores específicos al sujeto a tratar.

En la presente descripción, también se proporcionan métodos para destruir
5 una célula positiva para GPRC5D y/o BCMA al administrar a un paciente que los necesita un anticuerpo multiespecífico que se une a dichos GPRC5D y BCMA y es capaz de reclutar células T para destruir dicha célula positiva para GPRC5D y/o BCMA (es decir, redirección de células T). Puede usarse de manera terapéutica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo multiespecíficos de la
10 invención. Por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 puede usarse terapéuticamente para tratar el cáncer en un sujeto.

En una modalidad preferida, se usan los anticuerpo o fragmentos de anticuerpos multiespecíficos de la invención para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una modalidad más preferida, una de las
15 composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico de la invención, se usa para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una modalidad, el trastorno es un cáncer. Particularmente, el cáncer es un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA, que incluye (pero no se limita a) los siguientes:
20 cánceres de células B que expresan GPRC5D y/o BCMA, tales como mieloma múltiple (MM) que incluye el mieloma múltiple quiescente (SMM); y otros cánceres que aún no se han determinado en los cuales se expresa GPRC5D y/o BCMA. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es una forma de

recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este.

En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de una variedad de cánceres o trastornos, que incluyen (pero no se limitan a) el siguiente: un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA, que incluye (pero no se limita a) los siguientes: cánceres de células B/plasmáticas que expresan GPRC5D y/o BCMA, tal como mieloma múltiple (MM) agudo o mielomas premalignos tales como MGUS (siglas en inglés de gammapatía monoclonal de significado incierto) y SMM (siglas en inglés de mieloma múltiple quiescente) y plasmacitoma; y otros cánceres que aún no se han determinado en los cuales se expresa el GPRC5D y/o BCMA, u otros trastornos de células plasmáticas tales como amiloidosis y lupus. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple.

Similarmente, se proporciona además en la presente descripción un método para inhibir el crecimiento de las poblaciones celulares seleccionadas, el método comprende poner en contacto las células diana que expresan GPRC5D y/o BCMA, o un tejido que contiene tales células diana, con una cantidad efectiva de un anticuerpo

multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la presente invención, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos, en la presencia de una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). Un anticuerpo para BCMA x GPRC5D x CD3 que bloquea la unión de ligandos (APIL, BAFF y otros) a BCMA y GPRC5D puede bloquear la señalización mediada por BCMA y GPRC5D y conducir a la inhibición o destrucción celular de las células diana. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción que implican la administración de un anticuerpo multiespecífico o una composición farmacéutica que lo comprende, implican además administrar otro agente terapéutico. Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen, sin limitarse a, un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de regulación inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de células T (p. ej., adición de IL-2), tocilizumab o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente anti-CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38 (p. ej., daratumumab). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD),

tal como lenalidomida y pomalidomida. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un inhibidor del punto de regulación inmunitario tal como el inmunorreceptor anti-PD-1 y anticélulas T con dominios Ig e ITIM (TIGIT). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente de

5 coestimulación inmunitaria, tal como agentes dirigidos a CD137 (p. ej., anticuerpo biespecífico coestimulador para CD137). El uso de un ligante CD137 de baja afinidad con el agonista condicional en la presencia de un anticuerpo de redireccionamiento de células T como el anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción puede mejorar la actividad

10 antitumoral y mejorar potencialmente la persistencia de las células T. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es citarabina, un antraciclina, dihidrocloruro de histamina, o interleucina 2. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. El método para inhibir el crecimiento de las poblaciones celulares seleccionadas puede practicarse *in*

15 *vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante al mismo paciente para destruir células enfermas o malignas y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés); tratamientos de cultivos celulares a fin de matar todas las células exceptos

20 para variantes deseadas que no expresan el antígeno destino; o de matar variantes que expresan el antígeno indeseado. Las condiciones del uso *in vitro* que no es clínico se determinan rápidamente por uno de los experimentados en la técnica.

Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son remover las células tumorales de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer. El tratamiento puede llevarse a cabo como sigue. Se toma la médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que
5 se le añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 μ M a 1 μ M, durante aproximadamente 30 min a aproximadamente 48 h a aproximadamente 37 °C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, los determinan fácilmente un experto en la técnica. Después de la incubación se lavan las células de médula
10 ósea con medio que contiene suero y se regresan al paciente mediante infusión i.v. de acuerdo con los métodos conocidos. En circunstancias en donde el paciente recibe otro tratamiento, tal como un plan de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo, entre el tiempo de recogida de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno
15 líquido mediante el uso de un equipo médico estándar.

Para uso clínico *in vivo*, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno se administra a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x GPRC5D x CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos
20 pueden ser útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es un cáncer de células B, tal como el mieloma múltiple (MM) que incluye el mieloma múltiple quiescente (SMM). En algunas

modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D y/o BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un anticuerpo trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno trispecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este. En algunas modalidades, el paciente es un mamífero, preferentemente, un ser humano. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico se administrará como una solución que se ha probado para esterilidad.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el paso del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación.

Las dosificaciones y los regímenes de dosificaciones eficientes para o anticuerpos y fragmentos multiespecíficos dependen de la enfermedad o afección a tratar y puede determinarse por un experto en la técnica. Un intervalo no limitante e ilustrativo para una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención es aproximadamente 0,001-10 mg/kg, tal

como aproximadamente 0,001-5 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001-2 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-1 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 o aproximadamente 10 mg/kg.

5 Un médico, farmacéutico o veterinario que tiene experiencia en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar las dosis del anticuerpo o fragmento multiespecífico usado en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos con el objetivo de alcanzar
10 el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente las dosificaciones hasta que se alcance el efecto deseado. Generalmente, una dosis diaria adecuada de un anticuerpo multiespecífico de la presente invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. La administración puede ser, p. ej., parenteral, tal como
15 intravenosa, intramuscular, intratumoral (p. ej., en la médula ósea) o subcutánea. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse mediante infusión en una dosificación semanal calculada por mg/m^2 . Tales dosificaciones pueden, por ejemplo, basarse en las dosificaciones de mg/kg proporcionadas anteriormente de acuerdo con lo siguiente: dosis
20 $(\text{mg}/\text{kg}) \times \text{peso corporal}$ (p. ej., 50 - 100 kg). Tal administración puede repetirse, por ejemplo, 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 h, tal como de 2 a 12 h. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede

administrarse mediante infusión lenta y continua durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse en una dosificación semanal de calculada como una dosis fijada por

5 más de ocho veces, tal como de cuatro a seis veces cuando se da una vez por semana. Tal régimen puede repetirse una o más veces como sea necesario, por ejemplo, después de seis o doce meses. Tales dosificaciones fijas pueden, por ejemplo, basarse en las dosificaciones en mg/kg proporcionadas anteriormente, con un peso corporal estimado de 50 - 100 kg. La dosificación puede

10 determinarse o ajustarse mediante la medición de la cantidad de anticuerpo multiespecífico de la presente invención en la sangre después de la administración, por ejemplo, al extraer una muestra biológica y usar anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a los brazos de unión al antígeno GPRC5D y/o BCMA de los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

15 En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse mediante la terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana por un período de seis meses o más.

Un anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse, además, profilácticamente con el objetivo de reducir el riesgo de desarrollar cáncer,

20 retrasar la aparición de la ocurrencia de un evento en la progresión del cáncer, y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando el cáncer está en remisión.

Los anticuerpos o fragmentos multiespecíficos de estos como se describe en la presente descripción pueden administrarse, además, en terapia de combinación, es

decir, combinada con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección a tratar. En consecuencia, en una modalidad, el medicamento que contiene anticuerpos es para la combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico, un agente anti-CD38, un fármaco de imida

5 inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de regulación inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de células T (p. ej., adición de IL-2) o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente anti-CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38 (p. ej., daratumumab). En algunas modalidades, el agente

10 terapéutico adicional es un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), tal como lenalidomida y pomalidomida. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un inhibidor del punto de regulación inmunitario tal como el inmunorreceptor anti-PD-1 y anticélulas T con dominios Ig e ITIM (TIGIT). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un agente de coestimulación

15 inmunitaria, tal como agentes dirigidos a CD137 (p. ej., anticuerpo biespecífico coestimulador para CD137). En algunas modalidades, el otro agente terapéutico es citarabina, una antraciclina, dihidrocloruro de histamina, o interleucina 2. Tal administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial, en cualquier orden. Para la administración simultánea los agentes pueden administrarse

20 como una composición o como composiciones separadas, según se adecue.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar un trastorno que involucra las células que expresan GPRC5D y/o BCMA en un sujeto, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva

de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción, y la radioterapia a un sujeto que lo necesita. En una modalidad se proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, donde el método

5 comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo para BCMA x GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción, y la radioterapia a un sujeto que la necesita. Se proporciona la radioterapia, que puede comprender radiación o administración asociada de productos radiofarmacéuticos a un paciente. La

10 fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se trata (el tratamiento con radiación puede, por ejemplo, estar en forma de terapia de radiación de haz externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radioactivos que pueden usarse para poner en práctica tales métodos incluyen, p. ej., radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67,

15 tecnecio-99, yodo-123, yodo-131, actinio-225, e indio-111.

Kits

También proporcionados en la presente descripción se incluyen kits, p. e., que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este multiespecífico

20 descrito y las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmentos para matar los tipos de células particulares. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este

y, con mayor preferencia, un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este. Las instrucciones pueden incluir las indicaciones para usar el anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al
5 antígeno de este in vitro, in vivo o ex vivo.

Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este. El anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este puede estar en una forma liofilizada, forma líquida, u otra forma modificable para incluirla en un kit. El kit puede contener,
10 además, elementos adicionales necesarios para poner en práctica el método descrito en las instrucciones en el kit, tal como una solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinar con el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este para administrar el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este a un paciente.

15

Usos para el diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos multiespecíficos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para propósitos de diagnóstico. Por lo tanto, se proporcionan, además, composiciones para el diagnóstico que
20 comprenden un anticuerpo o fragmentos multiespecíficos como se define en la presente descripción, y para sus usos. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al

antígeno multiespecífico de este y, con mayor preferencia, un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3 de este. En una modalidad, la presente invención proporciona

5 un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo triespecífico para BCMA x GPRC5D x CD3, y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo al GPRC5D y/o BCMA. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas, u otras etiquetas detectables. Los reactivos pueden incluir,

10 además, anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente descripción, o fragmentos de unión al antígeno de estos, pueden marcarse con un radiomarcador, un marcador fluorescente, una etiqueta de

15 epítomos, biotina, un marcador cromóforo, un marcador ECL, una enzima, rutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, o polihistidina o similar a tales marcadores conocidos en la materia.

20 **Anticuerpos específicos para BCMA**

En la presente descripción se describen anticuerpos aislados y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA unen a BCMA humano.

La estructura general de una molécula de anticuerpo específico para BCMA puede comprender un dominio de unión al antígeno, que incluye las cadenas pesada y ligera, y el dominio de Fc, que sirve para una variedad de funciones, que incluyen la fijación del complemento y la unión de receptores de anticuerpo.

5 En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo específico para BCMA, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519). En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo específico para BCMA, o un
10 fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519) y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo específico para BCMA, o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 20, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 21 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 22. En algunas modalidades,
20 el brazo de unión a BCMA comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 20, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 21, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 22, una CDR1 de cadena ligera que

comprende la sec. con núm. de ident.: 17, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 19. El brazo de unión al BCMA puede comprender secuencias de marco humanas. En algunas modalidades, el brazo

5 de unión a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 24. En algunas modalidades, el brazo de unión a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 24 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec.

10 con núm. de ident.: 23. El dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera de los anticuerpos que se describen en este párrafo son adecuados para la inclusión en constructos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos o triespecíficos) en los que un brazo es un brazo anti-BCMA. En la presente descripción se proporcionan constructos triespecíficos ilustrativos que

15 comprenden el anticuerpo específico para BCMA, o un fragmento de unión al antígeno de este, descrito en este párrafo.

En algunas modalidades, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA unen a BCMA humano y BCMA de mono

cinomólogo. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al

20 antígeno específicos para BCMA se unen al BCMA humano pero no al BCMA de mono cynomolgus. En algunas modalidades, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA se unen a un epítipo que incluye uno o más residuos del dominio extracelular (ECD) de BCMA. En algunas modalidades, el

anticuerpo específico para BCMA o fragmento de unión al antígeno se une a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de la cadena BCMW37 de BCMA. Tal anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para BCMA puede unirse al BCMA con una afinidad de 5×10^{-7} M o menor, tal como 1×10^{-7} M o menor, 5×10^{-8} M o menor, 1×10^{-8} M o menor, 5×10^{-9} M o menor, o 1×10^{-9} M, 5×10^{-10} o menor. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} M a 1×10^{-9} M. En una modalidad, el brazo de unión al BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} M, aproximadamente 2×10^{-10} M, aproximadamente 3×10^{-10} M, aproximadamente 4×10^{-10} M, aproximadamente 5×10^{-10} M, aproximadamente 6×10^{-10} M, aproximadamente 7×10^{-10} M, aproximadamente 8×10^{-10} M, aproximadamente 9×10^{-10} M o aproximadamente 1×10^{-9} M. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente $8,4 \times 10^{-10}$ M según lo determinado por un ensayo de resonancia del plasmón de superficie (SPR). En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para BCMA se une al BCMA con una afinidad de aproximadamente $2,1 \times 10^{-10}$ M según lo determinado por un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR).

La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc pero muestran grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente

de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores de Fc (FcγR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias tales como las células destructoras naturales y los macrófagos, lo que conduce a la fagocitosis o lisis de las células diana. En la CDC, los anticuerpos matan las células diana mediante la activación de la cascada de complemento en la superficie celular. Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen los anticuerpos con las características descritas de los dominios variables en combinación con cualquiera de los isotipos IgG, que incluyen versiones modificadas en las que la secuencia Fc se ha modificado para lograr las funciones efectoras.

Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones efectoras mediadas por Fc no forman parte del mecanismo de acción. Estas funciones efectoras mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan, potencialmente, un riesgo de seguridad al provocar toxicidad fuera del mecanismo. La modificación de las funciones efectoras puede lograrse mediante el diseño por ingeniería de las regiones Fc para reducir su unión a los FcγR o los factores del complemento. La unión de IgG a los FcγR activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 y IgG4 para reducir o silenciar las funcionalidades de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida para el FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb y/o el FcγRIIIa, (c) afinidad reducida para el FcγRI, (d) afinidad reducida para el FcγRIIa, (e) afinidad reducida para el FcγRIIb, (f) afinidad reducida para el FcγRIIIb o (g) afinidad reducida para el FcγRIIIa.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo tiene un isotipo IgG4, el anticuerpo contiene las sustituciones L234A, L235A, D265S y K409R en su región Fc. En algunas modalidades en donde el anticuerpo tiene un isotipo IgG4, el anticuerpo contiene sustituciones de K409R, S228P, L234A, y L235A en su región Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos pueden ser capaces de inhibir la unión de APRIL con un CI_{50} de bajo nanomolar según lo medido por ELISA. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos pueden ser capaces de inhibir la unión de BAFF con un CI_{50} de bajo micromolar según lo medido por ELISA.

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos se unen a líneas celulares de mieloma múltiple positivas a BCMA.

Además de los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos, se proporcionan, además, secuencias de polinucleótidos con la capacidad de codificar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno descritos. En la presente descripción se proporcionan vectores

que comprenden los polinucleótidos descritos, así como células que expresan los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA.

Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos.

Estas células pueden ser de mamífero (tales como las células 293, células 293F,

5 células de CHO), células de insecto (tales como las células Sf7), células de

levadura, células de plantas o células bacterianas (tales como de E. coli).

Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para

BCMA descritos incluyen todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y los

10 multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulinas de cuatro cadenas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos incluyen, además,

el isotipo IgY que se encuentra generalmente en suero de gallina o pavo y en

yema de huevo de gallina y pavo.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA

15 pueden derivarse de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo,

los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser de ratón, rata,

cabra, caballo, cerdo, bovinos, gallina, conejo, camélido, asno, o humano, o una

versión quimérica de estos. Para el uso en la administración a humanos, los

anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos

20 pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos tras la

administración a un paciente humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al

antígeno son quiméricos. Como se usa en la presente descripción, el término

“quimérico” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que tiene al menos alguna porción de al menos un dominio variable derivado de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero que no es humano, un roedor, o un reptil, mientras las porciones del anticuerpo, o del fragmento de
5 unión al antígeno de este, se derivan de un humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia
10 mínima derivada de una inmunoglobulina que no es humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de un CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad,
15 afinidad, y capacidad deseadas. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana, y sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El
20 anticuerpo humanizado puede incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden existir en una variedad de formas, pero incluirán una o más de las CDR de anticuerpo que se muestran en las Tablas 1 (p. ej., BCMB519)

En la presente descripción se describen anticuerpos y fragmentos de
 5 unión al antígeno recombinantes que se unen al BCMA. En algunas modalidades, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA son IgG humana, o derivados de esta. Si bien los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA ejemplificados en la presente descripción son humanos, los anticuerpos o los fragmentos de unión al
 10 antígeno ejemplificados pueden quimerizarse.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG1, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 (sec. con núm. de ident.: 158).

15 Sec. con núm. de ident.: 158

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 20 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

En algunas modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG1, el anticuerpo comprende las sustituciones L234A, L235A, y D265S (subrayadas) en su región Fc (sec. con núm. de ident.: 159).

Sec. con núm. de ident.: 159

5 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
10 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

En algunas modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG4, el anticuerpo comprende las sustituciones S228P, L234A, y L235A (subrayado) en su región Fc (sec. con núm. de ident.: 160).

15 Sec. con núm. de ident.: 160

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
20 KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Los anticuerpos específicos para BCMA definidos por la secuencia del dominio variable y/o de la CDR descrita en los párrafos anteriores puede incluir estas regiones Fc de IgG.

5 También se describen polinucleótidos sintéticos aislados que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen al BCMA. Los polinucleótidos aislados capaces de codificar los segmentos de dominio variable proporcionados en la presente descripción pueden incluir los mismos, o diferentes, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

10 Los polinucleótidos que codifican proteínas recombinantes de unión al antígeno están, además, dentro del alcance de la descripción. En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos (y los polipéptidos que ellos codifican) incluyen una secuencia líder. Puede usarse cualquier secuencia líder conocida en la técnica. La secuencia líder puede incluir, pero sin limitarse a, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

15 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos en la presente descripción incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos únicas o múltiples que retengan las propiedades biológicas (por ejemplo, la afinidad de unión o la actividad efectora inmune) de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno
20 específicos para BCMA descritos. En el contexto de la presente invención, las siguientes notaciones se usan, a menos que se indique de cualquier otra forma, para describir una mutación; i) la sustitución de un aminoácido en una posición dada se escribe como, por ejemplo K409R, lo que significa una sustitución de

una lisina en la posición 409 con una arginina; y ii) para variantes específicas los códigos específicos de una o tres letras, que incluyen los códigos Xaa y X, se usan para indicar cualquier residuo de aminoácidos. Por lo tanto, la sustitución de Arginina por Lisina en la posición 409 se designa como: K409R, o la

5 sustitución de cualquier residuo de aminoácido por Lisina en la posición 409 se designa como K409X. En el caso de delección de Lisina en la posición 409 esta se indica por K409*. La persona con experiencia puede producir variantes que tienen sustituciones, delecciones, o adiciones únicas o múltiples de aminoácidos.

Estas variantes pueden incluir: (a) variantes en las que se sustituyen uno o

10 más residuos de aminoácidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden o se delecionan uno o más aminoácidos del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que se fusiona el polipéptido con otro péptido o polipéptido tales como una pareja de fusión, una etiqueta de

15 proteína u otra porción química, que pueden conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, una porción de biotina y lo similar. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden incluir variantes en las que se sustituyen los residuos de aminoácidos de una

20 especie por el residuo correspondiente en otras especies, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas se sustituyen con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas para obtener estas variantes,

que incluyen técnicas genéticas (deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, se conocen bien por las personas con experiencia en la materia.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos en la presente descripción pueden incorporar varios isotipos de anticuerpos, tales como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En algunas modalidades el isotipo de anticuerpos es isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, preferentemente, isotipo IgG1 o IgG4. La especificidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se determina en buena parte por la secuencia de aminoácido, por la disposición, o las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo pueden transferirse a otro isotipo sin alterar la especificidad por el antígeno. Alternativamente, las técnicas se han establecido para producir hibridomas que cambien la producción de un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad por el antígeno. En consecuencia, tales isotipos de anticuerpo están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA que se describen en la presente descripción tienen valores de IC_{50} de bajo nanomolar para la unión de APRIL. La IC_{50} de los anticuerpos específicos para BCMA, o fragmentos de unión a antígenos descritos, puede determinarse mediante un variedad de métodos conocidos en la materia, tales como métodos a base de ELISA o mediante citometría de flujo (FACS). Los ensayos para medir IC_{50} mediante ELISA tienen BCMA unido a placas en presencia y ausencia de un anticuerpo específico para BCMA y se usan concentraciones variables de

APRIL. Un anticuerpo para BCMA que bloquea la unión de APRIL a BCMA es para “bloquear APRIL como se mide por ELISA.”

Además, se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente descripción. Los vectores pueden ser vectores de expresión.

5 Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés se consideran dentro del alcance de esta descripción. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero sin limitarse a, secuencias reguladoras (p. ej., promotoras, potenciadoras), un marcador de selección y una señal de poliadenilación. Los vectores para transformar
10 una amplia variedad de células huésped se conocen bien e incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como además otros vectores bacterianos, de levaduras y virales.

Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la
15 descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos, o derivados de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados. Tales elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias
20 que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos, puede incluir, además, uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado unido al gen a expresar,

otras secuencias flanqueantes 5' o 3' sin transcribir, secuencias 5' o 3' sin transcribir (tales como los sitios necesarios de unión a ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios de corte donantes y aceptores, o secuencias de terminación transcripcional. También puede incorporarse un origen de
5 replicación que confiere la capacidad de replicarse en un huésped.

Las secuencias control transcripcionales y traduccionales en los vectores de expresión para usarlas en las células de vertebrados transformantes pueden proporcionarse por fuentes virales. Los vectores ilustrativos pueden construirse como se describe por Okayama y Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

10 En algunas modalidades, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo poderoso, tales como los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina deaminasa, piruvato
15 cinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana, y otros. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. Tales promotores virales incluyen sin limitación, citomegalovirus (CMV) promotor temprano inmediato, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), las
20 repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Maloney, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), et al. retrovirus, y el promotor cinasa de timidina del virus del herpes simple. En una modalidad, la secuencia que codifica el

anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este específico para BCMA se coloca bajo el control de un promotor inducible, tal como el promotor de metalotioneína, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por doxiciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta
5 estimulados por interferón (ISRE), tales como la proteína quinasa R, 2',5'oligoadenilato sintetasa, genes Mx, ADAR1 y lo similar.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden contener uno o más sitios de entrada al ribosoma internos (IRES). La inclusión de una secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para
10 potenciar la expresión de algunas proteínas. En algunas modalidades, el sistema de vectores incluirá uno o más sitios de poliadenilación (p. ej., SV40), que puede estar corriente arriba o corriente abajo de cualquier secuencia de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente. Los componentes vectoriales pueden unirse contiguamente o disponerse de una manera que proporcione la
15 separación óptima para expresar los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos “espaciadores” entre los ORF), o colocarse de otra manera. Los elementos regulatorios, tales como los motivos IRES, pueden disponerse, además, para proporcionar espacio óptimo para la expresión.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección, que se conocen
20 bien en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a

penicilina, un gen de resistencia a la puromicina, un gen de resistencia la blasticidina), genes de la glutamato sintasa, derivados de HSV-TK, HSV-TK para la selección con ganciclovir, o gen de la purina nucleósido fosforilasa bacteriana para la selección con 6-metilpurina (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Una

5 secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden usarse para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o

10 fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, pueden usarse los vectores para generar las células productoras del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para BCMA. Por lo tanto, otro aspecto presenta células huésped transformadas con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que

15 se une específicamente a BCMA, tal como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos y ejemplificados en la presente descripción.

Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células y pueden usarse para construir las células recombinantes para propósitos de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las varias

20 modalidades descritas y ejemplificadas en la presente descripción. La técnica usada proporcionaría la transferencia estable de la secuencia de genes heterólogos a la célula huésped, tal que la secuencia de genes heterólogos sea heredable y expresable por la progenie celular, y de manera que no se afecten las funciones de

desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la transferencia de cromosomas (p. ej., fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por micro células), métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de
 5 esferoplastos, microinyección, electroporación, portador de liposomas), transferencia de vectores virales (p. ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y lo similar (descritas en Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)). La precipitación con fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamíferos pueden usarse para transformar células.

10 Las células adecuadas para usar en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos en la presente descripción son, preferentemente, células eucarióticas, con mayor preferencia, células de plantas, roedores o de origen humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, células HEK293,
 15 COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0, y líneas celulares BHK, entre otras. En adición, la expresión de anticuerpos puede lograrse mediante el uso de células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

Las células transformadas con vectores de expresión descritos en la
 20 presente descripción pueden seleccionarse o examinarse para determinar la expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción. Las células recombinantes positivas se expanden y se examinan para determinar los subclones que exhiben un fenotipo

deseado, tales como una expresión de alto nivel, propiedades de crecimiento mejoradas, o la capacidad para producir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de la proteína o modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a las propiedades inherentes de un subclón dado o la mutación. Las mutaciones pueden efectuarse a través del uso de productos químicos, luz UV de longitud de onda, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación ADN no coincidente, o una combinación de tales métodos.

10 **Métodos para usar anticuerpos específicos para BCMA para tratamiento**

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos específicos para BCMA para usar en terapia. Particularmente, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer que expresa el BCMA, u otros trastornos que expresan el BCMA. Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar cáncer; el método comprende administrar un anticuerpo como se describe en la presente descripción, tal como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA. Por ejemplo, el uso puede ser al interferir con las interacciones receptor-BCMA o donde el anticuerpo está conjugado con una toxina, para direccionar la toxina al cáncer que expresa BCMA. En algunas modalidades, el cáncer o trastorno que expresa el BCMA incluye linfoma, tal como mieloma múltiple (MM) que incluye el mieloma múltiple quiescente (SMM), o amiloidosis, leucemia de células plasmáticas y lupus. En

algunas modalidades, el cáncer que expresa BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. Los anticuerpos para usar en estos métodos incluyen aquellos descritos anteriormente en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento
5 de unión al antígeno específico para BCMA con las características que se presentan en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519), por ejemplo las secuencias de CDR o de dominio variable, y en la descripción adicional de estos anticuerpos.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, las propiedades inmunoefectoras de los anticuerpos específicos para BCMA pueden potenciarse o
10 silenciarse a través de modificaciones de Fc mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica y que se describe en la presente descripción. Por ejemplo, las funciones efectoras de Fc, tales como unión a Clq, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP),
15 regulación negativa de los receptores de superficie celular (p. ej., el receptor de las células B; BCR), etc. pueden proporcionarse y/o controlarse por la modificación de residuos en el Fc responsable de estas actividades.

“Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no
20 específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (p. ej., células destructoras naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula objetivo y provocan, subsecuentemente, lisis de la célula objetivo.

La habilidad de los anticuerpos monoclonales para inducir ADCC puede mejorarse por la modificación de sus componentes oligosacáridos. La IgG1 o IgG3 humanas están N-glicosiladas en la Asn297 con la mayoría de los glicanos en las formas biantenarias bien conocidas G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. Los anticuerpos

5 producidos por células CHO no manipuladas genéticamente tienen, típicamente, un contenido del glicano fucosa de aproximadamente al menos 85 %. La eliminación del núcleo de fucosa del oligosacárido tipo complejo biantenario unido a la región Fc aumenta la ADCC de los anticuerpos a través de la unión mejorada a FcγRIIIa sin alterar la unión del antígeno o la actividad CDC. Tales mAbs pueden lograrse por

10 medio del uso de diferentes métodos que se informó llevan a la expresión exitosa de anticuerpos con relativamente alta desfucocilados que portan oligosacárido del Fc tipo complejo biantenario tales como el control de la osmolalidad del cultivo (Konno et al., Cytotechnology 64:249-65, 2012), la aplicación de una variante de la línea CHO Lec13 como la línea celular huésped (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-26740,

15 2002), la aplicación de una variante de la línea CHO EB66 como la línea celular huésped (Olivier et al., MAbs; 2(4), 2010; Publicación electrónica antes de la impresión; PMID:20562582), aplicación de una línea celular YB2/0 de hibridoma como la línea celular huésped (Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), introducción de ARN de interferencia pequeño específicamente contra la α . El gen

20 de la 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004), o la coexpresión de la β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y de la α -manosidasa II de Golgi o de un inhibidor potente de la α -manosidasa I, cifunensina (Ferrara et al.,

J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la ADCC provocada por los anticuerpos de BCMA pueden mejorarse, además, mediante ciertas sustituciones en la región Fc de los anticuerpos. Las sustituciones ilustrativas son por ejemplo las sustituciones en las posiciones de los aminoácidos 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 (numeración de residuos de acuerdo como se describe en la patente de los EE.UU. núm. 6.737.056.

10 **Métodos para detectar BCMA**

En la presente descripción se proporcionan métodos para detectar el BCMA en una muestra biológica al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la muestra puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células circulantes tumorales, células que no están asociadas a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral extirpado quirúrgicamente, biopsias, incluida la aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar. En algunas modalidades los métodos descritos incluyen detectar el BCMA en una muestra biológica al poner en contacto la muestra con cualquiera de los anticuerpos específicos para BCMA o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, la muestra puede ponerse en contacto con más de uno de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA

descritos en la presente descripción. Por ejemplo, una muestra puede ponerse en contacto con un primer anticuerpo específico para BCMA, o fragmento de unión al antígeno de este, y después ponerse en contacto con un segundo anticuerpo específico para BCMA, o fragmento de unión al antígeno de este, en donde el

5 primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno no son el mismo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas modalidades, el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, puede fijarse a una superficie, tal como una placa de múltiples pocillos, chip, o sustrato similar antes de poner en contacto la muestra. En otras

10 modalidades el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, puede no fijarse, o unirse, a algo antes de poner en contacto la muestra.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos pueden marcarse de manera detectable. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno marcados pueden facilitar la

15 detección del BCMA a través de los métodos descritos en la presente descripción. Muchos de dichos marcadores son muy conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Por ejemplo, los marcadores adecuados incluyen, pero no deben considerarse limitados a, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, etiquetas de epítopos, biotina, marcadores cromóforos, marcadores ECL, o enzimas. Más

20 específicamente, los marcadores descritos incluyen reutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, polihistidina (etiqueta de HIS), colorantes de acridina,

colorantes de cianina, colorantes de fluorona, colorantes de oxazina, colorantes de fenantridina, colorantes de rodamina, colorantes de Alexafluor®, y lo similar.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA descritos pueden usarse en una variedad de ensayos para detectar

5 BCMA en una muestra biológica. Algunos ensayos adecuados incluyen, pero no deben considerarse limitados a, análisis de western blot, radioinmunoensayo, resonancia de plasmones superficiales, inmunofluorometría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células

10 activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la detección de células cancerígenas que expresan BCMA en un sujeto puede usarse para determinar que el sujeto puede tratarse con un agente terapéutico dirigido contra BCMA.

15 BCMA está presente a niveles detectables en muestras de sangre y suero. Por lo tanto, en la presente descripción se proporcionan métodos para detectar el BCMA en una muestra derivada de sangre, tal como una muestra de suero, al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se una específicamente al BCMA. La muestra de sangre, o derivados

20 de esta, puede diluirse, fraccionarse, de cualquier otra manera procesarse para rendir una muestra a la que se le puede realizar el método descrito. En algunas modalidades, BCMA puede detectarse en una muestra de sangre, o un derivado de esta, mediante cualquier número de ensayos conocidos en la materia, tales

como, pero sin limitarse a, análisis western blot, radioinmunoensayo, resonancia de plasmones superficiales, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o
5 ensayo ELISA. En algunas modalidades, los métodos son métodos *in vitro*.

Métodos para diagnosticar un cáncer o trastorno

En la presente descripción se proporcionan métodos para diagnosticar un cáncer que expresa el BCMA en un sujeto. En algunas modalidades, el cáncer o
10 trastorno que expresa BCMA incluye linfomas, tales como mieloma múltiple (MM) que incluye mieloma múltiple quiescente (SMM), o amiloidosis, leucemia de células plasmáticas y lupus. En algunas modalidades, como se describe anteriormente, la detección de BCMA en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o una muestra de suero, proporciona la capacidad para diagnosticar cáncer en el
15 sujeto del que se obtuvo la muestra. Alternativamente, en algunas modalidades pueden usarse, además, otras muestras tales como una muestra histológica, una muestra de aspirado con aguja fina, tejido tumoral resecado, células circulantes, células tumorales circulantes, y lo similar, para evaluar si el sujeto del que se obtuvo la muestra tiene cáncer. En algunas modalidades, puede conocerse que el
20 sujeto del que se obtuvo la muestra tiene cáncer, pero el tipo de cáncer que afecta al sujeto puede no haberse diagnosticado aún o un diagnóstico preliminar puede ser poco claro; por lo tanto, la detección de BCMA en una muestra biológica obtenida de un sujeto puede permitir, o aclarar, el diagnóstico del cáncer. Por

ejemplo, puede conocerse que un sujeto tiene cáncer, pero puede que no se conozca, o puede ser poco claro, si el cáncer del sujeto es del que expresa BCMA.

En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un sujeto está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA mediante la

5 determinación de la cantidad de BCMA que se presenta en una muestra biológica derivada del sujeto; y comparar la cantidad observada de BCMA con la cantidad de BCMA en una muestra control, o de referencia, en donde una diferencia entre la cantidad de BCMA en la muestra derivada del sujeto y la cantidad de BCMA en la muestra control, o de referencia, es un indicio de que el

10 sujeto tiene un cáncer o trastorno que expresa BCMA. En otra modalidad la cantidad de BCMA observada en una muestra biológica obtenida de un sujeto puede compararse con niveles de BCMA conocidos por asociarse con ciertas formas o etapas de cáncer, para determinar la forma o etapa del cáncer del sujeto. En algunas modalidades, se evalúa la cantidad de BCMA en la muestra

15 derivada del sujeto al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une al BCMA, tal como anticuerpos específicos para BCMA descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de BCMA puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes,

20 y células que no se asocian a tejidos (*es decir*, células libres), tejidos (*por ejemplo*, tejido tumoral que se extrae quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar. En algunas modalidades, el cáncer o trastorno que expresa el BCMA incluye cáncer

hematológico, tal como mieloma múltiple (MM) que incluye mieloma múltiple quiescente (SMM), o amiloidosis, leucemia de células plasmáticas y lupus. En algunas modalidades, el cáncer que expresa el BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de
5 mieloma múltiple. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades el método para diagnosticar un cáncer o trastorno que expresa BCMA implicará: poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo específico para BCMA, o un fragmento de unión al antígeno de este (tales como los derivables de los anticuerpos y fragmentos proporcionados en la
10 Tabla 1 (p. ej., BCMB519)), cuantificar la cantidad de BCMA presente en la muestra que se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, comparar la cantidad de BCMA presente en la muestra con una muestra estándar o de referencia conocida; y determinar si los niveles de BCMA del sujeto están dentro de los niveles de BCMA asociados con el cáncer o trastorno. En una modalidad adicional, el
15 método de diagnóstico puede ir seguido de una etapa adicional de administración o prescripción de un tratamiento específico para BCMA. En otra modalidad, el método de diagnóstico puede ir seguido de una etapa adicional de transmisión de los resultados de la determinación para facilitar el tratamiento del cáncer o trastorno. En algunas modalidades, el tratamiento específico para BCMA puede dirigirse contra los
20 cánceres o trastornos que expresan el BCMA, tales como los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x CD3 descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un sujeto está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA al

determinar la cantidad de BCMA que está presente en una muestra de sangre o suero obtenida del sujeto; y comparar la cantidad observada de BCMA con la cantidad de BCMA en una muestra control, o de referencia, en donde una diferencia entre la cantidad de BCMA en la muestra derivada del sujeto y la

5 cantidad de BCMA en la muestra control, o de referencia, es un indicio de que el sujeto tiene un cáncer o trastorno que expresa BCMA.

En algunas modalidades, la muestra control, o de referencia, puede derivarse de un sujeto que no está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. En algunas modalidades, la muestra control, o de referencia,

10 puede derivarse de un sujeto que está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. En algunas modalidades donde la muestra control, o de referencia, se deriva de un sujeto que no está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA, un aumento observado en la cantidad de BCMA presente en la muestra de prueba, en relación con la observada para la muestra control o

15 de referencia, es un indicio de que el sujeto que está en evaluación tiene un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. En algunas modalidades donde la muestra control se deriva de un sujeto que no está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA, una disminución o similitud observada en la cantidad de BCMA presente en la muestra de prueba, en relación con la

20 observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto que está en evaluación no está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. En algunas modalidades, cuando la muestra control o de referencia se deriva de un sujeto que está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el

BCMA, una similitud observada en la cantidad de BCMA presente en la muestra de prueba, en relación con la observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto que está en evaluación está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. En algunas modalidades, cuando la muestra control o de referencia se deriva de un sujeto afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA, una disminución observada en la cantidad de BCMA presente en la muestra de prueba, en relación con la observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto que está en evaluación no está afectado por un cáncer o trastorno que expresa el BCMA.

En algunas modalidades, la cantidad de BCMA en la muestra derivada del sujeto se evalúa al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA, tal como los anticuerpos descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de BCMA puede derivarse de una muestra de sangre, una muestra de suero, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos (*es decir*, células libres), tejidos (*por ejemplo*, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar.

En varios aspectos, la cantidad de BCMA se determina al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. En algunas modalidades, la muestra puede entrar en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. En algunas

modalidades, la muestra puede entrar en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA y, después, entrar en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. Los anticuerpos o

5 fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA tales como los descritos en la presente descripción pueden usarse para esta capacidad.

Varias combinaciones de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para BCMA pueden usarse para proporcionar un “primer” y un “segundo” anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los

10 métodos de diagnóstico descritos. En algunas modalidades, el cáncer o trastorno que expresa el BCMA incluye linfomas, tales como mieloma múltiple (MM) que incluye mieloma múltiple quiescente (SMM). En algunas modalidades, el cáncer que expresa BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple.

15 En ciertas modalidades, la cantidad de BCMA se determina por análisis de Western blot, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

20 En varias modalidades de los métodos de diagnóstico descritos se usa una muestra control o de referencia. Esta muestra podría ser un control de ensayo positivo o negativo que asegura que el ensayo usado funciona adecuadamente; por ejemplo, un control de ensayo de esta naturaleza podría usarse comúnmente para

ensayos de inmunohistoquímica. Alternativamente, la muestra puede ser una referencia estandarizada para la cantidad de BCMA en una muestra biológica de un sujeto sano. En algunas modalidades, los niveles de BCMA observados del sujeto de prueba pueden compararse con los niveles de BCMA observados en muestras de sujetos que se sabe que tienen un cáncer o trastorno que expresa BCMA. En algunas modalidades, el sujeto de control puede afectarse con un cáncer o trastorno de interés particular. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa temprana, que puede ser o no un cáncer que expresa BCMA. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa intermedia, que puede ser o no un cáncer que expresa BCMA. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa final, que puede ser o no un cáncer que expresa BCMA. En algunas modalidades, los métodos para diagnosticar cáncer o un trastorno son métodos *in vitro*.

15 **Métodos para monitorear un cáncer o trastorno**

En la presente descripción se proporcionan métodos para monitorear un cáncer o trastorno que expresa el BCMA en un sujeto. En algunas modalidades, el cáncer o trastorno que expresa BCMA incluye linfomas, tales como mieloma múltiple (MM) que incluye mieloma múltiple quiescente (SMM), o amiloidosis, leucemia de células plasmáticas y lupus. En algunas modalidades, el cáncer que expresa BCMA es una forma de recaída o refractaria de un linfoma, tal como una forma de recaída o refractaria de mieloma múltiple. En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un cáncer o trastorno que expresa BCMA

progresar, retroceder o permanecer estable al determinar la cantidad de BCMA que se encuentra presente en una muestra biológica derivada del sujeto; y al comparar la cantidad observada de BCMA con la cantidad de BCMA en una muestra biológica obtenida, de una manera similar, del sujeto a un punto de tiempo anterior, en donde una diferencia entre la cantidad de BCMA en la muestra de prueba y la muestra anterior proporciona un indicio de si el cáncer progresa, retrocede, o permanece estable. Con respecto a esto, una muestra de prueba con un aumento en la cantidad de BCMA, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar la progresión de un cáncer o trastorno que expresa el BCMA. Por el contrario, una muestra de prueba con una cantidad reducida de BCMA, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar una regresión de un cáncer o trastorno que expresa BCMA.

En consecuencia, una muestra de prueba con una diferencia insignificante en la cantidad de BCMA, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar un estado de enfermedad estable para un cáncer o trastorno que expresa BCMA. En algunas modalidades la cantidad de BCMA en una muestra biológica derivada del sujeto se evalúa al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a BCMA, tales como los anticuerpos descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de BCMA puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos (es decir, células libres), tejidos (por ejemplo, tejido tumoral que se extrae

quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, los métodos para monitorear un cáncer o trastorno que expresa BCMA implicará: poner en contacto una muestra biológica de un sujeto

5 con un anticuerpo específico para BCMA, o fragmento de unión al antígeno de este (tales como los derivables de los anticuerpos y fragmentos proporcionados en la Tabla 1 (p. ej., BCMB519), cuantificar la cantidad de BCMA presente en la muestra, comparar la cantidad de BCMA presente en la muestra a la cantidad de BCMA determinada a estar en una muestra biológica obtenida, de una manera similar, del

10 mismo sujeto en un punto anterior en el tiempo; y determinar si varió el nivel de BCMA del sujeto en el tiempo. Una muestra de prueba con un aumento en la cantidad de BCMA, con relación a la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar progresión del cáncer. Por el contrario, una muestra de prueba con una cantidad reducida de BCMA, en relación con la cantidad observada para la muestra

15 anterior, puede indicar una regresión de un cáncer o trastorno que expresa BCMA. En consecuencia, una muestra de prueba con una diferencia insignificante en la cantidad de BCMA, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar un estado de enfermedad estable para un cáncer o trastorno que expresa BCMA. En algunas modalidades, los niveles de BCMA de la muestra

20 pueden compararse a una muestra estándar o de referencia conocida, sola o en adición a los niveles de BCMA observados para una muestra evaluada en un punto anterior en el tiempo. En una modalidad adicional, el método de diagnóstico puede ser seguido de una etapa adicional de administración de un tratamiento específico

para BCMA. En algunas modalidades, el tratamiento específico para BCMA puede dirigirse contra los cánceres o trastornos que expresan el BCMA, tales como los anticuerpos multiespecíficos para BCMA x CD3 descritos en la presente descripción.

En varios aspectos, la cantidad de BCMA se determina al poner en
5 contacto la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. En algunas modalidades, la muestra puede entrar en contacto con más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. En algunas modalidades, la muestra puede entrar en contacto con un primer anticuerpo, o fragmento de
10 unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA y, después, entrar en contacto con un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente al BCMA. Los anticuerpos tales como los descritos en la presente descripción pueden usarse para esta capacidad.

Varias combinaciones de los anticuerpos y los fragmentos de unión al
15 antígeno descritos en la Tabla 1 pueden usarse para proporcionar un “primer” y un “segundo” anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los métodos de monitoreo. En algunas modalidades, el cáncer o trastorno que expresa el BCMA incluye un cáncer hematológico, tal como la leucemia mieloide aguda (LMA) o linfomas (p. ej., mieloma múltiple (MM), mieloma múltiple
20 quiescente (SMM), o amiloidosis, leucemia de células plasmáticas, y lupus.

En ciertas modalidades, la cantidad de BCMA se determina por análisis de Western blot, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL),

inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA. En algunas modalidades, los métodos son métodos *in vitro*.

Kits para detectar BCMA

5 En la presente descripción se proporcionan kits para detectar BCMA en una muestra biológica. Estos kits incluyen uno o más de los anticuerpos específicos para BCMA descritos en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno de este, y las instrucciones para usar el kit.

 El anticuerpo específico de BCMA, o el fragmento de unión al antígeno,
10 proporcionado podría estar en solución; liofilizado; fijado a un sustrato, un portador o una placa; o marcado detectablemente.

 Los kits descritos incluyen, además, componentes adicionales útiles para realizar los métodos descritos en la presente descripción. A modo de ejemplo, los kits pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, una muestra de
15 control o de referencia, *por ejemplo*, una muestra de un sujeto que tiene cáncer progresivo lento y/o un sujeto que no tiene cáncer, uno o más compartimentos de muestra y/o material de instrucción que describe el funcionamiento de un método de la invención y controles o estándares específicos de tejido.

 Los medios para determinar el nivel de BCMA pueden incluir, además, por
20 ejemplo, reguladores y otros reactivos para el uso en un ensayo para determinar el nivel de BCMA. Las instrucciones pueden ser, por ejemplo, instrucciones impresas para realizar el ensayo y/o instrucciones para evaluar el nivel de expresión de BCMA.

Los kits descritos pueden incluir, además, los medios para aislar una muestra de un sujeto. Estos medios pueden comprender uno o más artículos de equipamiento o reactivos que pueden usarse para obtener un fluido o tejido de un sujeto. Los instrumentos para obtener una muestra de un sujeto puede comprender, además, los
5 medios para aislar componentes de la sangre, tal como suero, de una muestra de sangre. Preferentemente, el kit se designa para el uso con un sujeto humano.

Modalidades

La descripción proporcionada en la presente descripción también
10 proporciona las siguientes modalidades no limitantes.

Modalidad 1. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

- (a) un primer brazo de unión al antígeno que comprende un primer dominio variable de cadena pesada (VH1) y un primer dominio variable de cadena ligera (VL1);
- 15 (b) un segundo brazo de unión al antígeno que comprende un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2);
- (c) un tercer brazo de unión al antígeno que comprende un tercer dominio variable de cadena pesada (VH3) y un tercer dominio variable de cadena ligera (VL3),
20 en donde el primer brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en el cúmulo de diferenciación 3 (CD3), el segundo brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en el miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la

proteína G (GPC5D) y el tercer brazo de unión al antígeno se une a un epítipo en el antígeno de maduración de células B (BCMA).

Modalidad 2. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 1, en donde el VH1 y VL1 del primer brazo de unión al antígeno están
5 presentes en un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv) o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ed), opcionalmente un Fab.

Modalidad 3. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 1 o 2, en donde el VH2 y VL2 del segundo brazo de unión al antígeno
10 están presentes en un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv) o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ed), opcionalmente un scFv.

Modalidad 4. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-3, en donde el VH3 y VL3 del tercer brazo
15 de unión al antígeno están presentes en un fragmento de anticuerpo, un diacuerpo, un Fab, Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un Fd, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv) o un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ed), opcionalmente un scFv.

Modalidad 5. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
20 cualquiera de las modalidades 1-4, en donde el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1, una HCDR2 y una HCDR3 del dominio variable de cadena pesada (VH1) de la sec. con núm. de ident.: 8 y una región determinante de

complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1, una LCDR2 y una LCDR3 del dominio variable de cadena ligera (VL1) de la sec. con núm. de ident.: 7.

Modalidad 6. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-5, en donde el primer brazo de unión al
 5 antígeno que se une a CD3 comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6); y una LCDR1 que
 10 comprende la secuencia de aminoácidos de TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3).

Modalidad 7. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
 15 una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende el VH1 de la sec. con núm. de ident.: 8 y el VL1 de la sec. con núm. de ident.: 7;

Modalidad 8. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-7, en donde el segundo brazo de unión al antígeno
 20 que se une al GPRC5D comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1, una HCDR2 y una HCDR3 del dominio variable de cadena pesada (VH2) de la sec. con núm. de ident.: 16 y una región determinante de

complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1, una LCDR2 y una LCDR3 del dominio variable de cadena ligera (VL2) de la sec. con núm. de ident.: 15.

Modalidad 9. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-8, en donde el segundo brazo de unión al
5 antígeno que se une a GPRC5D comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLTNIRMSVS (sec. con núm. de ident.: 12), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de HIFSNDEKS (sec. con núm. de ident.: 13), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de MRLPYGMDV (sec. con núm. de ident.: 14); y una LCDR1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de RSSQSLVHSDGNTYLS (sec. con núm. de ident.: 9), la LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KISNRFF (sec. con núm. de ident.: 10), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de MQATQFPHT(sec. con núm. de ident.: 11).

Modalidad 10. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
15 una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el VH2 de la sec. con núm. de ident.: 16 y el VL2 de la sec. con núm. de ident.: 15.

Modalidad 11. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-10, en donde el tercer brazo de unión al antígeno
20 que se une a BCMA comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1, una HCDR2 y una HCDR3 del dominio variable de cadena pesada (VH3) de la sec. con núm. de ident.: 24 y una región determinante de

complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1, una LCDR2 y una LCDR3 del dominio variable de cadena ligera (VL3) de la sec. con núm. de ident.: 23.

- Modalidad 12. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-11, en donde el tercer brazo de unión al
- 5 antígeno que se une a BCMA comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm. de ident.: 21), y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22); y una LCDR1 que
- 10 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT (sec. con núm. de ident.: 18), y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHYGSSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).
- Modalidad 13. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
- 15 una cualquiera de las modalidades 1-12, en donde el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende el VH3 de la sec. con núm. de ident.: 24 y el VL3 de la sec. con núm. de ident.: 23.
- Modalidad 14. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde el primer brazo de unión al
- 20 antígeno que se une a CD3 comprende la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 del VH1 de la sec. con núm. de ident.: 8 y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 7;

el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 del VH2 de la sec. con núm. de ident.: 16 y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 del VL2 de la sec. con núm. de ident.: 15; y

el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende la
 5 HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 del VH3 de la sec. con núm. de ident.: 24 y la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 del VL3 de la sec. con núm. de ident.: 23.

Modalidad 15. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-4 y 14, en donde el primer brazo de unión al antígeno que se une a CD3 comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1,
 10 la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 5, 6, 1, 2, y 3, respectivamente;

el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 12, 13, 14, 9, 10 y 11, respectivamente; y

15 el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 22, 17, 18 y 19, respectivamente.

Modalidad 16. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-4, 14 y 15, en donde el primer brazo de
 20 unión al antígeno que se une a CD3 comprende el VH1 de la sec. con núm. de ident.: 8 y el VL1 de la sec. con núm. de ident.: 7;

el segundo brazo de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el VH2 de la sec. con núm. de ident.: 16 y el VL2 de la sec. con núm. de ident.: 15; y

el tercer brazo de unión al antígeno que se une a BCMA comprende el VH3 de la sec. con núm. de ident.: 24 y el VL3 de la sec. con núm. de ident.: 23.

Modalidad 17. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de este de una cualquiera de las modalidades 1–16, el primer brazo de unión al antígeno

5 comprende un dominio de fragmento cristizable (Fc), y el segundo brazo de unión al antígeno o el tercer brazo de unión al antígeno comprende un dominio de Fc.

Modalidad 18. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de este de la modalidad 17, en donde los dominios de Fc comprenden una o más mutaciones que promueven la heterodimerización de los dominios de Fc.

10 Modalidad 19. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la modalidad 18, en donde las mutaciones se seleccionan de T366S, L368A, T366W e Y407V (numeración UE).

Modalidad 20. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de una cualquiera de las modalidades 17-19, en donde los dominios de Fc comprenden

15 además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a un receptor de Fcγ.

Modalidad 21. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la modalidad 20, en donde el receptor de Fcγ es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, y/o FcγRIIIB.

Modalidad 22. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la

20 modalidad 20 o 21, en donde los dominios de Fc comprenden una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S (numeración UE).

Modalidad 23. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 17-22, en donde los dominios de Fc comprenden además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a la proteína A.

Modalidad 24. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
5 modalidad 23, en donde el dominio de Fc comprende las mutaciones H435R y/o Y436F (numeración UE).

Modalidad 25. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 24, en donde el primer brazo de unión al antígeno que se une específicamente a los residuos 22-35
10 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena CD3ε.

Modalidad 26. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-25, en donde el primer brazo de unión al antígeno se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-8} a 1×10^{-7} M.

15 Modalidad 27. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 26, en donde el primer brazo de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-8} a 4×10^{-8} M.

Modalidad 28. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 27, en donde el tercer brazo de unión al
20 antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

Modalidad 29. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-28, en donde el tercer brazo de unión al

antígeno se une específicamente al BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} a 1×10^{-7} M.

Modalidad 30. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 29, en donde el tercer brazo de unión al antígeno se une específicamente
5 al BCMA con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-10} a 9×10^{-10} M.

Modalidad 31. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico, que comprende un primer brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo en el cúmulo de diferenciación 3 (CD3), un segundo brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo en el miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor
10 acoplado a la proteína G (GPRC5D), y el tercer brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo en el antígeno de maduración de células B (BCMA),

en donde el primer brazo de unión al antígeno comprende un polipéptido de cadena pesada (HC1) y un polipéptido de cadena ligera (LC); y

en donde el anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico
15 de este, comprende un polipéptido único que comprende el segundo brazo de unión al antígeno y el tercer brazo de unión al antígeno.

Modalidad 32. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 31, en donde la HC1 del primer brazo de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26.

20 Modalidad 33. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 32, en donde la LC del primer brazo de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27.

Modalidad 34. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 32 o 33, en donde el polipéptido que comprende el segundo brazo de unión al antígeno y el tercer brazo de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

- 5 Modalidad 35. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 31, en donde el primer brazo de unión al antígeno comprende una HC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26, y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, y el polipéptido que comprende el segundo brazo de unión al
- 10 antígeno y el tercer brazo de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

- Modalidad 36. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico, que comprende un primer brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo en el cúmulo de diferenciación 3 (CD3), un segundo brazo de unión al antígeno
- 15 que se une a un epítipo en el miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D), y el tercer brazo de unión al antígeno que se une a un epítipo en el antígeno de maduración de células B (BCMA),

- en donde el primer brazo de unión al antígeno comprende un polipéptido de la cadena pesada (HC1) y un polipéptido de la cadena ligera (LC), en donde
- 20 el polipéptido de la cadena ligera (HC1) comprende además el segundo brazo de unión al antígeno,

en donde el anticuerpo trispecífico, o un fragmento de unión trispecífico de este, comprende además un polipéptido único que comprende el tercer brazo de unión al antígeno.

Modalidad 37. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la
5 modalidad 36, en donde la HC1 del primer brazo de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29.

Modalidad 38. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la modalidad 36 o 37, en donde la LC del primer brazo de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30.

10 Modalidad 39. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de una cualquiera de las modalidades 36-38, en donde el polipéptido único que comprende el tercer brazo de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31.

Modalidad 40. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de la
15 modalidad 36, en donde el primer brazo de unión al antígeno comprende una HC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29, y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30, y el polipéptido único que comprende el tercer brazo de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31.

20 Modalidad 41. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de una cualquiera de las modalidades 1-40, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Modalidad 42. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1-41, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1.

Modalidad 43. Un polinucleótido sintético que codifica el anticuerpo triespecífico
5 o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42.

Modalidad 44. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Modalidad 45. La composición farmacéutica de la modalidad 44, en donde la
10 composición farmacéutica comprende además un segundo agente terapéutico.

Modalidad 46. La composición farmacéutica de la modalidad 45, en donde el segundo agente terapéutico comprende un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de regulación inmunitario, un agente de coestimulación inmunitario, un inhibidor de gamma secretasa, un
15 potenciador de células T, o cualquier combinación de estos

Modalidad 47. Una célula que expresa el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42.

Modalidad 48. La célula de la modalidad 47, en donde la célula es un hibridoma.

Modalidad 49. La célula de la modalidad 47, en donde el anticuerpo triespecífico
20 se produce de manera recombinante.

Modalidad 50. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una

cualquiera de las modalidades 1 a 42 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 43-46.

Modalidad 51. El método de la modalidad 50, en donde el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico o la composición farmacéutica se
5 administra durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

Modalidad 52. Un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa, dicho método comprende administrar a dicha célula una cantidad efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42 o la composición farmacéutica de
10 una cualquiera de las modalidades 43-46, en donde dicha cantidad efectiva es suficiente para inhibir el crecimiento o la proliferación de dicha célula cancerosa.

Modalidad 53. El método de la modalidad 52, en donde dicha célula cancerosa está en un sujeto y el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico o la composición farmacéutica se administra al sujeto.

15 Modalidad 54. El método de la modalidad 52, en donde dicha administración se realiza *ex vivo*.

Modalidad 55. Un método para redirigir una célula T a células cancerosas que expresan BCMA y/o GPRC5D en un sujeto que lo necesita, dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva
20 del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 43-46.

Modalidad 56. El método de la modalidad 55, en donde la dicha cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para dirigir dicha respuesta de células T a dichas células cancerosas.

Modalidad 57. El método de una cualquiera de las modalidades 50-56, en donde
5 el cáncer es un cáncer hematológico.

Modalidad 58. El método de la modalidad 57, en donde el cáncer hematológico es un cáncer de células B que expresan BCMA y/o GPRC5D.

Modalidad 59. El método de la modalidad 58, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA y/o GPRC5D es mieloma múltiple.

10 Modalidad 60. El método de la modalidad 59, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA y/o GPRC5D es mieloma múltiple quiescente (SMM, por sus siglas en inglés).

Modalidad 61. El método de una cualquiera de las modalidades 50-60, en donde el cáncer es cáncer recidivante, resistente, o maligno, o cualquier combinación
15 de estos.

Modalidad 62. El método de una cualquiera de las modalidades 50-51, 53 y 55-61, en donde el sujeto ha recibido un tratamiento previo.

Modalidad 63. El método de la modalidad 62, el tratamiento previo comprende un inhibidor de proteasoma, un fármaco inmunomodulador, un anticuerpo contra
20 CD38, un agente biespecífico, una terapia con CAR-T o una combinación de estos.

Modalidad 64. El método de una cualquiera de las modalidades 50-63, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

- Modalidad 65. El método de la modalidad 64, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una terapia contra el cáncer dirigida.
- Modalidad 66. El método de la modalidad 65, en donde el agente quimioterapéutico es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina, o interleucina 2 (IL-2).
- 5 Modalidad 67. El método de la modalidad 64, en donde el segundo agente terapéutico es un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de control inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de células T o cualquier combinación de estos.
- 10 Modalidad 68. El método de una cualquiera de las modalidades 50-51, 53 y 55-67, en donde el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico, o la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y/o subcutánea al sujeto.
- Modalidad 69. El método de una cualquiera de las modalidades 50-51, 53 y 55-68,
- 15 en donde el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico, o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea al sujeto.
- Modalidad 70. Un método para generar el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42, en donde dicho método comprende cultivar la célula de una cualquiera de las modalidades
- 20 47 a 49 y aislar dicho anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico.
- Modalidad 71. Un kit que comprende (i) el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 1 a 42 y/o un polinucleótido de la modalidad 43 y (ii) el envase para el mismo.

Modalidad 72. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une a BCMA, que comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una CDR2 de
5 cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm. de ident.: 21), y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22).

Modalidad 73. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 72, que comprende además: una región determinante de complementariedad de
10 cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de GASSRAT(sec. con núm. de ident.: 18), y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de QHYGSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).

15 Modalidad 74. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 72 o 73, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

Modalidad 75. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-74, que comprende un dominio variable de cadena ligera
20 (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.

Modalidad 76. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-75, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al

antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

Modalidad 77. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-76, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al

5 antígeno se une específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} a 1×10^{-7} M.

Modalidad 78. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 77, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente al BCMA con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-10} a 9×10^{-10} M.

10 Modalidad 79. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-78, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno humano.

Modalidad 80. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-79, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al

15 antígeno es recombinante.

Modalidad 81. El fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72 a 80, en donde el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab2, o un anticuerpo de cadena simple.

Modalidad 82. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera

20 de las modalidades 72-81, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Modalidad 83. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las modalidades 72-82, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1 o IgG4.

Modalidad 84. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o
5 fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Modalidad 85. La composición farmacéutica de la modalidad 84, en donde la composición farmacéutica comprende además un segundo agente terapéutico.

Modalidad 86. La composición farmacéutica de la modalidad 85, en donde el
10 segundo agente terapéutico comprende un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de control inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de células T o cualquier combinación de estos.

Modalidad 87. Una célula que expresa el anticuerpo o fragmento de unión al
15 antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83.

Modalidad 88. La célula de la modalidad 87, en donde la célula es un hibridoma.

Modalidad 89. La célula de la modalidad 87, en donde el anticuerpo se produce de manera recombinante.

Modalidad 90. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, dicho
20 método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 84-86.

Modalidad 91. El método de la modalidad 90, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o la composición farmacéutica se administra durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

5 Modalidad 92. Un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa, dicho método comprende administrar a dicha célula una cantidad efectiva del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 84-86, en donde dicha cantidad efectiva es suficiente para inhibir el crecimiento o la proliferación de dicha célula cancerosa.

10 Modalidad 93. El método de la modalidad 92, en donde dicha célula cancerosa está en un sujeto y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o la composición farmacéutica se administra al sujeto.

Modalidad 94. El método de la modalidad 92, en donde dicha administración se realiza *ex vivo*.

15 Modalidad 95. El método de una cualquiera de las modalidades 90-94 en donde el cáncer es un cáncer hematológico.

Modalidad 96. El método de la modalidad 95, en donde el cáncer hematológico es un cáncer de células B que expresan BCMA.

20 Modalidad 97. El método de la modalidad 96, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA es mieloma múltiple.

Modalidad 98. El método de la modalidad 97, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA es mieloma múltiple quiescente (SMM, por sus siglas en inglés).

Modalidad 99. El método de una cualquiera de las modalidades 90-98, en donde el cáncer es cáncer recidivante, resistente, o maligno, o cualquier combinación de estos.

Modalidad 100. El método de una cualquiera de las modalidades 90-91, 93, y
5 95-99, en donde el sujeto ha recibido un tratamiento previo.

Modalidad 101. El método de la modalidad 100, el tratamiento previo comprende un inhibidor de proteasoma, un fármaco inmunomodulador, un anticuerpo contra CD38, un agente biespecífico, una terapia con CAR-T o una combinación de estos.

Modalidad 102. El método de una cualquiera de las modalidades 90-101, que
10 comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

Modalidad 103. El método de la modalidad 102, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una terapia contra el cáncer dirigida.

Modalidad 104. El método de la modalidad 103, en donde el agente
quimioterapéutico es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina, o
15 interleucina 2 (IL-2).

Modalidad 105. El método de la modalidad 104, en donde el segundo agente terapéutico es un agente anti-CD38, un fármaco de imida inmunomodulador (IMiD), un inhibidor del punto de control inmunitario, un agente de coestimulación inmunitaria, un inhibidor de gamma secretasa, un potenciador de
20 células T o cualquier combinación de estos.

Modalidad 106. El método de una cualquiera de las modalidades 90-91, 93 y 95-105, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o la composición

farmacéutica se administra por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y/o subcutánea al sujeto.

Modalidad 107. El método de una cualquiera de las modalidades 90-91, 93 y 95-106, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, o la composición

- 5 farmacéutica se administra por vía subcutánea al sujeto.

Modalidad 108. Un método para generar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83, en donde dicho método comprende cultivar la célula de una cualquiera de las modalidades 87 a 89 y aislar dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

- 10 Modalidad 109. Un polinucleótido sintético que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83.

Modalidad 110. Un kit que comprende (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 72-83 y/o un polinucleótido de la modalidad 109 y (ii) el envase para el mismo.

- 15 Modalidad 111. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

a) una primera porción de cadena pesada (HC1) que comprende un primer dominio variable de cadena pesada (VH);

- b) una porción de cadena ligera (LC) que comprende un dominio variable
20 de cadena ligera (VL); y

c) una segunda porción de cadena pesada (HC2) que comprende un segundo dominio VH,
en donde

- (i) los dominios VH de HC1 y VL de LC forman un primer sitio de unión al antígeno que se une a un primer antígeno,
- (ii) el dominio VH de HC2 forma un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno,
- 5 (iii) la HC1 o la HC2 comprenden además un tercer dominio VH que forma un tercer sitio de unión al antígeno que se une a un tercer antígeno,
- (iv) la HC1 y la HC2 comprenden cada una opcionalmente un dominio de fragmento cristizable (Fc) que comprende un dominio CH2-CH3; y
en donde el primer antígeno es un cúmulo de diferenciación 3 (CD3), y
- 10 (v) el segundo antígeno es el antígeno de maduración de células B (BCMA), y el tercer antígeno es miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D); o
- (vi) el segundo antígeno es miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D), y el tercer antígeno es antígeno de
15 maduración de células B (BCMA).

Modalidad 112. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, en donde la HC2 comprende el tercer dominio VH que forma el tercer sitio de unión al antígeno que se une al tercer antígeno.

- Modalidad 113. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
20 la modalidad 112, en donde la HC2 comprende, del N al C-terminal, el segundo dominio VH que forma el segundo sitio de unión al antígeno, el dominio de Fc, un primer enlazador (L1) y el tercer dominio VH que forma el tercer sitio de unión al antígeno.

Modalidad 114. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-113, en donde la HC2 comprende el segundo dominio VH que forma el segundo sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D y la HC2 comprende además el tercer dominio VH que forma el
5 tercer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA.

Modalidad 115. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, en donde la HC1 comprende el tercer dominio VH que forma el tercer sitio de unión al antígeno que se une al tercer antígeno.

Modalidad 116. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
10 la modalidad 115, en donde la HC1 comprende, del N al C-terminal, el primer VH que forma el primer sitio de unión al antígeno, un dominio CH1, el dominio de Fc, un primer enlazador (L1) y el tercer dominio VH que forma el tercer sitio de unión al antígeno.

Modalidad 117. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
15 una cualquiera de las modalidades 111, 115, y 116, en donde la HC2 comprende el segundo dominio VH que forma el segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, y la HC1 comprende además el tercer dominio VH que forma el tercer sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D.

Modalidad 118. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
20 una cualquiera de las modalidades 111-117, en donde el VH de HC1 y VL de LC forman el primer sitio de unión al antígeno que comprende un fragmento de unión al antígeno (Fab) que comprende el primer sitio de unión al antígeno.

Modalidad 119. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-118, en donde el VH de HC2 forma un fragmento variable monocatenario (scFv) que comprende el segundo sitio de unión al antígeno.

Modalidad 120. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
5 cualquiera de las modalidades 111-119, en donde el tercer VH forma un fragmento variable monocatenario (scFv) que comprende el tercer sitio de unión al antígeno.

Modalidad 121. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-120, en donde los dominios de Fc de HC1 y HC2 comprenden una o más mutaciones diferentes que promueven la heterodimerización.

10 Modalidad 122. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 121, en donde el dominio de Fc de la HC1 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y el dominio de Fc de la HC2 comprende la mutación T366W (numeración EU).

Modalidad 123. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
15 la modalidad 121, en donde el dominio de Fc de la HC2 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y el dominio de Fc de la HC1 comprende la mutación T366W (numeración EU).

Modalidad 124. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-123, en donde los dominios de Fc de
20 HC1 y/o HC2 comprenden además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a un receptor de Fcγ.

Modalidad 125. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 124, en donde el receptor de Fcγ es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, y/o FcγRIIIB.

5 Modalidad 126. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 124 o 125, en donde los dominios de Fc de HC1 y/o HC2 comprenden cada uno una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S (numeración EU).

Modalidad 127. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 126, en donde los dominios de Fc de HC1 y HC2 comprenden cada uno las mutaciones L234A, L235A, y D265S (numeración EU).

Modalidad 128. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-127, en donde los dominios de Fc de HC1 o HC2 comprenden además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a la proteína A.

15 Modalidad 129. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 128, en donde los dominios de Fc de HC1 o HC2 comprenden las mutaciones H435R y/o Y436F (numeración EU).

Modalidad 130. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 129, en donde el dominio de Fc de HC1 comprende las mutaciones H435R y Y436F (numeración EU).

20 Modalidad 131. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 113-114 y 116-130, en donde el primer

enlazador (L1) comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 25, 127-157, y 163.

Modalidad 132. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 131, en donde el primer enlazador (L1)

5 comprende la secuencia de aminoácidos de GGSEKSSSGSGSESKSTGGS (sec. con núm. de ident.: 25) o GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((G4S)₄, sec. con núm. de ident.: 163).

Modalidad 133. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-132, en donde el primer sitio de unión al

10 antígeno que se une a CD3 comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la

15 secuencia de aminoácidos de GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6).

Modalidad 134. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-133, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a CD3 comprende: una región determinante de

complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1), una CDR2 de

20 cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3).

Modalidad 135. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-134, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8.

- 5 Modalidad 136. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-135, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a CD3 comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7.

- Modalidad 137. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
10 una cualquiera de las modalidades 111-136, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLTNIRMSVS (sec. con núm. de ident.: 12), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de HIFSNDEKS
15 (sec. con núm. de ident.: 13), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de MRLPYGMDV (sec. con núm. de ident.: 14).

- Modalidad 138. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-137, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende: una región determinante de
20 complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de RSSQSLVHSDGNTYLS (sec. con núm. de ident.: 9), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de KISNRFF (sec.

con núm. de ident.: 10), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 11).

Modalidad 139. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-138, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende un dominio variable de
5 cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident. 16.

Modalidad 140. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-139, en donde el segundo o tercer sitio de unión
10 al antígeno que se une a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15.

Modalidad 141. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-140, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA comprende: una región determinante de
15 complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm. de ident.: 21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22).

20 Modalidad 142. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-141, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de

aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT (sec. con núm. de ident.: 18), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de QHYGSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).

- 5 Modalidad 143. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-142, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.
- 10 Modalidad 144. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 111-143, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.
- 15 Modalidad 145. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 119-144, en donde el scFv comprende, del N al C-terminal, un VH, un segundo enlazador (L2) y un VL (VH-L2-VL); o el VL, el L2 y el VH (VL-L2-VH).
- 20 Modalidad 146. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 119-145, en donde el scFv comprende, del N al C-terminal, el VL, el L2 y el VH (VL-L2-VH).
- 20 Modalidad 147. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 145 o 146, en donde el segundo enlazador (L2) comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 25, 127-157, y 163.

Modalidad 148. El anticuerpo trispecífico o fragmento de unión trispecífico de una cualquiera de las modalidades 145-147, en donde el L2 comprende una secuencia de aminoácidos de GGSEGKSSGSGSESKSTGGS (sec. con núm. de ident.: 25).

Modalidad 149. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una
 5 cualquiera de las modalidades 111 a 148, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a los residuos 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena CD3ε.

Modalidad 150. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 111-149, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une
 10 específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-8} a 1×10^{-7} M.

Modalidad 151. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 150, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-8} a 4×10^{-8} M.

Modalidad 152. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una
 15 cualquiera de las modalidades 111 a 151, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

Modalidad 153. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 152, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente al
 20 BCMA con una afinidad de aproximadamente 1×10^{-10} a 1×10^{-7} M.

Modalidad 154. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la modalidad 153, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente al BCMA con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-10} a 9×10^{-10} M.

Modalidad 155. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 111 a 154, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

5 Modalidad 156. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 111 a 155 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG1.

Modalidad 157. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26.

10 Modalidad 158. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111 o 157, en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27.

Modalidad 159. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, 157 o 158, en donde la HC2 comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

Modalidad 160. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29.

Modalidad 161. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
20 la modalidad 111 o 160, en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30.

Modalidad 162. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la modalidad 111, 160 o 161, en donde la HC2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31.

La invención también puede definirse mediante las siguientes cláusulas numeradas.

5 Cláusula 1. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

- a) una primera cadena pesada (HC1);
- b) una cadena ligera (LC); y
- c) una segunda cadena pesada (HC2),

10 en donde

(i) la HC1 y la LC forman un primer parátopo que se une específicamente a un primer antígeno,

(ii) la HC2 comprende un segundo parátopo que se une específicamente a un segundo antígeno,

15 (iii) la HC1 o la HC2 comprende además un tercer parátopo que se une específicamente a un tercer antígeno,

(iv) la HC1 y la HC2 comprenden cada una un dominio de fragmento cristizable (Fc) que comprende un dominio CH2-CH3; y

en donde el primer antígeno es un cúmulo de diferenciación 3 (CD3), y

20 (v) el segundo antígeno es el antígeno de maduración de células B (BCMA), y el tercer antígeno es miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D); o

(vi) el segundo antígeno es miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPCR5D), y el tercer antígeno es antígeno de maduración de células B (BCMA).

Cláusula 2. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
5 cláusula 1, en donde la HC2 comprende el tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente al tercer antígeno.

Cláusula 3. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
cláusula 2, en donde la HC2 comprende, del N al C-terminal, el segundo sitio de
unión al antígeno, el dominio de Fc, un enlazador y el tercer sitio de unión al
10 antígeno.

Cláusula 4. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
cualquiera de las cláusulas 1-3, en donde la HC2 comprende un segundo sitio de
unión al antígeno que se une específicamente a GPCR5D, y la HC2 comprende
además un tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA.

15 Cláusula 5. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
cláusula 1, en donde la HC1 comprende el tercer sitio de unión al antígeno que
se une específicamente al tercer antígeno.

Cláusula 6. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
cláusula 5, en donde la HC1 comprende, del N al C-terminal, un dominio variable
20 de cadena pesada (VH) asociado con el primer sitio de unión al antígeno, un
dominio CH1, el dominio de Fc, un enlazador y el tercer sitio de unión al antígeno.

Cláusula 7. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
cualquiera de las cláusulas 1, 5 y 6, en donde la HC2 comprende un segundo sitio de

unión al antígeno que se une específicamente a BCMA, y la HC1 comprende además un tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D.

Cláusula 8. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-7, en donde el primer sitio de unión al antígeno

5 comprende un fragmento de unión al antígeno (Fab).

Cláusula 9. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-8, en donde el segundo sitio de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv).

Cláusula 10. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una

10 cualquiera de las cláusulas 1-9, en donde el tercer sitio de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv).

Cláusula 11. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-10, en donde los dominios de Fc de HC1 y HC2 comprenden una o más mutaciones diferentes que promueven la heterodimerización.

15 Cláusula 12. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 11, en donde el dominio de Fc de la HC1 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y el dominio de Fc de la HC2 comprende la mutación T366W (numeración EU).

Cláusula 13. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la

20 cláusula 11, en donde el dominio de Fc de la HC2 comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y el dominio de Fc de la HC1 comprende la mutación T366W (numeración EU).

Cláusula 14. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-13, en donde los dominios de Fc de HC1 y/o HC2 comprenden además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a un receptor de Fcγ.

- 5 Cláusula 15. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 14, en donde el receptor de Fcγ es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, y/o FcγRIIIB.

- Cláusula 16. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 14 o 15, en donde los dominios de Fc de HC1 y/o HC2 comprenden cada uno una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S (numeración EU).
- 10

Cláusula 17. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 16, en donde los dominios de Fc de HC1 y HC2 comprenden cada uno las mutaciones L234A, L235A, y D265S (numeración EU).

- 15 Cláusula 18. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-17, en donde los dominios de Fc de HC1 o HC2 comprenden además una o más mutaciones que reducen la unión de Fc a la proteína A.

- Cláusula 19. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 18, en donde los dominios de Fc de HC1 o HC2 comprenden las mutaciones H435R y/o Y436F (numeración EU).
- 20

Cláusula 20. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 19, en donde el dominio de Fc de HC1 comprende las mutaciones H435R y Y436F (numeración EU).

Cláusula 21. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
 5 cualquiera de las cláusulas 3 y 5-18, en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGSE GKSSGSGSESKSTGGS (sec. con núm. de ident.: 25) o GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((G4S)₄, sec. con núm. de ident.: 163).

Cláusula 22. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
 cualquiera de las cláusulas 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se
 10 une específicamente a CD3 comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la
 15 secuencia de aminoácidos de GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6).

Cláusula 23. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
 cualquiera de las cláusulas 1-22, en donde el primer sitio de unión al antígeno que
 se une específicamente a CD3 comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de
 20 aminoácidos de TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3).

Cláusula 24. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-23, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8.

- 5 Cláusula 25. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-24, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7.

- Cláusula 26. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
10 una cualquiera de las cláusulas 1-25, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLTNIRMSVS (sec. con núm. de ident.:12), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de
15 aminoácidos de HIFSNDEKS (sec. con núm. de ident.: 13), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de MRLPYGMDV (sec. con núm. de ident.: 14).

- Cláusula 27. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-26, en donde el segundo o tercer sitio de
20 unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de RSSQSLVHSDGNTYLS (sec. con núm. de ident.: 9), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos de KISNRFF (sec. con núm. de ident.: 10), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 11).

Cláusula 28. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
5 una cualquiera de las cláusulas 1-27, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

Cláusula 29. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
10 una cualquiera de las cláusulas 1-28, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15.

Cláusula 30. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
15 cualquiera de las cláusulas 1-29, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con
20 núm. de ident.: 21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22).

Cláusula 31. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-30, en donde el segundo o tercer sitio de unión al

antígeno que se une específicamente a BCMA comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT
 5 (sec. con núm. de ident.: 18), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de QHYGSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).

Cláusula 32. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-31, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende un dominio
 10 variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

Cláusula 33. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1-32, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende un dominio
 15 variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.

Cláusula 34. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 33, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a los residuos 22-35
 20 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 160)) de la cadena CD3ε.

Cláusula 35. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 34, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente $2,5 \times 10^{-8}$ M.

Cláusula 36. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 34, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente $3,1 \times 10^{-8}$ M.

5 Cláusula 37. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 36, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

Cláusula 38. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 37, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une
10 específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente $2,1 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 39. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 37, en donde el segundo o tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente $8,4 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 40. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
15 una cualquiera de las cláusulas 1 a 39, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Cláusula 41. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de cualquiera de las cláusulas 1 a 40 es un isotipo IgG1.

Cláusula 42. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
20 cláusula 1, en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26.

Cláusula 43. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 1 o 42, en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27.

5 Cláusula 44. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 1, 42 o 43, en donde la HC2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

Cláusula 45. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 1, en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29.

10 Cláusula 46. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 1 o 45, en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30.

Cláusula 47. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 1, 45 o 46, en donde la HC2 comprende la secuencia de aminoácidos
15 de la sec. con núm. de ident.: 31.

Cláusula 48. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

- a) un primer parátipo que se une específicamente a CD3,
- b) un segundo parátipo que se une específicamente a GPRC5D, y
- 20 c) un tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA.

Cláusula 49. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 48, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 comprende: una región determinante de

complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GDSVFNNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 4), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de RTYYRSKWLYD (sec. con núm. de ident.: 5), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de GYSSSFYD (sec. con núm. de ident.: 6).

Cláusula 50. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 48 o 49, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de
10 aminoácidos de TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 1), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 2), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 3).

Cláusula 51. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una
15 cualquiera de las modalidades 48-50, en donde el primer parátipo que se une específicamente a CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8.

Cláusula 52. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las modalidades 48-51, en donde el primer sitio de unión al antígeno
20 que se une específicamente a CD3 comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7.

Cláusula 53. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-52, en donde el segundo sitio de unión al antígeno

que se une específicamente a GPRC5D comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLTNIRMSVS (sec. con núm. de ident.: 12), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de HIFSNDEKS
5 (sec. con núm. de ident.: 13), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de MRLPYGMDV (sec. con núm. de ident.: 14).

Cláusula 54. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-53, en donde el segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende: una región determinante de
10 complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de RSSQSLVHSDGNTYLS (sec. con núm. de ident.: 9), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de KISNRFF (sec. con núm. de ident.: 10), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 11).

15 Cláusula 55. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-54, en donde el segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

20 Cláusula 56. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-55, en donde el segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D comprende un dominio

variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15.

Cláusula 57. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-56, en donde el tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm. de ident.: 21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22).

Cláusula 58. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-57, en donde el tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende: una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT (sec. con núm. de ident.: 18), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de QHYGSSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).

Cláusula 59. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-58, en donde el tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

- Cláusula 60. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-59, en donde el tercer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.
- 5 Cláusula 61. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48-60, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a los residuos 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 160)) de la cadena CD3 ϵ .
- Cláusula 62. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
- 10 cláusula 61, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente $2,5 \times 10^{-8}$ M.
- Cláusula 63. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 61, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 con una afinidad de aproximadamente $3,1 \times 10^{-8}$ M.
- 15 Cláusula 64. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 48 a 63, en donde el tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena BCMW37 de BCMA.
- Cláusula 65. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la
- 20 cláusula 64, en donde el tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente $2,1 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 66. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de la cláusula 64, en donde el tercer sitio de unión al antígeno se une específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente $8,4 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 67. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de
5 una cualquiera de las cláusulas 48 a 66, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Cláusula 68. El anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de cualquier modalidad 48 a 67 es un isotipo IgG1.

Cláusula 69. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico
10 de este, que comprende:

- a) una primera cadena pesada (HC1);
- b) una cadena ligera (LC); y
- c) una segunda cadena pesada (HC2),

en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.
15 de ident.: 26, la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, y la HC2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28.

Cláusula 70. Un anticuerpo triespecífico, o un fragmento de unión triespecífico de este, que comprende:

- 20
- a) una primera cadena pesada (HC1);
 - b) una cadena ligera (LC); y
 - c) una segunda cadena pesada (HC2),

en donde la HC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29, la LC comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30, y la HC2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31.

- 5 Cláusula 71. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- Cláusula 72. Una célula que expresa el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70.
- 10 Cláusula 73. La célula de la cláusula 72, en donde la célula es un hibridoma.
- Cláusula 74. La célula de la cláusula 72, en donde el anticuerpo triespecífico se produce de manera recombinante.
- Cláusula 75. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva
- 15 del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70 o la composición farmacéutica de la cláusula 71.
- Cláusula 76. El método de la cláusula 75, en donde el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico o la composición farmacéutica se administra durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.
- 20 Cláusula 77. Un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa, dicho método comprende administrar a dicha célula una cantidad efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70 o la composición farmacéutica de la cláusula 71,

en donde dicha cantidad efectiva es suficiente para inhibir el crecimiento o la proliferación de dicha célula cancerosa.

Cláusula 78. El método de la cláusula 77, en donde dicha célula cancerosa está en un sujeto y el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico o la
5 composición farmacéutica se administra al sujeto.

Cláusula 79. El método de la cláusula 77, en donde dicha administración se realiza ex vivo.

Cláusula 80. Un método para redirigir una célula T a células cancerosas que expresan BCMA y/o GPRC5D en un sujeto que lo necesita, dicho método
10 comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70 o la composición farmacéutica de la cláusula 71.

Cláusula 81. El método de la cláusula 80, en donde la dicha cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para dirigir dicha respuesta de células T a
15 dichas células cancerosas.

Cláusula 82. El método de una cualquiera de las cláusulas 75-81, en donde el cáncer es un cáncer hematológico.

Cláusula 83. El método de la cláusula 82, en donde el cáncer hematológico es un cáncer de células B que expresan BCMA y/o GPRC5D.

20 Cláusula 84. El método de la cláusula 83, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA y/o GPRC5D es mieloma múltiple.

Cláusula 85. El método de una cualquiera de las cláusulas 75-84, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

Cláusula 86. El método de la cláusula 85, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una terapia contra el cáncer dirigida.

Cláusula 87. El método de la cláusula 86, en donde el agente quimioterapéutico es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina, o interleucina 2 (IL-2).

5 Cláusula 88. Un método para generar el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70, en donde dicho método comprende cultivar la célula de una cualquiera de las cláusulas 72 a 74 y aislar dicho anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico.

Cláusula 89. Un polinucleótido sintético que codifica la HC1, la LC y/o la HC2 del
10 anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70.

Cláusula 90. Un kit que comprende (i) el anticuerpo triespecífico o fragmento de unión triespecífico de una cualquiera de las cláusulas 1 a 70 y/o un polinucleótido de la cláusula 89 y (ii) el envase para el mismo.

15 Cláusula 91. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a BCMA, que comprende: una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYAMS (sec. con núm. de ident.: 20), una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTY (sec. con núm.
20 de ident.: 21), y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de DEGYSSGHYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 22).

Cláusula 92. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la cláusula 91, que comprende además: una región determinante de complementariedad de cadena ligera

1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de RASQSISSSFLT (sec. con núm. de ident.: 17), una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de GASSRAT(sec. con núm. de ident.: 18), y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de QHYGSSPMYT (sec. con núm. de ident.: 19).

- 5 Cláusula 93. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la cláusula 91 o 92, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

Cláusula 94. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91-93, que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL)
10 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.

Cláusula 95. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91-94, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena BCMW37 de BCMA.

- 15 Cláusula 96. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la cláusula 95, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a BCMA con una afinidad de aproximadamente $2,1 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 97. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la cláusula 95, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a
20 BCMA con una afinidad de aproximadamente $8,4 \times 10^{-10}$ M.

Cláusula 98. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91-97, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno humano.

Cláusula 99. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 98, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es recombinante.

Cláusula 100. El fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las
5 cláusulas 91 a 99, en donde el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab2, o un anticuerpo de cadena simple.

Cláusula 101. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 100, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

10 Cláusula 102. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las cláusulas 91 a 101 es un isotipo IgG1 o IgG4.

Cláusula 103. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102 y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Cláusula 104. Una célula que expresa el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102.

Cláusula 105. La célula de la cláusula 104, en donde la célula es un hibridoma.

Cláusula 106. La célula de la cláusula 104, en donde el anticuerpo se produce de manera recombinante.

20 Cláusula 107. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102 o la composición farmacéutica de la cláusula 103.

Cláusula 108. El método de la cláusula 107, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o la composición farmacéutica se administra durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

Cláusula 109. Un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa, dicho método comprende administrar a dicha célula una cantidad efectiva del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102 o la composición farmacéutica de la cláusula 103, en donde dicha cantidad efectiva es suficiente para inhibir el crecimiento o la proliferación de dicha célula cancerosa.

Cláusula 110. El método de la cláusula 109, en donde dicha célula cancerosa está en un sujeto y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o la composición farmacéutica se administra al sujeto.

Cláusula 111. El método de la cláusula 109, en donde dicha administración se realiza *ex vivo*.

Cláusula 112. El método de una cualquiera de las cláusulas 107-111 en donde el cáncer es un cáncer hematológico.

Cláusula 113. El método de la cláusula 112, en donde el cáncer hematológico es un cáncer de células B que expresan BCMA.

Cláusula 114. El método de la cláusula 113, en donde el cáncer de células B que expresan BCMA es mieloma múltiple.

Cláusula 115. El método de una cualquiera de las cláusulas 107-114, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

Cláusula 116. El método de la cláusula 115, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una terapia contra el cáncer dirigida.

Cláusula 117. El método de la cláusula 116, en donde el agente quimioterapéutico es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina, o interleucina 2 (IL-2).

5 Cláusula 118. Un método para generar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102, en donde dicho método comprende cultivar la célula de una cualquiera de las cláusulas 104 a 106 y aislar dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

Cláusula 119. Un polinucleótido sintético que codifica el anticuerpo o un fragmento
10 de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102.

Cláusula 120. Un kit que comprende (i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las cláusulas 91 a 102 y/o un polinucleótido de la cláusula 119 y (ii) envase para el mismo.

15 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para complementar la descripción anterior y para proporcionar un mejor entendimiento del asunto del sujeto descrito en la presente descripción. Estos ejemplos no deben considerarse limitantes del asunto del sujeto descrito. Debe entenderse que los ejemplos y modalidades
20 descritas en la presente descripción son solo para propósitos ilustrativos y que varias modificaciones o cambios en la luz de estos serán aparentes a las personas con experiencia en la materia y están para incluirlos dentro de, y puede hacerse sin salirse de, el verdadero alcance de la invención.

Ejemplo 1: Validación de diana

La justificación científica para el desarrollo de los anticuerpos triespecíficos de BCMA x GPRC5D x CD3 es erradicar eficientemente células plasmáticas clonales malignas de la médula ósea y otros órganos de pacientes con MM. Esto debe

5 lograrse a través de la administración de un anticuerpo triespecífico que puede unirse simultáneamente al correceptor de TCR CD3 ϵ que se expresa en las células T efectoras y a proteínas diana, GPRC5D y BCMA, que se expresan en células de linaje de células B, principalmente plasmablastos y células plasmáticas maduras (8). Al poner las células T y las células cancerosas en proximidad, los anticuerpos

10 triespecíficos de BCMA x GPRC5D x CD3 promueven la activación de células T con la subsiguiente lisis de células cancerosas mediada por perforina y diversas granzimas secretadas almacenadas en las vesículas secretoras de CTL (Figura 1B).

La ventaja mecanicista de estos enfoques incluye su capacidad para traer a las células T CD3+ en estrecha proximidad con las células plasmáticas sin

15 considerar la especificidad o dependencia de TCR en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en la superficie de las células que presentan el antígeno para la activación, lo que evita las terapias basadas en MoR a células T conocidas a través de la regulación negativa de las moléculas de clase MHC.

20 Selección/validación de diana

El éxito potencial de los enfoques terapéuticos mediados por células T se basa en la presencia de antígenos específicamente encontrados en la superficie de las células tumorales. De los marcadores de células plasmáticas más

comunes, BCMA y GPRC5D exhibieron patrones de expresión selectivos y se ha establecido una prueba de concepto (PoC) clínica para ambos destinos.

BCMA (también conocido como CD269; nombre del gen TNFRSF17) es una proteína de membrana tipo I de 20 kDa que se expresa exclusivamente en
5 células de linaje de células B, desempeña un papel fundamental en la maduración de células B, y se induce selectivamente durante la diferenciación de células plasmáticas (9,10). El BCMA se une a 2 ligandos: APRIL (CD256) y BAFF (CD257; 11). El receptor de BCMA es una proteína de 184 aminoácidos con un dominio extracelular de 54 aminoácidos. Además de la expresión en la
10 superficie celular, BCMA se escinde por la actividad de la gamma secretasa en el dominio transmembrana, lo que genera un fragmento de proteína de BCMA soluble de ~6 kDa (12). Se midieron altos niveles de BCMA soluble en muestras de suero de pacientes con MM (13) y se correlacionaron con recuentos de células plasmáticas (14). La inhibición de la gamma secretasa resulta en un
15 aumento significativo de la expresión de la proteína de la superficie de BCMA en células B primarias humanas (12) y líneas celulares MM y células mononucleares de médula ósea (13). El BCMA se ha establecido como un objetivo validado en MM con varios tratamientos aprobados (15-17).

El GPRC5D es una proteína receptora 7 transmembrana que se clasifica
20 como un receptor acoplado a proteína G tipo C (GPCR) basada en la puntuación de homología de secuencia. El GPRC5D es un receptor huérfano cuyo ligando y mecanismos de señalización todavía no se han identificado. El receptor de GPRC5D es una proteína de aminoácido 354 que tiene una estructura de 7 transmembrana

típica con un extremo N-terminal de 27 aminoácidos corto a diferencia de otros miembros de la familia (18). El ARNm de GPRC5D se expresa predominantemente en células con un fenotipo de células plasmáticas y también se expresa en todas las células plasmáticas malignas de sujetos con MM (19-23). Los niveles de expresión de GPRC5D en sujetos con MM se correlacionaron bien con la carga de células plasmáticas y aberraciones genéticas tales como la delección de Rb-1 (19).

Expresión de la diana

El ARNm de BCMA y GPRC5D y la expresión de proteínas se restringen a tipos de células limitadas. El BCMA se expresa en las células B maduras y las células plasmáticas, mientras que la expresión de GPRC5D se limita adicionalmente a solo el fenotipo de células plasmáticas en las células inmunitarias. Además de la expresión de células inmunitarias, el ARNm de GPRC5D se expresa en tejidos queratinizados duros. Los niveles de ARNm de GPRC5D en células CD138⁺ de la médula ósea de pacientes con mieloma fueron elevados en comparación con células CD138⁺ del sujeto sano normal, y los niveles altos de ARNm de BCMA se restringieron principalmente a las células B maduras que incluyen células plasmáticas (10,13,19,21-26). La expresión de proteínas de BCMA (13,25) y GPRC5D (19,21,22) en tejidos normales se encontró principalmente en células plasmáticas mediante tinción inmunohistoquímica (IHC). Adicionalmente, la expresión de GPRC5D también se detectó en tejidos queratinizados duros tales como folículos pilosos (27). Las células mononucleares de médula ósea del paciente con MM exhibieron

heterogeneidad clonal en términos de expresión de BCMA y GPRC5D (21,22).

Los perfiles de expresión de objetivo detallados se describen en el Ejemplo 2.

De manera importante, la expresión selectiva de BCMA y GPRC5D en células de médula ósea CD138⁺ de origen de MM y sus bajos riesgos para la

5 toxicidad en una diana/fuera del tumor las designa como dianas potenciales para los agentes terapéuticos mediados por células T (10,13,20-22).

Ejemplo 2: Diseño, secuencia y estructura molecular de anticuerpo

triespecífico BGCB463

10 El BGCB463 es un anticuerpo triespecífico G1 de inmunoglobulina (Ig) que puede unirse simultáneamente o individualmente a la subunidad épsilon del grupo del complejo receptor 3 de diferenciación (CD3ε) en linfocitos T (células T), y a GPRC5D (miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G) y a BCMA (antígeno de maduración de células B, TNFRSF17) en células

15 tumorales. El anticuerpo tiene mutaciones de L234A, L235A y D265S (de acuerdo con la numeración EU) en la región constante (Fc) para eliminar la interacción con los receptores de Fc y la heterodimerización se ha mejorado mediante el uso de las mutaciones de la plataforma de botones en ocales. La cadena de “ocal” anti-CD3ε también comprende las mutaciones “RF” (H435R, Y436F; de acuerdo con la

20 numeración EU) para interrumpir la unión de la proteína A de cadenas de ocales monoméricas y homodimerizadas. La molécula comprende una región Fab anti-CD3ε en la cadena de “ocal, RF” y una región v de scFv anti-GPRC5D en la cadena “botón”. El anticuerpo triespecífico se desarrolló para evaluar el potencial terapéutico

de GPRC5D y BCMA y CD3 dirigidos a doble tumor para la redirección de las células T. En la Figura 1A se representa una ilustración de BGCB463.

El anticuerpo BGCB463 trispecífico se generó mediante la coexpresión de la cadena pesada anti-CD3 (HC) A y cadena ligera (LC) con la cadena pesada B anti-GPRC5D, anti-BCMA. La región variable anti-CD3 se descubrió mediante la
 5 inmunización de ratas humanizadas transgénicas [OmniRat (OMT™)] con proteína recombinante CD3ε. La región variable anti-GPRC5D (VR000038761) incluida en el BGCB463 se deriva del mAb GC5B680, se descubrió mediante la inmunización de ratones humanizados transgénicos [Ablexis] con ADN que
 10 codifica la GPRC5D. La región v parental (VR000029832) contenía un motivo “NSS” en la región de marco de HC 3 que presentó un riesgo de glicosilación unida a N y que representó una mutación a partir de la línea germinal IGHV2-26*01. El sitio se mutó nuevamente a la secuencia de la línea germinal “STS” para eliminar el riesgo de glicosilación unida a N, y este cambio dio como
 15 resultado la región variable final VR000038761. La región variable anti-BCMA (VR000003260) incluida en BGCB463 se deriva del mAb BCMB519, se descubrió mediante la inmunización de ratones humanizados transgénicos [Ablexis] con proteína BCMA recombinante. No se realizaron modificaciones adicionales a esta región v. Tanto las regiones v anti-GPRC5D y anti-BCMA se formatearon como
 20 variable de fragmento monocatenario (scFv) en la molécula final.

La secuencia de aminoácidos para las cadenas pesadas y la cadena ligera de BGCB463, como se deduce de la secuencia de ADNc de BGCB463, y se confirma mediante mapeo de péptidos y espectrometría de masas, se

muestra a continuación (Tabla 5). Las 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR), definidas de acuerdo con la numeración ABM, en cada cadena están en negrita y subrayadas. El residuo Gln en la posición 1 de la cadena pesada 1 de BGCB463, el residuo Gln en la posición 1 de la cadena ligera de BGCB463 y Asp en la posición 1 de la cadena pesada 2 de BGCB463 constituyen los terminales N de las cadenas maduras. Ambas cadenas pesadas que comprenden AAS de IgG1 de BGCB463 tienen las siguientes mutaciones puntuales: L234A, L235A y D265S. La cadena pesada 1 de BGCB463 incluye las mutaciones “ojal”: T366S, L368A, Y407V y las mutaciones RF: H435R, Y436F, mientras que la cadena pesada 2 incluye la mutación “botón”: T366W. Las mutaciones de botones en ocales promueven la heterodimerización del Fc. Las mutaciones “RF” interrumpen la unión a la proteína A. Las mutaciones para el silenciamiento del receptor de FcγR (AAS) y las mutaciones de botones en ocales están subrayadas en las secuencias a continuación.

15

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de BGCB463

Área	Secuencia de AA	Sec. con núm. de ident.
Cadena ligera 1	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCT <u>TGTSSNIG</u> <u>TYKFVS</u> WYQQ HPDKAPKVLL Y <u>EVSKRPS</u> GV SSRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDQADYHC <u>VSYAGSGTLL</u> FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	27
Cadena pesada 1	QVQLQQSGPR LVRPSQTLST TCAIS <u>GDSVF</u> <u>NNNAAWS</u> WIR QSPSRGLEWL <u>GRTYYRSKWL</u> <u>YD</u> YAVSVKSR ITVNPDTSRN QFTLQLNSVT PEDTALYYCA <u>RGYSSSF</u> <u>FDYW</u> GQGTLLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT	26

	YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCTVVSVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNRF QKSLSLSPGK	
Cadena pesada 2	DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSDGNTYLSW LQQRPGQPPR LLIYKISNRF FGVPDRFSGS GAGTDFTLKI SRVEADVGV YYCMAQTQFP HTFGQGTKLE IKGGSEGKSS SGSGESKSTG GSQVTLKESG PVLVKPTETL TLCTVS GFS LTNIRMSVSW IRQPPGKALE WLAHIFSNDK KSYSTSLKSR LTISRDTSKS QVVLTLTNVD PVDATATYYCA RMRLPYGMDV WGQGTTVTVS SEPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV SVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGKGGSEGKS SGSGESKST GGSEIVLTQS PGTSLSPGE RATLSCRASQ SISSSFLT WYQQKPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGGG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQHYGSSPM YTFGQGTKLE IKGGSEGKSS SGSGESKSTG GSEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFT FSSYAMSWVR QAPGKGLEWV SAISGSGGST YYADSVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAK DEGYSSGHYY GMDVWGQGT TTVSS	28

Ejemplo 3: Evaluación de riesgo de inmunogenicidad de anticuerpo

triespecífico BGCB463

Las secuencias de anticuerpos triespecíficos se analizaron para determinar

5 la inmunogenicidad potencial usando puntuaciones ajustadas de regulación T

(T_{reg}) del programa de predicción de inmunogenicidad *in silico* EpiVax Epimatrix

(Tabla 6). El programa EpiVax calcula el potencial de unión a las moléculas HLA

más comunes dentro de cada uno de los “supertipos”. El informe proporciona

resultados que son representativos de > 90 % de poblaciones humanas en todo el

10 mundo sin la necesidad de probar cada haplotipo individualmente. La puntuación

- EpiVax se calcula al agregar las puntuaciones EpiMatrix de todos los epítomos de células T previstos contenidos dentro de una secuencia de proteína dada y al ajustar el contenido de epítomo de células T y la longitud de proteína esperadas. La interpretación de la puntuación de EpiVax es como sigue: una puntuación del
- 5 EpiVax de < -20 es “Ideal”; una puntuación de EpiVax de -20 a +20 es “Aceptable”; y una puntuación de EpiVax de > +20 es “Inaceptable”.

Tabla 6: Evaluación de inmunogenicidad para BGCB463

BGCB463 Información de cadena	Secuencia de aminoácidos de región variable	Sec. con núm. de ident.	Puntuación de EpiVax	Interpretación de la puntuación de EpiVax
Cadena ligera 1 (CD3B376) VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTS SNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYE VSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGG GTKLTVL	7	-44,88	Ideal
Cadena pesada 1 (CD3B376) VH	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISG DSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDT SRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGY SSSFDYWGGQGLTVTVSS	8	+65,28	Inaceptable
scFv de N- terminal de cadena pesada 2 (GC5B680 N68S, S69T) VL	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSS QSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRL LIYKISNRFFGVDPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGYYCMQATQFPHTFG QGTKLEIK	15	-3,12	Aceptable
scFv de N- terminal de cadena pesada 2 (GC5B680 N68S, S69T) VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGF SLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIF SNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQV VLTLTNVDVPDTATYYCARMRLPYGM DVWGQGTTVTVSS	16	-11,65	Aceptable
scFv de C- terminal de cadena pesada 2 (BCMB519) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSISSSFLTWYQQKPGQAPRLIYGA SSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGT KLEIK	23	-52,88	Ideal
scFv de C- terminal de cadena	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	24	-54,35	Ideal

pesada 2 (BCMB519) VH	KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDE GYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSS			
-----------------------------	--	--	--	--

Ejemplo 4: Caracterización de unión de anticuerpo triespecífico BGCB463

Parte 1. Materiales y métodos

Líneas celulares

5 Las líneas celulares evaluadas para la caracterización de unión a GPRC5D y BCMA fueron H929 y MM.1R derivados de mieloma múltiple. Además, se generó una serie de H929 de inactivaciones de CRISPR (línea monoclonal D11 de KO de GPRC5D de H929), KO de BCMA de H929 y KO de GPRC5D/BCMA de H929. También se desarrollaron inactivaciones de MM.1R similares para evaluar la unión

10 de GPRC5D y BCMA. Todas las líneas se obtuvieron del interior (ABS) y se cultivaron con medio RPMI completo, que estaba compuesto por medio RPMI 1640, suplemento GlutaMAX™, HEPES, FBS inactivado por calor (HI), aminoácidos no esenciales (NEAA), piruvato de sodio y 2-ME (todos ThermoFisher).

Se usaron líneas celulares monoclonales K562 que sobreexpresan el

15 GPRC5D humano (monoclon H1B5) y BCMA humano (monoclon H1/B5) . Además, se usaron células K562-Flu-GFP que expresan GPRC5D de cynomolgus (monoclon M1C11) y BCMA de cynomolgus. Ambas líneas celulares se mantuvieron en IMDM, 10 % de FBS, 2 mM de glutamina y 2 mg/ml de G418 (todo ThermoFisher).

20 *Unión celular mediante FACS*

Se usaron BGCB463.003 y BGCB463.004, o B23B251 (control de isotipo para IgG1-AAS) ya sea como una molécula no marcada o se conjugó directamente con

Alexa Fluor 647. El BGCB463.003 se expresó mediante transfección transitoria, mientras que BGCB463.004 se expresó a partir de un pool de transfección estable.

Para la unión de BGCB463 a células Pan T humanas y de cynomolgus, se seleccionaron tres donantes humanos (Hemacare), se descongelaron rápidamente, se resuspendieron y se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos a 1×10^6 células/ml. A continuación, las células se lavaron, se bloquearon con Fc de ser necesario (Innovex) y se tiñeron con tinte de viabilidad (Invitrogen). El BGCB463 y su isotipo correspondiente (B23B251) se diluyeron en medio completo hasta una concentración inicial de 2 μ M y se realizaron diluciones en serie 1:3 por duplicado para una curva de respuesta a la dosis. Las células se incubaron con moléculas a 4 °C o 37 °C durante 1 hora. Cuando fue necesario, también se realizó la incubación con 90 % de suero humano (Sigma) como se describió anteriormente.

Para determinar la interferencia potencial de BCMA soluble (sBCMA), se obtuvieron sueros de pacientes con concentraciones conocidas de BDS (1 grupo) y se incubaron con células BGCB463 y H929. Para la incubación, se diluyeron sueros de pacientes con sueros normales para evaluar el ensayo de BCMA mientras se mantuvo el 90 % de suero humano total.

Mediante el uso del software ForeCyt, se controlaron poblaciones en vivo singlete y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) del canal AlexaFluor 647 para cada muestra. Los datos sin procesar se exportaron en Excel (Office 365, Microsoft), en donde se promediaron duplicados y se analizaron adicionalmente en el software Prism (v. 8.0, Graphpad). Cuando se requirió, se sustrajo el fondo de isotipo. En la presente descripción, gráficos de curva de

respuesta a la dosis y EC_{50} se calcularon para cada molécula para cada donante. Finalmente, los promedios de todos los tres donantes de cada especie respectiva se calcularon para obtener un EC_{50} promedio para la especie.

5 *Unión por curso temporal*

Las líneas celulares evaluadas para la unión cinética por curso temporal de GPRC5D y BCMA fueron las series de KO de H929 y MM.1R mencionadas anteriormente. El análisis FACS de la unión de BGCB463 a las líneas celulares anteriores se realizó en concentraciones finales variables basadas en las curvas de dosis-respuesta de la unión de 1 h a 37 °C, de manera que al menos una de las concentraciones estuvo cerca del EC_{50} . Se eligieron tres concentraciones finales con diferencias de 5 veces, todas con incubaciones de 1 h, 3 h, 5 h y 24 h. La unión a BGCB463 se evaluó en RPMI completo a 37 °C.

El BGCB463 o el control de isotipo B23B251 acompañante se diluyó primero en RPMI completo a una concentración de 2X y se incubó a 37 °C. A continuación, las células se recolectaron y contaron mediante el uso de Vi-Cell XR (Beckman Coulter) y después se agregaron a la placa de cavidad profunda maestra para producir $\sim 1E5$ células por punto temporal. En cada punto temporal, las células se retiraron y transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo que contenía regulador de FACS frío (regulador de tinción que contenía BSA al 0,2 % (BD) + 2 mM EDTA (ThermoFisher)). Las placas se lavaron a continuación de tres a cuatro veces mediante centrifugación (1200 RPM, 5 min) seguido de aspiración con regulador. Después de dos lavados con regulador de FACS, las

células se tiñeron en hielo con Alexa Fluor 647 IgG1 de cabra antihumana (H+L) (Jackson Immuno) durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces más con regulador de FACS frío y después se volvieron a suspender en regulador de FACS que contenía Sytox Green para marcar todas las células muertas (ThermoFisher). Las placas se procesaron después en el Intellyt iQue Screener Plus (Sartorius) dentro de tres horas después de la tinción.

Ensayo de destrucción y activación de células T usando imágenes de células vivas Incucyte

Para determinar el efecto de las moléculas de prueba sobre la activación de células T y potencial de destrucción de células tumorales, se usó el sistema de imágenes en vivo Incucyte (Sartorius). La línea celular H929-Flu-GFP generada internamente sirvió como células diana para células Pan T del donante humano (Hemaces). El ensayo se configuró en una placa de 96 pocillos en una relación de célula T a objetivo de 1:1, 3:1, y 5:1 en varios experimentos. Se añadieron moléculas de prueba (BGCB463 y B23B251) a una concentración inicial de 40 nM o 10 nM y se diluyeron en serie a 1:4 en medio completo. Todas las moléculas se probaron por duplicado al mínimo. La detección del estado de activación de células T se monitoreó con CD25-Alexa Fluor antihumano 647 (Biolegend). Las células en las placas se normalizaron a temperatura y después se colocaron en un sistema de imágenes de células vivas Incucyte (Modelo S3) contenido dentro de una incubadora a 37 °C. Se capturaron cuatro imágenes por pocillo en la fase, canales verdes y rojos cada 3 horas durante

aproximadamente 5 días. Con las imágenes de muestra, se creó una definición de análisis en el software de análisis Incucyte (Sartorius, v.2019B Rev2) para generar los recuentos de objetos en los canales verdes (células diana), así como los recuentos o intensidad integrada total de canales rojos (células T activadas).

5 Mediante el uso de los recuentos sin procesar del canal verde (células diana) generados a partir del análisis del software Incucyte, se calculó el porcentaje de citólisis de objetivos en cada concentración y punto temporal con respecto al promedio de todos los pocillos no tratados en la placa correspondiente usando la siguiente fórmula en datos brutos exportados a Excel (Microsoft, Office 365): $(100 -$
 10 $(\text{concentración de prueba del GPRC5D/promedio sin tratar}) \times 100)$. Para automatizar esto, se transformaron datos sin procesar y se transfirieron mediante el uso de Shiny Application desarrollada por Data Sciences para calcular y transferir rápidamente los datos al software Prism, donde se presenta la representación gráfica de los datos. Una vez que se transfirieron al software Prism (Software
 15 Graphpad, v.8.0.0), se graficaron los datos y se calculó el error estándar de la media y citólisis y la activación de las células T a lo largo de las curvas del tiempo. Para la activación de células T, se usaron réplicas de recuentos sin procesar o la intensidad integrada total del canal rojo (CD25-AF647) y después se graficaron en el software Prism para generar gráficos de respuesta a la dosis y de activación.

20

Parte 2. Resultados

Unión sensible a la dosis de células T y línea celular

Primero, la unión basada en FACS para los brazos de unión de GPRC5D y BCMA de la molécula trispecífica se determinó al medir el rango de concentración efectivo (EC, por sus siglas en inglés) de una curva de dosis-respuesta usando un ajuste de 4 parámetros a 37 °C durante 1 hora. Esto se evaluó mediante el uso de una serie de células H929 (WT, KO de GPRC5D, KO de BCMA y KO de GPRC5D/BCMA), y un conjunto similar de MM.1R. La EC₅₀ basada en células es de aproximadamente 13 nM para WT H929 (Figuras 2A-2D, Tabla 7) y 2,4 nM para WT MM.1R (Figuras 3A-3D, Tabla 8). Un efecto de avidéz claro se observa ya que EC₅₀ y B_{máx} se reducen en las líneas KO de GPRC5D y KO de BCMA, lo que prueba la unión monovalente de los brazos de unión a objetivo (Tabla 7). A continuación, se determinó la EC₅₀ basada en células para el brazo Fab de unión a CD3 usando células Pan T purificadas de tres donantes aleatorios. Como se demuestra en las Figuras 4A-4C, EC₅₀ basada en células para el brazo CD3B376 (BGCB463) fue aproximadamente de 329 nM (Tabla 9). A continuación, se evaluó la unión sensible a la dosis a 4 °C para eliminar cualquier efecto biológico potencial. Como se muestra en las Figuras 5A-5C, la unión es más fuerte (50-100 nM) a 4 °C, en comparación con 37 °C, que puede indicar la internalización. Además, dos lotes de expresión de BGCB463 (BGCB463.003 de transfección transitoria y BGCB463.004 de un grupo de transfección estable) se compararon directamente con la unión a células Pan T, MM.1R y H929, y no se observaron diferencias (Figuras 6A-6C).

Tabla 7: Concentraciones efectivas basadas en células de la serie H929

EC ₅₀ (nM)	H929	H929 GPCR5D KO	KO de BCMA de H929	EC ₉₀ (nM)	H929	H929 GPCR5D KO	KO de BCMA de H929
Ejecución 1	14,0	106,4	195,4	Ejecución 1	240,1	722,6	1861,4
Ejecución 2	8,3	63,9	128,8	Ejecución 2	356,2	200,3	871,8
Ejecución 3	28,7	220,8	65,2	Ejecución 3	45776,5	1996,4	1237,5
Ejecución 4	Sin ajuste	Sin ajuste	Sin ajuste	Ejecución 4	Sin ajuste	Sin ajuste	Sin ajuste
Ejecución 5	2,4	456,8	48,8	Ejecución 5	9450,2	4130,3	281,2
AVE	13,3	212,0	109,5	AVE	13955,7	1762,4	1063,0

Tabla 8: Concentraciones efectivas basadas en células de la serie MM.1R

EC ₅₀ (nM)	MM.1R	MM.1R GPCR5D KO	KO de BCMA de MM.1R	EC ₉₀ (nM)	MM.1R	MM.1R GPCR5D KO	KO de BCMA de MM.1R
Ejecución 1	3,2	Sin ajuste	Sin ajuste	Ejecución 1	128,1	Sin ajuste	Sin ajuste
Ejecución 2	1,2	Sin ajuste	16,6	Ejecución 2	13,9	Sin ajuste	198,7
Ejecución 3	3,4	141,6	35,3	Ejecución 3	75,5	2070,4	969,9
Ejecución 4	1,6	489,9	7,2	Ejecución 4	8,6	8298,7	38,2
AVE	2,4	315,8	19,7	AVE	56,5	5184,5	402,2

Tabla 9: Concentraciones efectivas basadas en células T

EC ₅₀ (nM)	Donante 1	Donante 2	Donante 3	EC ₉₀ (nM)	Donante 1	Donante 2	Donante 3
Ejecución 1	769,8	572,5	548,9	Ejecución 1	10735,6	7046,4	6008,2
Ejecución 2	Sin ajuste	Sin ajuste	Sin ajuste	Ejecución 2	Sin ajuste	Sin ajuste	Sin ajuste
Ejecución 3	293,1	261,9	359,9	Ejecución 3	2864,8	2267,3	4148,3
Ejecución 4	209,9	192,1	254,8	Ejecución 4	1698,0	1418,4	2173,5
Ejecución 5	102,6	132,4	250,7	Ejecución 5	493	860	2600
AVE	343,9	289,7	353,6	AVE	3947,9	2898,0	3732,5
AVE total	329,1			AVE total	3526,1		

A continuación, se determinó la estabilidad superficial de BGCB463, al evaluar la unión cinética por curso temporal en las series de células de H929 y MM.1R. Como se demuestra en las Figuras 7A-7D, la cinética de unión es estable en células H929 durante el período de 24 horas. Además, la unión bivalente de la molécula triespecífica tiene una señal más fuerte en comparación con el brazo de unión monovalente evaluado en las KO individuales, que similarmente a lo anterior, es consistente con los posibles efectos de avidéz. Estos resultados se reflejan en la serie MM.1R (Figuras 8A-8D).

10 *Reactividad cruzada de especies/ortólogos*

También se perfiló la reactividad cruzada a macaco cynomolgus para ambos brazos de scFv de unión a objetivo mediante la unión basada en células de FACS a 37 °C durante 1 hora. Para este fin, se usaron células K562 que expresan de manera estable GPRC5D o BCMA humano y de cynomolgus. Como se indica en las Figuras 9A-9E, la EC₅₀ basada en células para el brazo scFv de GC5B680 es aproximadamente 30 nM para GPRC5D humano y aproximadamente 10 veces más débil a aproximadamente 400 nM en GPRC5D de cynomolgus. En contraste, EC₅₀ basada en células para el brazo scFv de BCMB519 es aproximadamente 145 nM para BCMA humano, mientras que no hubo unión detectable a BCMA de cynomolgus hasta 2 µM.

Para determinar adicionalmente la reactividad cruzada de cynomolgus, también se usaron células K562 que se usaron para la unión para la citotoxicidad con células T Pan humanas. Como se demuestra en las Figuras 10A y 10B, la

unión más débil en el GPRC5D de cynomolgus en comparación con GPRC5D humano se correlaciona con citotoxicidad más débil y correspondiente activación de células T más baja con K562 que expresa GPRC5D de cynomolgus. Se observa un patrón similar con BCMA humano y de cynomolgus, sin embargo,

5 esencialmente no hay respuesta de células T al BCMA de cynomolgus.

Unión en suero humano al 90 %

Para comprender mejor la unión in vivo, se evaluó la unión durante 1 hora a 37 °C en presencia de suero humano al 90 % . Los brazos de scFv de GPRC5D y

10 BCMA de unión a BCMA se probaron con células de H929 (Figura 11) mientras que el Fab de unión a CD3 se evaluó con células Pan T humanas (Figura 12). En ambos tipos de células, la unión a BGCB463 no se ve afectada por la presencia de suero.

Citotoxicidad por curso temporal

15 Para evaluar la cinética de destrucción in vitro, se usó el Incucyte, una plataforma basada en imágenes, para adquirir datos de muerte cinética. El seguimiento de la destrucción de células diana y la activación de células T a lo largo del tiempo da una lectura más detallada y cualitativa de la actividad citotóxica en comparación con los ensayos de criterio de valoración basados en

20 FACS estándar. Como se muestra en las Figuras 13A y 13B, BGCB463 alcanzó una notable destrucción máxima a aproximadamente 72 horas a todas las concentraciones, excepto por la más baja probada (1 pM) a una relación E:T de 3:1. Para expandir estos datos, también se probaron relaciones de E:T de 5:1 y

E:T de 1:1 (Figuras 14A-14F). A la relación E:T de 5:1, todas las concentraciones evaluadas alcanzaron la destrucción máxima a 48-72 h, donde el tiempo para destruir se correlacionó inversamente con la concentración. A la relación E:T de 1:1, todas las concentraciones también obtienen una destrucción máxima, pero en puntos temporales posteriores, con la misma dependencia de la concentración.

Interferencia de unión a sBCMA usando sueros de pacientes

La evaluación de la interferencia potencial con BCMA soluble (sBCMA) es necesaria para soportar el modelado y la proyección de la dosis de MABEL. Los sueros de pacientes se eligieron como una fuente fisiológica de BCMA soluble y se analizaron mediante dilución en suero normal. Como se demuestra en las Figuras 15A-15D, incluso el nivel más alto de 613 ng/ml no afecta la unión de BGCB463 a las células H929. Este es el caso con todo el suero de pacientes con niveles variables de sBCMA.

15

Parte 3. Discusión y conclusiones

El propósito de la unión en un curso temporal para un panel dado es determinar si la molécula es estable en la superficie de las células durante un tiempo determinado, tomado con la advertencia de que este método no es capaz de discernir la internalización frente a la tinción de la superficie. El BGCB463 mantiene una señal estable o creciente en todas las concentraciones evaluadas en las series de células H929 y MM.1R KO. De este modo, el BGCB463 se presenta de manera estable sobre la superficie de objetivos de células hematológicas.

También se midió la reactividad cruzada con BCMA y GPRC5D de cynomolgus para BGCB463. La unión del GPRC5D fue aproximadamente 10 veces más débil en cynomolgus en comparación con el humano que se correspondió con la citotoxicidad. Por otro lado, la unión a BCMA no tuvo reactividad cruzada hasta 2 μ M, lo que se correlacionó con la observación de ninguna actividad funcional.

La citotoxicidad por curso temporal se usó para evaluar la cinética de destrucción y dar una vista más detallada de cómo BGCB463 media la redirección de las células T. Se observó la destrucción que se acercó a la citólisis máxima con el tiempo dependiente de la concentración de la molécula y la relación E:T.

Dado que el BCMA existe en forma soluble y está elevado en pacientes, fue crucial evaluar la unión en presencia de sueros de pacientes con niveles variables de sBCMA. Los datos demostraron que el BCMA no interfiere con la unión de BGCB463 a BCMA superficial en células H929.

Ejemplo 5: Evaluación biofísica del anticuerpo triespecífico BGCB463

Se realizó un rango de evaluaciones biofísicas para BGCB463, que incluyen unión, caracterizaciones de proteínas, estabilidad de concentración alta de 2 semanas y estabilidad química y física. Una lista de las evaluaciones y sus resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Evaluaciones biofísicas y resultados para BGCB463

Característica de TMP de mAb	Resultados	Comentarios
Afinidad de unión para el brazo CD3 humano (SPR)	KD = 3,1E-8 M	N/A

	Antígeno: constructo de heterodímero CD3δε recombinante	
Afinidad de unión para el brazo BCMA humano (SPR)	KD = 8,4E-10 M Antígeno: BCMW37	N/A
Unión a receptor de Fcγ (SPR)	Unión no medible a FcγR1, FcγRIIIa V158, FcγRIIIa F158, Fcγ RIIa o FcγRIIb humanos. Unión no medible a FcγR1, FcγRIII, FcγRIIa, o Fcγ RIIb de macaco cynomolgus.	Diseño de Fc silencioso confirmado
Unión a FcRn (SPR)	pH 6,0: KD de hFcRn = 954 nM KD de cyFcRn = 826 nM Disociación más rápida a pH 7,4 con relación a pH 6,0	N/A
Interferencia de suero (octeto)	Sin cambios significativos en el índice de asociación en el suero humano al 50 % k _a regulador/k _a suero = 1,6 - BCMA k _a regulador/k _a suero = 1,0 - CD3	N/A
Epítipo de unión a GPRC5D	No determinado	N/A
Epítipo de unión a CD3	El epítipo lineal que abarca los residuos 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadenaαδCD3	Secuencia de epítipo determinada para anticuerpo parental CD3B376 frente a CD3εγ por HDX-MS
Epítipo de unión a BCMA	Epítipo lineal que abarca los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162) de la cadena BCMW37 de BCMA	Los datos de HDX-MS muestran que los residuos 17-18 y 21-26 están protegidos por BGCB465.
Masa de anticuerpos intacta, liberación (espec. de masa)	156,431.5 Da	N/A
Perfil de la glicoforma (espec. de masa)	Perfil de IgG1 típico con glicoforma principal G0F/G0F	N/A
Nivel de homodímero(s) (espec. de masa)	No se detectó HD1 y HD2	N/A
Niveles de otras impurezas relacionadas con el producto (espec. de masa)	Recorte menor en HC2 (scFv de BCMA) entre AA 486 – 495. Pérdidas menores de LC de CD3 y VH+CH1 (pQ1-S222) combinado del brazo CD3.	N/A
Gli. de enlace N (no Fc) (espec. de masa)	Ninguna predicha u observada	N/A

Sitios de gli. de enlace O (espec. de masa)	Ninguna observada	N/A
Glicación (% de abundancia relativa) (espec. de masa)	HC1 (CD3) - 9,5 %, LC1 (CD3) - 6,4 %, HC2 (GPRC5D x BCMA) - 7,5 %	Los valores de glicación representan el límite superior debido a la sobreestimación causada por los valores iniciales distintos a cero
Cis libre (espec. de masa)	Ninguna predicha u observada	N/A
Alargamiento/truncamiento de N-terminal (espec. de masa)	Ninguna observada	N/A
Estabilidad de la conformación (DSC)	T _{m1} = 63,2 °C T _{m2} = 68,0 °C T _{m3} = 72,2 °C	Medido en histidina 10 mM pH 6,5
% de pureza (purificación de 2 etapas) (AUC)	96,39 % de monómero	Medido en histidina 10 mM pH 6,4
Estabilidad de suero (SEC-FDS)	3,7 % de aumento en la agregación en t ₀ en suero humano, 1,2 % de aumento en la agregación después de 2 días en suero humano a 37 °C.	Evaluated mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando GPRC5DxCD3 marcado con Alexa488
Interacciones de IgG (SPR)	No se observaron interacciones de IgG	N/A
Unión no específica	No se observó ninguna unión no específica	N/A
Punto isoelectrico (cIEF)	pI = 9,51 % área de pico ácida/principal/básica: 44,8/54,9/0,3	N/A
Hidrofobicidad relativa (HICa)	Baja hidrofobicidad superficial (índice de hidrofobicidad <0,6) con pico amplio	N/A
Viscosidad	5,48 cP	Determinado a 150 mg/ml en histidina 10 mM pH 6,5
Concentrabilidad y % de recuperación en regulador de histidina pH 6,5	La muestra se concentró hasta 176,5 mg/ml con 89,4 % de recuperación	N/A
% de monómero (inicial) (AUC)	96,6 %	Determinados en histidina pH 6,5
% de monómero 2 semanas, 4 °C (AUC)	84,7 %	Determinados en histidina pH 6,5
% de monómero 2 semanas, 40 °C	66,3 %	Determinados en histidina pH 6,5

(AUC)		
MS intacta después de la degradación forzada (espec. de masa)	Todas las muestras de estrés coincidieron con la masa esperada. El estrés de pH alto dio como resultado un recorte de scFv de BCMA menor junto con pérdida menor de CD3 LC. El tratamiento de oxidación química dio como resultado hasta 3 oxidaciones en el brazo HC2 (scFv) y hasta 2 oxidaciones en CD3 HC.	Ninguno
Tamaño después de la degradación forzada (aSEC)	La muestra después de estrés fisiológico (2 semanas 37°C) y de oxidación mantuvieron > 98 % de monómero; Las muestras después de estreses de pH 8,5, 5 y 3,5 produjeron un monómero 89-91 %; La muestra de alta concentración después de 2 semanas a 40 °C mostró un aumento significativo en HMW con solo 63 % de monómero.	El aumento en la agregación a alta concentración fue evidente a lo largo del tiempo y se requiere un estudio de formulación de seguimiento para mitigar la propensión a la agregación
Degradación forzada de la pureza (R y NR GXII)	NR GXII: Todas las muestras sometidas a estrés mantuvieron ≥99 % de monómero, excepto las muestras fisiológicas (2 semanas a 37 °C) (97 %), de alta concentración a 2 semanas a 40 °C (95,9 %) y alto pH (76,1 %). GXII reducido: Todas las muestras sometidas a estrés mantuvieron ≥99 % de monómero, excepto a 2 semanas a 40 °C (97,9 %) y alto pH (89,7 %).	Ninguno
Afinidad de unión después de la degradación forzada (SPR)	La afinidad a CD3 se retiene en todas las condiciones de estrés evaluadas. La afinidad a BCMA fue dentro del rango de error de KD y % de especies activas bajo todas las condiciones de estrés evaluadas.	N/A
Nivel de oxidación basal	6,8 % en M94 (LCDR3 de scFv de GC5B680)	Ninguno

	4,7 % en M232 (HCDR3 de scFv de GC5B680) < 1 % para todos los demás residuos de CDR	
Met/Trp (cambio en el estrés oxidativo)	68,1 % en M94 (LCDR3 de scFv de GC5B680) 15,1 % en M232 (HCDR3 de scFv de GC5B680) 67,9 % en M600 (LCDR3 de scFv de BCMB519)	Ninguno
Nivel de desamidación basal	< 1 % en CDR	Ninguno
Sitios de desamidación (cambio en estrés)	Sin cambio significativo	Ninguno
Nivel de isomerización basal	< 1 % en CDR	Ninguno
Sitios de isomerización (cambio en estrés)	Isomerización D27 al 20 % en CD3B2186 HC-CDR1	Nota: La isomerización D27 bajo estrés de pH se observa en todos los candidatos CD3B376 y se cree que no afecta la actividad.

Ejemplo 6: Diseño, secuencia y estructura molecular de anticuerpo

triespecífico BGCB491

El BGCB491 es un anticuerpo triespecífico G1 de inmunoglobulina (Ig) que

5 puede unirse simultáneamente o independientemente a la subunidad épsilon del grupo del complejo receptor 3 de diferenciación (CD3 ϵ) (ID de Uniprot: P07766) en linfocitos T (células T) y a GPRC5D (receptor acoplado a la proteína G familia C del grupo 5, miembro D, ID de Uniprot: Q9NZD1) y BCMA (antígeno de maduración de células B, TNFRSF17, ID de Uniprot: Q02223) en células tumorales. El anticuerpo

10 incluye mutaciones de L234A, L235A y D265S en la región constante (Fc) para eliminar la interacción con los receptores de Fc y la heterodimerización se mejora con las mutaciones de la plataforma de botones en ojales ¹. La cadena “ojal” anti-CD3 ϵ también incluyó mutaciones “RF” (H435R, Y436F) para interrumpir la unión de la proteína A de cadenas de ojal monoméricas y homodimerizadas². La molécula

15 comprende una región Fab anti-CD3 ϵ en la cadena “ojal, RF” y una región v scFv

anti-GPRC5D fusionada sobre el terminal C. La cadena “botón” incluye el scFv anti-BCMA. El anticuerpo triespecífico se desarrolló para evaluar el potencial terapéutico de GPRC5D y BCMA y CD3 dirigidos a doble tumor para la redirección de las células T. En la Figura 16 se representa una ilustración de BGCB491.

5 El anticuerpo BGCB491 triespecífico se generó mediante la coexpresión de la cadena pesada anti-CD3 (HC) A fusionada al scFv anti-GPRC5D de terminal C y la cadena ligera anti-CD3 (LC) con el scFv anti-BCMA fusionado a “botón” que contiene la cadena pesada B. La región variable anti-CD3 (VR000017350) se descubrió mediante la inmunización de ratas humanizadas

10 transgénicas [Omnirata (OMTTM)] con proteína CD3ε recombinante. La región variable anti-GPRC5d (VR000038761) incluida en el BGCB491 se deriva del mAb GC5B680, se descubrió mediante la inmunización de ratones humanizados transgénicos [Ablexis] con ADN que codifica la GPRC5d. La región v parental (VR000029832) contenía un motivo “NSS” en la región de marco de HC 3 que

15 presentó un riesgo de glicosilación unida a N y que representó una mutación a partir de la línea germinal IGHV2-26*01. El sitio se mutó nuevamente a la secuencia de la línea germinal “STS” para eliminar el riesgo de glicosilación unida a N, y este cambio dio como resultado la región variable final VR000038761. La región variable anti-BCMA (VR000003260) incluida en

20 BGCB491 se deriva del mAb BCMB519, se descubrió mediante la inmunización de ratones humanizados transgénicos [Ablexis] con proteína BCMA recombinante. No se realizaron modificaciones adicionales a esta región v.

Tanto las regiones v anti-GPRC5D y anti-BCMA se formatearon como variable de fragmento monocatenario (scFv) en la molécula final.

La secuencia de aminoácidos para la cadena ligera y las cadenas pesadas BGCB491, como se deduce de la secuencia de ADNc (sec. con núms. de ident.

5 165, 166 y 167) de BGCB491 y confirmado por mapeo de péptidos y espectrometría de masas se muestra a continuación (Tabla 11). Las 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR), definidas de acuerdo con la numeración ABM, en cada cadena están en **negrita y subrayadas**. El residuo Gln en la posición 1 de la cadena pesada de BGCB491 1, el residuo Gln en la posición 1
10 de la cadena ligera de BGCB491 y el residuo Glu en la posición 1 de la cadena pesada 2 de BGCB491 constituye los terminales N de las cadenas maduras. Ambas cadenas pesadas que comprenden AAS de IgG1 de BGCB491 tienen las siguientes mutaciones puntuales: L234A, L235A y D265S. La cadena pesada 1 de BGCB491 incluye las mutaciones “ojal”: T366S, L368A, Y407V y las mutaciones
15 RF: H435R, Y436F, mientras que la cadena pesada 2 incluye la mutación “botón”: T366W. Las mutaciones de botones en ojales promueven la heterodimerización del Fc³. Las mutaciones “RF” interrumpen la unión a la proteína A. Las mutaciones para el silenciamiento del receptor de FcγR (AAS) y las mutaciones de botones en ojales están subrayadas en las secuencias a continuación.

20

Tabla 11. Secuencia de aminoácidos de BGCB491

Área	Secuencia de AA	Sec. con núm. de ident.
Cadena ligera 1	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCT <u>TGTSSNIG TYKFVS</u> WYQQ HPDKAPKVLL Y <u>EVSKRPS</u> GV SSRFSGSKSG NTASLTISGL	30

	QAEDQADYHC <u>VS</u>YAGSGTLL FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTSPK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	
Cadena pesada 1	QVQLQQSGPR LVRPSQTL ~~SL~~ TCAIS <u>GDSVF</u> <u>NNNAAWS</u> WIR QSPSRGLEWL <u>GRTYYRSKWL</u> <u>YD</u> YAVSVKSR ITVNPDTSRN QFTLQLNSVT PEDTALYYCA <u>RGYSSSF</u> <u>FDYW</u> GQGT ~~LV~~ TVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE <u>AAGG</u> PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVV <u>SVS</u> HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSL <u>SC</u> <u>AV</u> KGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRT QKSLSLSPGK GGGSGGGGS GGGSGGGGS DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS IS <u>CRSSQSLV</u> <u>HSDGNTYLSW</u> LQQRPGQPPR LLIY <u>KISNRF</u> <u>FG</u> VPDRFSGS GAGTDFTLKI SRVEAEDGV YYC <u>MQATQFP</u> <u>HTF</u> GQGTKLE IKGGSEGKSS GSGSESKSTG GSQVTLKESG PVLVKPTETL TLTCTV <u>SGFS</u> <u>LTNIRMSVSW</u> IRQPPGKALE WLA <u>HIFSNDE</u> <u>KSYSTSLKSR</u> LTISRDTSKS QVVLTLNVD PVDATYYCA <u>RMRLPYGMDV</u> WGQGTTVTVS S	29
Cadena pesada 2	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC <u>RASQ</u> <u>SIS</u> <u>SSFLT</u> WYQQK PGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIP DRFSGGGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC <u>Q</u> <u>HYGSSPMYTF</u> GQGTKLEIKG GSEGKSSGSG SESKSTGGSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAAS <u>GFTFSS</u> <u>YAMS</u> WVRQAP GKGLEWV <u>SAI</u> <u>SGSGGSTY</u> YA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCA <u>KDEG</u> <u>YSSGHYYGMD</u> <u>VW</u> GQGTTTVT SSEPKSSDKT HTCPCPAPE <u>AAGG</u> PSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV <u>VSV</u> SHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SL <u>W</u> CLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSLKTV KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	31

Ejemplo 7: Evaluación de riesgo de inmunogenicidad de anticuerpo triespecífico BGCB491

Las secuencias de anticuerpos triespecíficos se analizaron para determinar la
5 inmunogenicidad potencial mediante el uso de puntuaciones ajustadas de regulación
T (T_{reg}) del programa de predicción de inmunogenicidad *in silico* EpiVax
Epimatrix⁴(Tabla 12). El programa EpiVax calcula el potencial de unión a las

moléculas HLA más comunes dentro de cada uno de los “supertipos”. El informe proporciona resultados que son representativos de > 90 % de poblaciones humanas en todo el mundo sin la necesidad de probar cada haplotipo individualmente. La puntuación EpiVax se calcula al agregar las puntuaciones EpiMatrix de todos los epítopos de células T previstos contenidos dentro de una secuencia de proteína dada y al ajustar el contenido de epítipo de células T y la longitud de proteína esperadas. La interpretación de la puntuación de EpiVax es como sigue: una puntuación del EpiVax de < -20 es “Ideal”; una puntuación de EpiVax de -20 a +20 es “Aceptable”; y una puntuación de EpiVax de > +20 es “Inaceptable”.

10

Tabla 12: Evaluación de inmunogenicidad para BGCB491

BGCB491 Información de cadena	Secuencia de aminoácidos de región variable	Sec. con núm. de ident.	Puntuación de EpiVax	Interpretación de la puntuación de EpiVax
Cadena ligera 1 (CD3B376) VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT SSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTL LFGGGTKLTVL	7	-44,88	Ideal
Cadena pesada 1 (CD3B376) VH	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAIS GDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRIT VNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALY YCARGYSSSFYWGQGLTVTVSS	8	+65,28	Inaceptable
scFv de N-terminal de cadena pesada 2 (GC5B680 N68S, S69T) VL	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRS SQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQP PRLLIYKISNRFFGVDPDRFSGSGAG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQ FPHTFGQGKLEIK	15	-3,12	Aceptable
scFv de N-terminal de cadena pesada 2 (GC5B680 N68S, S69T) VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVS GFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWL AHIFSNDKSYSTSLKSRLTISRDT KSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARM RLPYGMDVWGQGTITVTVSS	16	-11,65	Aceptable
scFv de C-terminal de cadena pesada 2 (BCMB519) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGGSGTDFTLT	23	-52,88	Ideal

	ISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTF GQGTKLEIK			
scFv de C-terminal de cadena pesada 2 (BCMB519) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDEGYSSGHYYGMDVWGQGTTV TVSS	24	-54,35	Ideal

Ejemplo 8: Estudios de comparación de anticuerpos triespecíficos

El BGCB463 y BGCB491, como se describió anteriormente, se probaron en la serie de siguientes estudios.

5

Los anticuerpos triespecíficos median la destrucción de células positivas diana solamente

El BGCB463, BGCB491 y tres controles (BGCB4821 (CD3xNullxNull), BGCB483 (CD3xNullxBCMA), BGCB484 (CD3xGPRC5DxNull)) se evaluaron frente a células de BCMA⁺ GPRC5D⁺ (Figura 17A) y células de BCM⁻ GPRC5D⁻ (Figura 17B). La relación efector a diana (E/D) fue de 3:1; n = 1 donantes de células T, 72 horas de incubación, concentración superior 53 nM, dilución de 1-5. Se realizaron pruebas para determinar la citotoxicidad y la activación de células T. Los resultados muestran que BGCB463 y BGCB491 solo median la destrucción de las células de BCMA⁺ GPRC5D⁺ (como se muestra en la Figura 17A) mientras las células de BCMA⁻ GPRC5D⁻ no se vieron afectadas (como se muestra en la Figura 17B).

10

15

Los anticuerpos triespecíficos son activos en agotar líneas celulares clonales (CRISPR)

El BGCB463 y BGCB491 agotaron las líneas celulares WT de H929, KO de GPRC5D y KO de BCMA 72 y 96 horas después de la incubación primaria (Figura 18A). La relación E:D fue 3:1, n = 5 donadores de células T; 72(5) y 96(4) horas de incubación; concentración superior de 532 mM, gradiente de dilución 1-5. Los valores de EC_{50} se muestran a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13: Valores de EC_{50} para la prueba de citotoxicidad de 72/96 horas con BGCB463 y BGCB491

Tiempo de incubación	BGCB463	BGCB491	Tipo celular
72 h	Citotoxicidad		
Valor de EC_{50} (nM)	0,007	0,006	H929 WT
	2,055	0,322	H929-GPRC5D KO
	0,539	4,517	H929-BCMA KO
96 h			
Valor de EC_{50} (nM)	0,003	0,003	H929 WT
	1,580	0,226	H929-GPRC5D KO
	0,269	2,759	H929-BCMA KO

BGCB463 y BGCB491 también desencadenan la activación de células T mientras agotan las células CRISPR. Ambos anticuerpos muestran una mayor activación de células T después de 72 y 96 horas en las mismas células WT de H929, KO de GPRC5D y KO de BCMA como se mencionó anteriormente (Figura 18B y Tabla 14).

Tabla 14: Valores de EC_{50} para la prueba de células T de 72/96 horas con BGCB463 y BGCB491

Tiempo de incubación	BGCB463	BGCB491	Tipo celular
72 h	Activación de células T		
Valor de EC_{50} (nM)	0,009	0,011	H929 WT
	3,139	0,520	H929-GPRC5D KO

	0,517	3,110	H929-BCMA KO
96 h			
Valor de EC ₅₀ (nM)	0,007	0,009	H929 WT
	3,507	0,480	H929-GPRC5D KO
	0,445	3,458	H929-BCMA KO

Los anticuerpos triespecíficos pueden agotar líneas celulares de linfoma (solo BCMA)

El BGCB463 y BGCB491 se probaron en ensayos de citotoxicidad y activación de células T con líneas de células H929, RAMOS y GRANTA-519. Los resultados muestran que ambos anticuerpos agotaron las líneas RAMOS y GANTA-519, aunque se requirieron concentraciones más altas de ambos anticuerpos (Figura 19, con EC₅₀ en la Tabla 15). E:D fue 5:1, n = 1 donante de células T; 72 horas de incubación solamente; concentración superior de 53 nM; y una dilución de 1-5.

Tabla 15: Valores de EC₅₀ para el agotamiento de la línea celular de linfoma con BGCB463 y BGCB491

	BGCB463	BGCB491	Línea celular
	Citotoxicidad		
Valor de EC ₅₀ (nM)	0,004	0,005	H929 WT
	n/a	2,813	Ramos
	80,980	8,584	Granta-519
	Activación de células T		
Valor de EC ₅₀ (nM)	0,012	0,022	H929 WT
	17,580	1,387	Ramos
	3,300	1,644	Granta-519

Los anticuerpos triespecíficos agotan las células positivas diana en el ensayo de sangre completa

El BGCB463 y BGCB491 se evaluaron en ensayos de citotoxicidad y de sangre completa de activación de células T con células H292. Los resultados muestran la citotoxicidad y la activación de células T (Figura 20 y valores de EC50 en la Tabla 16). E:D fue 5:1, n = 2 donantes de sangre entera; 48 horas de incubación; concentración superior de 532 nM; y una dilución de 1-5.

Tabla 16: Valores de EC para el agotamiento de células de sangre completa con BGCB463 y BGCB491

Valor de EC (nM)	BGCB463	BGCB491
Citotoxicidad		
EC ₂₀	0,159	0,084
EC ₅₀	0,574	0,648
EC ₉₀	4,412	16,380
Activación de células T		
EC ₂₀	0,044	0,027
EC ₅₀	0,297	0,544
EC ₉₀	6,199	63,160

Los anticuerpos triespecíficos retroceden el crecimiento tumoral en ratones

Se demostró que el BGCB463 retrocede el crecimiento tumoral en modelos de ratón con xenoinjerto MM.1S y RPMI 8226 si se administraba en una dosis suficientemente alta: ya sea 2 µg o 10 µg en el modelo de MM.1S (Figura 21A) o 5 µg o 10 µg en el modelo de RPMI 8226 (Figura 21B). Los tumores detuvieron el crecimiento o mostraron una reducción en el crecimiento en comparación con las condiciones de control.

Además, se demostró que tanto el BGCB463 como el BGCB491 retroceden el crecimiento tumoral en modelos de ratón con xenoinjerto profiláctico H929. En comparación con los controles PBS, ambas dosis de 0,5 µg y 5 µg ralentizaron el

crecimiento tumoral en ambos modelos KO de BCMA de H929 y KO de GPRC5D de H929, con la concentración más alta de 5 μ g que muestra más efecto (Figura 22).

Unión de Pan-T DRC

5 El BGCB463 y BGCB491 se probaron en un ensayo de unión de Pan-T DRC de 1 hora, a 37 °C. Se usaron dos donantes de células Pan T humanas, y las moléculas de prueba tuvieron concentraciones iniciales de 2 μ M con una dilución 1:3 y DRC de 11 puntos. Detección secundaria a través de Alexa Fluor® 647 AffiniPure IgG antihumana de cabra (H+L). La FACS se realizó mediante el
10 uso de Intellicyte Ique Screener plus. Los resultados mostrados en la Figura 23, con BGCB491 que tiene un EC₅₀ de 0,1903 y superior de 188194, y BGCB463 con EC₅₀ de 0,1258 y superior de 303269. Los valores de EC₅₀ demostrados están dentro de los parámetros esperados para el brazo de unión a CD3.

15 *Unión de serie de H929 DRC*

El BGCB463 y BGCB491 se probaron contra células WT de H929, KO de BCMA de H929, KO de GPRC5D de H929 y células dobles KO de GPRC5D/BCMA de H929 en un ensayo de unión de serie DRC de 1 hora, 37 °C. Los resultados se muestran en las Figuras 24A-24D, todos con un control nulo
20 (BGCB510). Los valores de EC se muestran en la Tabla 17. Los resultados mostraron que BGCB491 ha aumentado la unión mediada por BCMA y la unión mediada por GPRC5D en comparación con BGCB463.

Tabla 17: Valores de EC (uM) para BGCB463 y BGCB491 en la unión de serie H929

	BGCB463	BGCB491
	<i>H929 WT</i>	
EC ₅₀	n/a	0,270
EC ₉₀	n/a	25,049
	<i>KO de BCMA de H929</i>	
EC ₅₀	11,7	3,183
EC ₉₀	n/a	n/a
	<i>GPRC5D-KO de H929</i>	
EC ₅₀	0,504	0,210
EC ₉₀	8,385	3,896

Estudios de análisis de anticuerpos triespecíficos

5 La siguiente Tabla 18 proporciona varios análisis de BGCB463 y BGCB491.

Tabla 18: Síntesis de análisis de anticuerpos triespecíficos BGCB463 y BGCB491

Análisis	BGCB463	BGCB491
Pureza (AUC) (purificación posterior a 3 etapas)	96,4 % de monómero	98,9 % de monómero
Estabilidad de conformación (DSC, histidina, pH 6,5)	Tms = 63 °C, 68 °C, 72 °C	Tms = 63 °C, 68 °C, 72 °C
PI medido (cIEF)	pI: 9,51	pI: 9,56
Hidrofobia relativa mediante HICa	Hidrofobicidad moderada	Baja hidrofobicidad relativa (HI = 0,38)
Análisis de PTM (LC-MS)	<10 % de PTM de CDR	<5 % de PTM de CDR
Afinidad de unión (SPR)	KD: CD3 (31,3 ± 8,7 nM); BCMA (844 ± 128 pM)	KD: BCMA (2,12E-10 M); CD3 (2,51E-08 M)
Interferencia de suero (octeto)	Unión no afectada	Unión no afectada
Estabilidad del suero (SEC-FDS, lote estable)	~12 % de aumento en HMW después de una incubación de 7 días a 37 °C	~5 % de aumento en HMW después de una incubación de 7 días a 37 °C
Unión no específica (SPR)	Ninguno	Ninguno
Concentrabilidad	~180 mg/ml, 89 % de recuperación, 97 % de monómero	~180 mg/ml, 91 % de recuperación, 97,5 % de monómero

Viscosidad a 150 mg/ml		5,48 cP	6,3 cP
HCLF: % de monómero después de 2 semanas a 4 °C y 40 °C (AUC)		La agregación a 180 mg/ml aumentó a 15 % y 34 % después de 2 semanas a 4 °C y 40 °C	La agregación a 180 mg/ml aumentó a 36 % y 34 % después de 2 semanas a 40 °C, sin aumento en HMW a 4 °C
Estrés fisiológico: 37 °C, 2 mg/ml, PBS pH 7,4		No cambia la afinidad física/química	Ningún aumento en HMW, aumento significativo en LMW (15 % por SEC, ~18 % por GXII): 18 % de actividad de unión inferior a CD3, unión a BCMA no afectada
PTM que inducen estrés	pH 8,5, 1 semana, 40 °C	20 % de isomerización D27 (CD3, HCDR1), aglutinado; <10 % de desamidación/isomerización en otros residuos de CDR	~12 % de isomerización D27 (CD3, HCDR1); aumento en LMW (~15 % por SEC, ~20 % por GXII): unión no afectada
	pH 5, 1 semana, 40 °C	Sin aumento en las PTM de CDR	No hay cambios significativos
	pH 3,5, 6h, t.a.	Sin aumento en las PTM de CDR	No hay cambios significativos
	Oxidación química	68 % de oxidación M94; 15 % de oxidación M232; M600 al 68 %; Unión de CD3 no afectada, unión a BCMA con 2 veces de liberación	Oxidación de 97 % M94 (GC5B680, LCDR3); M600 al 99 % (BCMB519 LCDR3); Unión de CD3 no afectada, afinidad de unión a BCMA ligeramente afectada (~2-3 veces de liberación)
	Oxidación metálica	Sin aumento en las PTM de CDR	No hay cambios significativos

Ejemplo 9: Evaluaciones biofísicas del anticuerpo triespecífico BGCB491

- La Tabla 19A proporciona unión al antígeno recombinante, reactividad cruzada de especies, identificación de epítomos, unión al receptor de Fc y
- 5 atributos de propiedad intrínseca biofísica de BGCB491. La Tabla 19B proporciona características adicionales para BGCB491.

Tabla 19A: Lista de evaluaciones biofísicas y resultados para BGCB491

Característica de TMP de mAb	Resultado	Comentarios
Unión		
Afinidad de unión para el brazo CD3 humano (SPR)	$K_D = 2,5 \times 10^{-8}$ M	Antígeno: constructo de heterodímero CD3 ϵ y recombinante (CD3W200)
Afinidad de unión para los brazos de BCMA y GPRC5D humanos (SPR)	BCMA humano: $K_D = 2,1 \times 10^{-10}$ M; Antígeno: BCMW37. GPRC5D humano: ningún dato de SPR está disponible para GPRC5D debido a la falta de reactivo soluble representativo para este objetivo transmembrana. La unión de afinidad se evaluó mediante el método a base de células en células KO de BCMA de H929 en su lugar (ver el Ejemplo 11)	Unión a BCMA parental usando antígeno BCMW37: $K_D = 2,8 \times 10^{-10}$ M como scFv; $EC_{50} = 2,3-3,2$ nM como scFv que se une a las células H929 y MM.1R; unión a GPRC5D parental a células H929 y MM.1R; $EC_{50} = 6-24$ nM como Fab
Reactividad cruzada para scFv BCMB519 a BCMA de cynomolgus (SPR)	Sin unión/baja hasta 300 nM	Los datos de unión se recolectaron de BCMB601 que contiene scFv BCMB519
Unión al receptor de Fc γ (SPR)	Sin unión significativa	Como se esperaba para el marco silencioso hIgG1-AAS
Unión a FcRn (SPR)	pH 6,0: hFcRn $K_D = 485$ nM; cyFcRn $K_D = 314$ nM	Disociación rápida a pH 7,4
Interferencia de suero (octeto)	k_a regulador/ k_a suero < 2,0	No hay un cambio significativo en la tasa de asociación a bt-BCMA y bt-CD3 en suero humano al 50 %. No se determinó para GPRC5D debido a la falta de reactivo soluble representativo.
Epítipo de unión a GPRC5D	No determinado	N/A
Epítipo de unión para CD3	Epítipo lineal que abarca los residuos 22-35 (QDGNEEMGGITQTP (sec. con núm. de ident.: 161)) de la cadena CD3 ϵ (P07766, CD3E_Humano)	Secuencia de epítipos determinada para CD3B376 de anticuerpo parental frente a CD3W220 por HDX-MS
Epítipo de unión a BCMA	El epítipo lineal que abarca los residuos 17-26 (LLHACIPCQL (sec. con núm. de ident.: 162)) de BCMW37 de BCMA	Los datos de HDX-MS muestran que los residuos 17-18 y 21-26 de BCMW37 están protegidos por BGCB465 (contiene el mismo scFv anti-BCMA)
Caracterización de proteínas		
Masa de anticuerpos intacta, liberación (MS)	155.978,8 Da	N/A
Perfil de glicoforma (MS)	Perfil de IgG1 típico con glicoforma principal G0F/G0F	N/A
Nivel de homodímero(s) (MS)	No se detectó HD1 y HD2	N/A

Característica de TMP de mAb	Resultado	Comentarios
Niveles de otras impurezas relacionadas con el producto (MS)	Ninguna observada	N/A
Glic. de enlace N (no Fc) (MS)	Ninguna predicha u observada	N/A
Sitios de glic. de enlace O (MS)	Ninguna observada	N/A
Glicación (% de abundancia relativa) (MS)	HC1 (CD3), 16,7 %; LC1 (CD3), 5,4 %; HC2 (GPCRC5DxBCMA), 8,1 %	Los valores de glicación representan el límite superior debido a la sobreestimación causada por los valores iniciales distintos a cero
Cis libre (MS)	Ninguna predicha u observada	N/A
Alargamiento/truncamiento de N-terminal (MS)	Ninguna observada	N/A
Estabilidad de conformación (DSC)	$T_{m1} = 62,9\text{ °C}$; $T_{m2} = 68,3\text{ °C}$; $T_{m3} = 71,9\text{ °C}$	Medido en 10 mM de histidina a pH 6,5; T_{m1} fue contribuida por el dominio CD376-Fab T_{m2} fue contribuida por varias partes de esta molécula; T_{m3} fue contribuida por el dominio CH3
% de pureza (purificación en 2 etapas) (AUC)	98,9 % de monómero	Medido en 10 mM de L-histidina a pH 6,5
Estabilidad en suero (SEC-FDS)	~5 % de aumento en HMW después de una incubación de 7 días a 37 °C	Evaluated por SEC mediante el uso de BCMAxGPCRC5DxCD3 marcado con Alexa488
Unión no específica	No se observó ninguna unión no específica	N/A
Punto isoelectrico (cIEF)	pI = 9,56; % de área pico ácida/principal/básica: 46/54/0	N/A
Hidrofobicidad relativa (HICa)	Baja hidrofobicidad (índice de hidrofobicidad 0,38) pero pico ancho y residual	N/A
Viscosidad	6,3 cP	Determinado a 150 mg/ml en 10 mM de L-histidina a pH 6,5
Estabilidad a alta concentración de 2 semanas (4 y 40 °C, objetivo 150 mg/ml)		
Concentrabilidad y % de recuperación en regulador de L-histidina a pH 6,5	La muestra se concentró hasta 183,5 mg/ml con 91 % de recuperación	N/A
% de monómero (inicial) (AUC)	97,5 %	Determinado en 10 mM de L-histidina a pH 6,5
% de monómeros 2 semanas, 4 °C (AUC)	95,4 %	Determinado en 10 mM de L-histidina a pH 6,5
% de monómeros 2 semanas, 40 °C (AUC)	62,8 %	Determinado en 10 mM de L-histidina a pH 6,5
Estabilidad química (PTM) y física		

Característica de TMP de mAb	Resultado	Comentarios
MS intacto después de la degradación forzada (MS)	El tratamiento con oxidación química dio como resultado 4 oxidaciones en cada HC. Bajo estrés fisiológico, se observaron fragmentos de todos los dominios. El estrés de desamidación da como resultado principalmente fragmentos de GPRC5D, aunque también se observaron 2 fragmentos del scFv de BCMA.	N/A
Tamaño después de la degradación forzada (aSEC)	% de monómero intacto Liberación = 100,0; *Fisiológica = 96,0; térmica = 63,7; pH 8,5 = 83,2; pH 5,0 = 99,3; pH 3,5 = 100,0; ox. química = 98,5; ox. metálica = 97,6	El aumento de agregación a alta concentración a 40 °C fue evidente con el tiempo y se requiere un estudio de formulación de seguimiento para mitigar la propensión a la agregación. Recorte observado después del pH 8,5 y estrés fisiológico.
Degradación forzada de la pureza (R y NR GXII)	NR G XII % intacto: liberación = 100; fisiológica = 82; térmica = 99; pH 8,5 = 82; pH 5,0 = 99; pH 3,5 = 100; ox. química = 100; ox. metálica = 100	Recorte observado después del pH 8,5 y estrés fisiológico.
Unión a CD3 después de la degradación forzada (SPR)	Afinidad (M) / % activo: liberación = $2,51 \times 10^{-8}$ / 100; fisiológica = $1,93 \times 10^{-8}$ / 82; térmica = $2,58 \times 10^{-8}$ / 100; pH 8,5 = $2,16 \times 10^{-8}$ / 93; pH 5,0 = $2,26 \times 10^{-8}$ / 88; pH 3,5 = $2,17 \times 10^{-8}$ / 94; ox. quím. $2,27 \times 10^{-8}$ / 93; ox. metálica = $2,33 \times 10^{-8}$ / 98	La afinidad a CD3 se retuvo en todas las condiciones de estrés evaluadas. Reducción en % de especies activas después del estrés del pH 8,5.
Unión a BCMA después de la degradación forzada (SPR)	Afinidad (M) / % activo: liberación = $2,12 \times 10^{-10}$ / 100; fisiológica = $1,43 \times 10^{-10}$ / 110; térmica = $2,81 \times 10^{-10}$ / 137; pH 8,5 = $1,60 \times 10^{-10}$ / 114; pH 5,0 = $2,07 \times 10^{-10}$ / 154; pH 3,5 = $1,75 \times 10^{-10}$ / 116; ox. química = $5,37 \times 10^{-11}$ / 131; ox. química = $2,15 \times 10^{-10}$ / 110	N/A
Nivel de oxidación basal	2,4 % en M94 (GC5B680 scFv LCDR3); 1,3 % en M166 (HCDR1 de scFv de GC5B680); 1,9 % en M232 (HCDR3 de scFv de GC5B680); 4,4 % en M600 (BCMB519 scFv LCDR3)	N/A

Característica de TMP de mAb	Resultado	Comentarios
Met/Trp (cambio en el estrés oxidativo)	96,9 % en M94 (LCDR3 de scFv de GC5B680); 14,0 % en M166 (HCDR1 de scFv de GC5B680); 14,3 % en M232 (HCDR3 de scFv de GC5B680); 99,2 % en M600 (BCMB519 scFv LCDR3)	N/A
Nivel de desamidación basal	< 1 % en CDR	N/A
Sitios de desamidación (cambio en estrés)	Sin cambio significativo	N/A
Nivel de isomerización basal	< 1 % en CDR	N/A
Sitios de isomerización (cambio en estrés)	11,7 % de isomerización D27 en HCDR1 de CD3B376; 5,3 % de isomerización D731 en LCDR3 de scFv de BCMB519	Nota: La isomerización D27 bajo estrés de pH se observó en todos los candidatos CD3B376 y se cree que no afecta la actividad.

- 5 AAS, L234A, L235A y D265S; Ab, anticuerpo; aHIC, cromatografía de interacción hidrófoba analítica; aSEC, cromatografía de exclusión por tamaño analítica; AUC, ultracentrifugación analítica; bt, biotinilado; CDR, región determinante de complementariedad; Ox. quím., oxidación química; cIEF, enfoque isoelectrico capilar; cy o cyno, macaco cynomolgus; Cys, cisteína, DSC, calorimetría diferencial de barrido; EC₅₀, 50 % de concentración efectiva; Fab, unión al antígeno de fragmento; Fc, de fragmento cristizable; FcRn, receptor de Fc neonatal; FDS, sistema de detección de fluorescencia; gly, glicosilación; h, humano; HC, cadena pesada; HCDR, región determinante de complementariedad de cadena pesada; HD, homodímero; HDX, intercambio de deuterio e hidrógeno; HMW, especies de peso molecular más alto Ig, inmunoglobulina; k_a, constante de asociación; K_D, constante de disociación de equilibrio, LC, cadena ligera; LCDR, región determinante de complementariedad de cadena ligera; mAb, anticuerpo monoclonal; Met, metionina; Ox. metal., oxidación metálica; MS, espectrometría de masa; N/A, no evaluado; NME, nueva entidad molecular; NR GXII, electroforesis capilar no reducida; PBS, solución salina regulada con fosfato; pl, punto isoelectrico PS20, polisorbato 20; ref., referencia; R GXII, electroforesis capilar reducida; scFv, fragmento variable monocatenario; SEC, cromatografía de exclusión por tamaño; SPR, resonancia del plasmón de superficie; T_m, temperatura de fusión; TMP, producto medicinal objetivo; Trp, triptófano.
- 10
- 15

Tabla 19B: Características adicionales para los brazos de unión en BGCB491

Parámetros principales		Características
BCMA: BCMB519	Afinidad	K _D = 0,28 nM como scFv (SPR) EC ₅₀ = 2,3-3,2 nM como scFv (H929 y MM.1R)
	Epítipo	Epítipo lineal a.a. 17-26 (LLHACIPCQL)
	Función	Bloquea la unión de BAFF y APRIL # Sin actividad agonista [#]
GPRC5D: GC5B680	Afinidad	EC ₅₀ = 6-24 nM como Fab (H929 y MM.1R)
CD3: CD3B376	Afinidad	EC ₅₀ = 3,4 μM* (célula T)
	Epítipo	Epítipo de N-terminal a.a. 22-35 (QDGNEEMGGITQTP) de la cadena CD3ε
Perfil fuera del objetivo	Retrogenix	CLEAN, sin coincidencias fuera del objetivo (aglutinantes de BCMA y GPRC5D)

* Células T: EC₅₀ determinado basándose en extrapolación de punto fijo debido a curvas de unión no saturadas a la concentración más alta probada de 2 μM

Ejemplo 10: Caracterización de BGCB491 de unión de brazo objetivo y de brazo CD3

Unión de la línea celular tumoral endógena de BGCB491

Se usó citometría de flujo para evaluar la unión del brazo de BCMA y

- 5 GPRC5D de BGCB491 in vitro. El BGCB491 y el control de isotipo se probaron en un panel de líneas celulares WT de H929, KO de BCMA de H929, KO de GPRC5D de H929 y KO de BCMA/GPRC5D de H929 después de 1 hora de incubación a 37 °C.

El BGCB491 mostró una unión específica en WT, así como cada línea de inactivación (KO) verificando la unión de cada brazo de unión a la diana

- 10 individual (Figura 25, tabla 20).

Tabla 20. Valores de ECx para la unión de la serie WT de H929 y KO de BGCB491 de 5 experimentos independientes

	Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3	Ejecución 4	Ejecución 5	Media
H929-WT						
EC ₂₀ (nM)	15	NFC	N/A	4	8	8
EC ₅₀ (nM)	270	NFC	N/A	34	66	66
EC ₉₀ (nM)	25,000	NFC	N/A	878	1912	1912
H929-BCMA-KO (brazo de GPRC5D)						
EC ₂₀ (nM)	NFC	19	NFC	NFC	NFC	NFC
EC ₅₀ (nM)	NFC	66	NFC	NFC	NFC	NFC
EC ₉₀ (nM)	NFC	489	NFC	NFC	NFC	NFC
KO de GPRC5D de H929 (brazo de BCMA)						
EC ₂₀ (nM)	33	17	23	10	12	17
EC ₅₀ (nM)	210	54	224	50	53	54
EC ₉₀ (nM)	3900	345	7900	645	535	645

EC_x, x % de concentración efectiva; KO, inactivación; Med, mediana; N/A, no evaluado; NFC, curva incompleta; WT, tipo silvestre.

El experimento de unión cinética de 24 horas se realizó en el anticuerpo trispecífico de la citometría de flujo BGCB491 para evaluar la cinética de unión en las líneas celulares de H929 WT y MM.1R WT en 50, 10, 2 nM durante la incubación de 24 horas a 37 °C (ver la Figura 40). Como se demuestra en la

Figura 40, se observaron perfiles de unión estables en ambas líneas celulares durante el período de 24 horas.

Unión primaria de células T de BGCB491

Se usó citometría de flujo para evaluar el brazo de CD3 (es decir, CD3B376) unión de BGCB491 a células pan T CD3⁺ de 7 humanos sanos diferentes. No se pudo determinar la EC₅₀ basada en células para CD3B376 debido a la falta de cinética de saturación en 1 hora (Figura 26). Se realizó extrapolación bioinformática (Figura 27) con el uso de la molécula de anticuerpo de control CD3B376xNull (es decir, GCDB381), que satura dentro de una respuesta de dosis superior de 2 µM para limitar la parte superior de la curva de regresión no lineal para generar una curva completa que permite la estimación de valores de EC_x (Tabla 21).

Tabla 21: Cálculo de valores de EC_x de la unión de BGCB491 a células T basadas en un punto de saturación fijo de extrapolación bioinformática

Donante	EC ₂₀ estimada (µM)	Intervalo de confianza de 95 %	EC ₅₀ estimada (µM)	Intervalo de confianza de 95 %
D203727	0,222	(0,193, 0,255)	3,37	(3,01, 3,77)
D316144	0,279	(0,237, 0,329)	4,99	(4,26, 5,85)
D327645	0,188	(0,153, 0,230)	3,36	(2,86, 3,94)
Mediana	0,222		3,37	

EC_x, x % de concentración efectiva; D, donante.

A pesar del uso de un brazo de unión a CD3 débil, el BGCB491 mostró una potencia subpicomolar robusta con citotoxicidad máxima en relaciones E:T de 1:1 y 1:3 en el ensayo de citotoxicidad cinética realizado en el Incucyte a través de 3 donantes de células pan T durante 120 horas. En un ensayo de

5 citotoxicidad por curso temporal, se usó Incucyte S3 para evaluar la citotoxicidad objetivo cinética y los perfiles de activación de células T de BGCB491 en células H929-GFP a través de 3 donantes de células pan T durante 120 horas. El BGCB491 alcanzó una citotoxicidad máxima notable aproximadamente 72 horas a todas las concentraciones excepto por la concentración más baja probada (10

10 pM) a una relación E:T de 1:3 (Figura 42). A partir de los gráficos cinéticos, la información para el porcentaje de citólisis y la activación de células T en puntos temporales de 72, 93 y 120 horas se extrajo para la relación E:T de 1:1 (Figura 43) y la relación E:T de 1:3 (Figura 44). El BGCB491 mostró una potencia de destrucción subpicomolar robusta en ambas relaciones E:T (Tabla 22). En el

15 Ejemplo 12 se ilustran caracterizaciones de citotoxicidad más a profundidad.

Tabla 22: Valores de ECx promedio derivados de citólisis por porcentaje de H929-GFP en el ensayo de destrucción cinética

	E:T 1:1	E:T 1:3
72 horas		
EC ₂₀ (pM)	2,1	1,1
CE ₅₀ (pM)	12,7	6,3
EC ₉₀ (pM)	212,6	93
93 horas		
EC ₂₀ (pM)	0,7	1,6
CE ₅₀ (pM)	0,9	5,5

EC ₉₀ (pM)	1,4	39
120 horas		
EC ₂₀ (pM)	0,4	2,3
CE ₅₀ (pM)	0,7	5,2
EC ₉₀ (pM)	1,8	18,9

EC_x, x % de concentración efectiva; E:T, relación de efector a diana; GFP, proteína fluorescente verde.

En breve, el BGCB491 es un mAb trispecífico totalmente humano dirigido al TCR CD3 con 1 brazo de unión y antígenos de superficie de células tumorales de BCMA o GPRC5D con los 2 dominios de unión restantes. El BGCB491 mostró propiedades biofísicas intrínsecas aceptables, y unidas a todas las líneas celulares que expresan BCMA-, GPRC5D-, y BCMA-GPRC5D duales.

Ejemplo 11: Farmacología terapéutica

Parte 1. Estudios in vitro

Expresión de superficie y densidad del receptor de BCMA y GPRC5D en líneas celulares de prueba

Un subconjunto de 4 líneas celulares positivas de objetivo dual (es decir, GPRC5D) (es decir, MM.1S, H929, JIM-3 y OPM-2) y 2 líneas celulares negativas de objetivo dual (es decir, MV-4-11 y OCI-AML-3) se caracterizaron por la expresión de proteínas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) mediante el uso de anticuerpo de BCMA comercial marcado con ficoeritrina (PE) y un anticuerpo GPRC5D elaborado de manera interna. Todas las líneas celulares positivas de objetivo tenían un cambio significativo en el patrón de expresión en comparación con el control de isotipo, mientras que las líneas celulares negativas de objetivo fallaron para mostrar cualquier expresión (Tabla 23).

Estas 6 líneas celulares con varios niveles de expresión de proteínas diana en su superficie se seleccionaron para ensayos funcionales in vitro e in vivo adicionales.

Tabla 23: Síntesis de las densidades del receptor de BCMA y GPRC5D en líneas celulares de prueba

Línea celular	GPRC5D (Ensayo-1)	GPRC5D (Ensayo-2)	GPRC5D (Promedio)	BCMA (Ensayo-1)	BCMA (Ensayo-2)	BCMA (Promedio)
MM.1S	2091	4899	3495	1870	2237	2053
H929	2443	1995	2219	6955	6908	6932
OPM-2	12,109	8159	10,134	5703	4411	5057
JIM-3	1438	1528	1483	922	1533	1228
MV-4-11	37	92	64	72	52	62
OCI-AML-3	19	67	43	89	85	87

- 5 Densidades de receptor objetivo cuantificadas en células diana positivas y negativas de objetivo mediante el uso de un kit QuantiBRITE. Valores individuales y promedio de 2 experimentos individuales enumerados anteriormente.

BGCB491 que se une a líneas celulares que expresan BCMA-GPRC5D endógenas

- 10 A continuación se determinaron los perfiles de unión de BGCB491 (mAb triespecíficos BCMAxGPRC5DxCD3) mediante la aplicación de métodos de citometría de flujo. El BGCB491 y los anticuerpos de control BCMAxGPRC5DxNull unidos a las células de MM que expresan BCMA-GPRC5D de una manera dependiente de la dosis (valores de EC₅₀: MM.1S 33,39 nM; H929, 185,50 nM; JIM-
- 15 3, 78,45 nM; OPM-2, 10,07 nM; FIGURA 41) mientras que los anticuerpos de control de CD3xNullxNull no mostraron una unión significativa en estas células. Ninguno de los anticuerpos probados se unió a las líneas celulares negativas con objetivo dual MV-4-11 y OCI-AML-3, lo que indica especificidad a BGCB491.

Citotoxicidad dependiente de células T mediada por BGCB491 de líneas celulares MM y activación de células T

Se usó un ensayo de citotoxicidad mediado por células T para evaluar la citotoxicidad in vitro y el potencial de activación de células T de BGCB491 mediante el uso de un enfoque basado en FACS. Se probó BGCB491 en diversas líneas celulares (doble positivo: BCMA-GPRC5D: MM.1S, H929, JIM-3, OPM-2; y doble negativo BCMA-GPRC5D: MV-4-11 y OCI-AML-3) usando células pan T (CD3⁺) de 6 donantes sanos. Debido a que el receptor de Fc se expresa en algunas de las células evaluadas, se añadió 2 mg/ml de bloqueador de Fc en el ensayo. Además, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull se usaron como controles negativos. El BGCB491 destruyó de manera potente líneas celulares positivas duales de BCMA-GPRC5D in vitro después de 72 horas de incubación (Figura 28A, Tabla 24). Se descubrió que el BGCB491 es un anticuerpo trispecífico potente con un rango de valor de EC₅₀ de 0,002 a 0,312 nM para la citotoxicidad y 0,008 a 1,070 nM para la activación de células T según lo medido por células T vivas CD3⁺ CD25⁺ en todas las líneas celulares positivas duales. La activación concomitante de células T se observó con solo células positivas de objetivo dual como se esperaba (Figura 28B, Tabla 24). El BGCB491 no indujo la citotoxicidad o la activación de los células T cuando se probó con líneas celulares negativas de objetivo dual MV-4-11 y OCI-AML-3, lo que demuestra la especificidad citotóxica. Los controles BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull no mostraron citotoxicidad significativa, excepto para la línea de células MM.1S, donde el anticuerpo CD3xNullxNull mostró cierta actividad a altas concentraciones (>100 nM).

Tabla 24: Síntesis de valores de EC_x para la citotoxicidad y activación de células T mediante el uso de células T de múltiples donantes sanos

	MM.1S	H929	JIM-3	OPM-2	MV-4-11	OCI-AML-3
Citotoxicidad						
EC ₂₀ (nM)	0,001	0,002	0,094	0,009	NA*	NA*
EC ₅₀ (nM)	0,002	0,005	0,312	0,019	NA*	NA*
EC ₉₀ (nM)	0,012	0,015	2,078	0,058	NA*	NA*
Citotoxicidad máxima (%)	92,580	94,470	61,220	81,320	NA*	NA*
Activación de células T CD3						
EC ₂₀ (nM)	0,002	0,002	0,242	0,006	NA*	NA*
EC ₅₀ (nM)	0,010	0,008	1,070	0,062	NA*	NA*
EC ₉₀ (nM)	0,145	0,057	11,303	2,726	NA*	NA*
Activación máxima (%)	75,030	85,900	30,850	45,950	NA*	NA*

EC_x, x % de concentración efectiva; NA, no activa.

- 5 Valores de EC_x promedio de 6 donantes de células T para la citotoxicidad y la activación de células T para cada línea celular. Se estimaron valores de EC_x post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante el uso del método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo.

Generación de células inactivadas de CRISPR de H929 y expresión de diana

- 10 Expresión y densidad de proteínas de receptor de BCMA y GPRC5D en líneas celulares H929 de inactivaciones de CRISPR

- 15 A continuación, para evaluar el potencial de BGCB491 para destruir las células con expresión de un solo objetivo, se usaron líneas celulares de KO de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) de H929 (es decir, KO de BCMA de H929 y KO de GPRC5D de H929) en un ensayo de citotoxicidad. Estas células se confirmaron por secuencia como se describe en la leyenda de la Figura 25 y se caracterizaron por la expresión de proteínas mediante FACS mediante el uso de un anticuerpo de BCMA comercial marcado con PE y un anticuerpo GPRC5D marcado con PE interno. Los perfiles

de expresión indicaron la inactivación completa de la expresión de BCMA en la línea celular KO de BCMA de H929 y de la expresión de GPRC5D en la línea celular KO de GPRC5D de H929.

5 Citotoxicidad mediada por BGCB491 de líneas celulares clonales de KO de CRISPR de H929 y activación de células T

A continuación, el anticuerpo BGCB491 se probó en las líneas celulares de KO y silvestre (WT) de CRISPR (es decir, WT de H929, KO de GPRC5D de H929 y KO de BCMA de H929) usando células Pan T (CD3⁺) de 4 donantes sanos para
 10 evaluar su potencial de agotamiento clonal al usar un protocolo basado en FACS. Además, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull se usaron como controles negativos. El BGCB491 destruyó de manera potente las 3 líneas celulares (es decir, WT de H929, KO de GPRC5D de H929 y KO de BCMA de H929) y células T activadas in vitro después de 72 horas de incubación (Figura 29). El BGCB491
 15 exhibió una potencia significativa en células WT de H929 que expresan un objetivo dual en comparación con las líneas celulares de KO de CRISPR que expresan un solo objetivo debido a la avidéz. El BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull no mostraron citotoxicidad significativa ni activación de células T. Los valores de EC₅₀ promedio que usan 4 donantes de células T sanos diferentes
 20 se compilan en la Tabla 25A. Se usaron teclistamab (anticuerpo biespecífico de BCMAxCD3) y talquetamab (anticuerpo biespecífico de GPRC5DxCD3) como controles positivos y se comportaron como se esperaba. La Tabla 25B muestra los valores de densidad del receptor por célula de las células H929.

Tabla 25A: Síntesis de valores de EC₅₀ de BGCB491 para la citotoxicidad y activación de células T mediante el uso de células H929 de KO de CRISPR

Cálculo	BGCB491	CD3xNullxNull	BCMAxGPRC5DxNull	Teclistamab	Talquetamab
Citotoxicidad					
H929-WT					
EC ₅₀ (nM)	0,007	NA*	NA*	0,275	0,243
Citotoxicidad máxima (%)	93,012	NA*	NA*	92,072	92,741
H929-GPRC5D-KO					
EC ₅₀ (nM)	0,330	NA*	NA*	0,198	NA*
Citotoxicidad máxima (%)	94,243	NA*	NA*	93,017	NA*
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (nM)	4,789	NA*	NA*	NA*	0,761
Citotoxicidad máxima (%)	65,822	NA*	NA*	NA*	84,664
Activación de células T CD3					
H929-WT					
EC ₅₀ (nM)	0,011	NA*	NA*	0,334	0,233
Citotoxicidad máxima (%)	82,147	NA*	NA*	80,196	85,399
H929-GPRC5D-KO					
EC ₅₀ (nM)	0,487	NA*	NA*	0,253	NA*
Citotoxicidad máxima (%)	81,084	NA*	NA*	79,450	NA*
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (nM)	4,131	NA*	NA*	NA*	0,633
Citotoxicidad máxima (%)	63,379	NA*	NA*	NA*	78,888

CRISPR, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparciadas EC₅₀, 50 % de concentración efectiva; E:T, efector a objetivo; Fc, de fragmento cristizable; KO, inactivación; NA, no activa.

Se muestran valores de EC₅₀ promedio de 4 donantes de células T para la citotoxicidad y activación de células T para cada línea celular (WT de H929, KO de GPRC5D de H929 y KO de BCMA de H929). Se estimaron valores de EC₅₀ post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante el uso del método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo. El teclistamab y talquetamab se usaron como controles positivos.

Tabla 25B: Densidad de receptor de células H929

Células		H929-WT	H929-GPRC5D-KO	H929-BCMA-KO
	BCMA	5381	3926	1

Densidad del receptor	GPRC5D	1574	19	957
-----------------------	--------	------	----	-----

Citotoxicidad y potencial de activación de células T de BGCB491 contra células H929 positivas de objetivo dual marcadas en sangre completa humana saludable (ensayo MABEL)

5 El ensayo MABEL se usó para caracterizar los efectos de BGCB491 en un ambiente más fisiológicamente relevante. Aquí, las células H929 positivas de objetivo dual se añadieron a sangre completa sana humana para establecer la citotoxicidad, la activación de células T y los parámetros de citocina. La línea celular H929 se seleccionó según su compatibilidad en un ambiente humano de sangre completa

10 durante 48 horas. El BGCB491 destruyó de manera potente células H929 positivas de objetivo dual y células T activadas en este ensayo de sangre completa cocultivada después de 48 horas de incubación (Figura 30). El BGCB491 tuvo un valor promedio de EC₅₀ de 0,274 nM para citotoxicidad y de 0,376 nM para activación de células T CD3⁺ cuando se evaluó con sangre completa de 7 donantes sanos diferentes (Tabla

15 26). El BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull no mostraron citotoxicidad significativa ni activación de células T. Las citocinas se cuantificaron mediante el uso de un protocolo a base de Meso Scale Discovery (MSD) de 10 plex a partir de 3 donantes de sangre completa diferentes (Figura 31, Tabla 27). Los controles positivos de teclistamab y talquetamab mostraron actividad específica.

20 **Tabla 26: Valores de EC_x (nM) de citotoxicidad y activación de células T para ensayo MABEL**

BGCB491	CD3x Nullx Null	BCMAx GPRC5DxNull	Teclistamab	Talquetamab
---------	-----------------	-------------------	-------------	-------------

Citotoxicidad					
EC ₂₀	0,063 (0,027, 0,146)	NA*	NA*	1,273 (0,715, 2,268)	1,272 (0,843, 1,919)
EC ₃₀	0,112 (0,049, 0,253)	NA*	NA*	1,549 (0,877, 2,733)	1,744 (1,186, 2,566)
EC ₅₀	0,274 (0,123, 0,612)	NA*	NA*	2,106 (1,196, 3,707)	2,866 (1,978, 4,151)
EC ₉₀	2,804 (1,142, 6,883)	NA*	NA*	4,675 (2,513, 8,699)	10,379 (6,471, 16,646)
Max	49,765 (41,946, 57,583)	NA*	NA*	50,309 (41,780, 58,837)	44,761 (35,940, 53,582)
Activación de células T de CD3*					
EC ₂₀	0,042 (0,018, 0,098)	NA*	NA*	1,043 (0,692, 1,574)	0,677 (0,436, 1,050)
EC ₃₀	0,098 (0,043, 0,223)	NA*	NA*	1,378 (0,926, 2,051)	0,927 (0,624, 1,377)
EC ₅₀	0,376 (0,168, 0,839)	NA*	NA*	2,135 (1,446, 3,152)	1,521 (1,052, 2,199)
EC ₉₀	12,150 (4,684, 31,514)	NA*	NA*	6,641 (4,249, 10,378)	5,491 (3,196, 9,436)
Max	43,685 (34,087, 53,282)	NA*	NA*	37,993 (31,416, 44,570)	40,780 (33,202, 48,357)
Activación de células T de CD4*					
EC ₂₀	0,031 (0,013, 0,071)	NA*	NA*	0,830 (0,529, 1,302)	0,585 (0,370, 0,924)
EC ₃₀	0,069 (0,030, 0,156)	NA*	NA*	1,124 (0,733, 1,725)	0,812 (0,540, 1,220)
EC ₅₀	0,248 (0,110, 0,556)	NA*	NA*	1,814 (1,199, 2,744)	1,361 (0,934, 1,982)
EC ₉₀	6,820 (2,815, 16,522)	NA*	NA*	6,263 (3,781, 10,375)	5,191 (2,921, 9,224)
Max	52,423 (44,614, 60,232)	NA*	NA*	48,005 (41,702, 54,308)	52,079 (45,784, 58,374)
Activación de células T de CD8*					
EC ₂₀	0,034 (0,016, 0,071)	NA*	NA*	0,903 (0,632, 1,291)	0,506 (0,337, 0,760)
EC ₃₀	0,068 (0,034, 0,138)	NA*	NA*	1,189 (0,840, 1,683)	0,693 (0,472, 1,018)
EC ₅₀	0,206 (0,105, 0,406)	NA*	NA*	1,831 (1,300, 2,577)	1,137 (0,784, 1,648)
EC ₉₀	3,674 (1,550, 8,708)	NA*	NA*	5,610 (3,837, 8,201)	4,102 (2,585, 6,508)
Max	61,800 (51,931, 71,669)	NA*	NA*	63,628 (57,194, 70,062)	66,038 (59,506, 72,571)

EC_x, x % de concentración efectiva; E:T, efector a objetivo; MABEL, nivel de efecto biológico esperado mínimo; Máx., valor máximo NA, no activa.

Se añadió BGCB491 a sangre completa en varias concentraciones en presencia de células objetivo (H929) y se incubó durante 48 horas. Las células diana se marcaron en sangre completa con una relación E:T óptima de 5:1. El estudio se realizó usando 7 muestras de sangre completa de donantes humanos sanos (ident. de donante: 10145, 10403, 10420, 10083, 10463, 10493 y 10145). Se estimaron valores de EC_x post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % (indicados entre paréntesis) se calcularon usando el método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo. Los valores máximos de citotoxicidad/activación son porcentajes.

Tabla 27: Valores de EC₅₀ citocina individuales para ensayo MABEL.

Citocina	BGCB491	Teclistamab	Talquetamab
----------	---------	-------------	-------------

	EC ₅₀ (nM)	Máx. (IC del 95 %) (pg/ml)	EC ₅₀ (nM)	Máx. (IC del 95 %) (pg/ml)	EC ₅₀ (nM)	Máx. (IC del 95 %) (pg/ml)
INF- γ	0,172	24.856,5	0,994	32.357,6	2,144	35.384,7
TNF- α	0,398	886,8	1,721	819,9	3,474	935,7
IL-1 β	0,156	36,5	1,621	35,1	1,336	30,2
IL-2	0,585	1.385,4	1,409	1.270,2	3,911	1.725,4
IL-4	0,156	14,4	1,529	15,1	1,408	11,9
IL-6	0,104	572,3	1,235	549,8	1,209	440,7
IL-10	0,924	472,6	7,694	495,6	1,2	365,8
IL-13	0,254	144,4	0,769	146,3	0,832	145,7

IC del 95 %, intervalo de confianza de 95 %; EC₅₀, 50 % de concentración efectiva; IL, interleucina; IFN, interferón; MABEL, nivel de efecto biológico esperado mínimo; Máx., concentración máxima; MSD, descubrimiento en mesoescala; TNF, factor de necrosis tumoral.

- 5 Se recolectaron y analizaron sobrenadantes de células H929 del experimento de citotoxicidad anterior (Figura 30, 3 donantes de células T) para determinar los niveles de citocina mediante el uso de un ensayo múltiple basado en MSD (cat. núm.: K15049D). Los niveles máximos de citocina se expresaron como pg/ml (con intervalos de confianza del 95 % entre paréntesis).

10 *Citotoxicidad mediada por BGCB491 de células CD138+ de la médula ósea de pacientes con MM*

Para evaluar la potencia de BGCB491 en las muestras primarias de pacientes con MM, este mAb triespecífico se probó en un ensayo citotóxico mediante el uso de células mononucleares de médula ósea congeladas de 4 pacientes con MM diferentes y células T de un donante sano. Se mezclaron

15 números iguales de células T exógenas y células mononucleares de médula ósea (es decir, 100,000; relación E:T=1:1) donde se mezclaron e incubaron con BGCB491, CD3xNullxNull, teclistamab, o talquetamab durante 48 horas. El agotamiento de células plasmáticas mediada por anticuerpos y el potencial de activación de células T se midieron al usar un enfoque basado en citometría de

20 flujo. El BGCB491 indujo el agotamiento de células plasmáticas CD138⁺ de todas las muestras de pacientes de una manera dependiente de la dosis

después de 48 horas de cocultivo con células T normales sanas (Figura 32). Los datos de activación de células T se correlacionaron bien con los datos de citotoxicidad, tal como se esperaba. Estos datos confirman que el BGCB491 es citotóxico para las células primarias de médula ósea de MM en un ensayo de cocultivo ex vivo. Los valores de EC_x específico de donante para el agotamiento de células plasmáticas y la activación de células T se enumeran en la Tabla 28. El anticuerpo de control CD3xNullxNull se evaluó en 3 muestras que tenían suficientes células para todas las 4 moléculas, y mostró un agotamiento mínima no específica de células plasmáticas y activación de células T a concentraciones más altas (>1 nM). El teclistamab y el talquetamab se usaron como controles positivos y se comportaron como se esperaba.

Tabla 28: Síntesis de los valores de EC_x de BGCB491 para la citotoxicidad y la activación de células T mediante el uso de células mononucleares de médula ósea primaria

EC _x	Citotoxicidad			Activación de células T		
	BGCB491	Teclistamab	Talquetamab	BGCB491	Teclistamab	Talquetamab
BM MNC - Ident. núm. 626						
EC ₂₀ (nM)	0,281	0,164	0,080	0,062	0,196	0,081
EC ₃₀ (nM)	0,598	0,242	0,169	0,139	0,320	0,126
EC ₅₀ (nM)	1,961	0,443	0,545	0,488	0,689	0,255
EC ₉₀ (nM)	42,630	2,138	11,300	12,760	5,047	1,582
BM MNC Ident. núm. 649						
EC ₂₀ (nM)	0,345	0,111	0,387	0,005	0,090	0,068
EC ₃₀ (nM)	0,650	0,200	0,713	0,028	0,201	0,118
EC ₅₀ (nM)	1,762	0,506	1,858	0,381	0,712	0,278
EC ₉₀ (nM)	23,400	5,599	22,310	330,900	19,050	2,586
BM MNC Ident. núm. 652						
EC ₂₀ (nM)	0,073	~0,6316	0,304	0,005	0,106	0,015
EC ₃₀ (nM)	0,108	~0,7015	0,482	0,009	0,137	0,024

EC ₅₀ (nM)	0,202	~0,7440	0,990	0,019	0,204	0,051
EC ₉₀ (nM)	1,017	~0,9663	6,421	0,153	0,576	0,334
BM MNC Ident. núm. 653						
EC ₂₀ (nM)	0,071	0,114	0,203	0,013	0,033	0,028
EC ₃₀ (nM)	0,145	0,223	0,482	0,030	0,064	0,058
EC ₅₀ (nM)	0,446	0,641	1,877	0,120	0,179	0,181
EC ₉₀ (nM)	8,183	9,900	63,680	4,355	2,627	3,407
Promedio						
EC ₂₀ (nM)	0,192	0,130	0,244	0,021	0,106	0,048
EC ₃₀ (nM)	0,375	0,222	0,461	0,051	0,180	0,082
EC ₅₀ (nM)	1,093	0,530	1,317	0,252	0,446	0,191
EC ₉₀ (nM)	18,808	5,879	25,928	87,042	6,825	1,977

BM, médula ósea; EC_x, x % de concentración efectiva; E:T, efector a objetivo; MM, mieloma múltiple; MNC, célula mononuclear.

- 5 Se añadió BGCB491 a MNC de BM de MM a diversas concentraciones en presencia de células T sanas a una relación E:T de 1:1 y se incubaron durante 48 horas. El estudio se realizó usando 4 muestras de médula ósea del paciente con MM (ident. de donante: MM BM MNC-626, 649, 652 y 653). En este experimento se usaron teclistamab y talquetamab como controles positivos. Se estimaron valores de EC_x post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante el uso del método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo.

10 *Potencial de citotoxicidad de BGCB491 en diversas relaciones E:T y tiempos de incubación*

- Además, se probó el potencial de citotoxicidad de células diana de BGCB491 mediante el uso de un ensayo de citotoxicidad mediado por células T con varias relaciones E:T y tiempos de incubación diferentes para comprender
- 15 su capacidad para agotar las células de mieloma en un entorno clínico. Como las líneas celulares de prueba, las células H929 se mezclaron con células T (ident. de donante: 20063323) para alcanzar una relación E:T de 5:1, 3:1, 1:1, y 0,5:1 en presencia de BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull y CD3xNullxNull, y se realizaron incubaciones durante 72 horas. Para un experimento por curso
- 20 temporal, se seleccionaron relaciones E:T de 3:1 y 1:1 para las pruebas a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de incubación. La densidad del receptor por

célula para BCMA y GPRC5D es 5381 y 1574, respectivamente, en células H929. El BGCB491 destruyó de manera potente células H929 en todas las relaciones E:T probadas con valores comparables de EC_{50} para la citotoxicidad y para la activación de células T (Figura 33A, Tabla 29). El BGCB491 inició la

5 citotoxicidad de células diana desde el punto temporal más temprano evaluado (24 horas) y su potencia y eficacia aumentó con el tiempo hasta 72 horas de incubación donde casi alcanzó una meseta (Figura 33B). El BGCB491 destruyó células H929 en todos los puntos temporales probados con valores de EC_{50} que varían entre 0,001 y 0,022 nM para la citotoxicidad y entre 0,005 y 0,067 nM

10 para la activación de los células T (relación E:T de 3:1). Para el ensayo de relación E:T de 1:1, los valores de EC_{50} variaron entre 0,004 y 0,025 nM para la citotoxicidad y entre 0,006 y 0,083 nM para la activación de células T (Figura 33B, Tabla 30). Estos datos indican que el BGCB491 de mAb trispecífico es muy eficiente y puede beneficiarse en situaciones en donde el recuento de

15 células T es limitante. Sin embargo, a una relación E:T más baja de 0,5:1 el porcentaje máximo de citotoxicidad fue mucho menor (~20 %) que en otras condiciones probadas en el ensayo de incubación de 72 horas. Sería interesante ver si tiempos de incubación más largos pueden mejorar la citotoxicidad máxima en estos recuentos de células T inferiores. En un estudio separado, el BGCB491

20 mostró una unión de baja afinidad medible a células T humanas primarias que expresan CD3 de múltiples donantes (Figura 26) con citotoxicidad robusta de células H929 a relaciones E:T de 1:1 y 1:3 (Figura 43, Figura 44).

Tabla 30: Síntesis de los valores de ECx de BGCB491 para la citotoxicidad y la activación de células T en un ensayo de curso temporal

Relación E:O	EC _x	Citotoxicidad	Activación de células T de CD3 ⁺
5:1	EC ₂₀ (nM)	0,007	0,008
	EC ₅₀ (nM)	0,014	0,022
	EC ₉₀ (nM)	0,040	0,097
3:1	EC ₂₀ (nM)	0,006	0,005
	EC ₅₀ (nM)	0,023	0,027
	EC ₉₀ (nM)	0,192	0,343
1:1	EC ₂₀ (nM)	0,008	0,004
	EC ₅₀ (nM)	0,038	0,031
	EC ₉₀ (nM)	0,445	0,993
0,5:1	EC ₂₀ (nM)	0,013	0,005
	EC ₅₀ (nM)	0,088	0,033
	EC ₉₀ (nM)	1,919	0,662

CD, cúmulo de diferenciación; EC_x, x % de concentración efectiva; E:T, efector a objetivo.

BGCB491 se probó en presencia de células pan T de 1 donante sano (ident. de donante: 20063323) a diversas relaciones E:T (5:1, 3:1, 1:1 y 0,5:1) durante 72 horas. La muerte de células diana y la activación de células T se midió y se expresó como porcentaje de citotoxicidad y porcentaje de células T CD25⁺ CD3⁺. Se estimaron valores de EC_x post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante el uso del método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo.

Tabla 30: Síntesis de los valores de ECx de BGCB491 para la citotoxicidad y la activación de células T en un ensayo de curso temporal

Criterio de valoración	EC _x	Tiempo de incubación (horas)						
		24	48	72	96	120	144	168
Relación E:T 3:1								
Citotoxicidad	EC ₂₀ (nM)	0,005	0,002	0,001	0,001	0	0,001	0,001
	EC ₅₀ (nM)	0,022	0,006	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
	EC ₉₀ (nM)	0,258	0,033	0,007	0,004	0,005	0,004	0,003
Activación de células T de CD3 ⁺	EC ₂₀ (nM)	0,011	0,004	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
	EC ₅₀ (nM)	0,067	0,015	0,007	0,006	0,005	0,01	0,008
	EC ₉₀ (nM)	1,255	0,121	0,064	0,087	0,102	0,307	0,385
Relación E:T 1:1								

Citotoxicidad	EC ₂₀ (nM)	0,004	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003
	EC ₅₀ (nM)	0,019	0,025	0,007	0,004	0,004	0,006	0,006
	EC ₉₀ (nM)	0,224	0,585	0,039	0,017	0,013	0,017	0,019
Activación de células T de CD3 ⁺	EC ₂₀ (nM)	0,008	0,004	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003
	EC ₅₀ (nM)	0,083	0,024	0,009	0,006	0,006	0,009	0,01
	EC ₉₀ (nM)	3,117	0,448	0,086	0,047	0,04	0,056	0,066

CD, cúmulo de diferenciación; EC_x, x % de concentración efectiva; E:T, efector a objetivo.

Para el ensayo de curso temporal, el BGCB491 se probó en una relación E:T de 3:1 y 1:1 para diversos puntos temporales (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas) con 4 donantes de células T diferentes (ident. de donante: 20062105, 20063309, 20061963 y 20063310). La muerte de células diana y la activación de células T se midió y se expresó como porcentaje de citotoxicidad y porcentaje de células T CD25⁺ CD3⁺. Se estimaron valores de EC_x post-hoc a partir de un modelo 4PL con donante como un efecto aleatorio. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon mediante el uso del método delta. El paquete de efectos mixtos no lineales R se usó para ajustar el modelo.

10 *Efecto del BGCB491 en la activación de células T en ausencia de células diana*

Para evaluar si el BGCB491 promueve la activación no deseada de células T en ausencia de acoplamiento objetivo, se probó el efecto de BGCB491 en un ensayo de activación de células T. En el primer estudio, se incubaron 6 muestras normales de células T de donantes sanos en presencia de varias concentraciones de BGCB491 durante 72 horas (Figura 34A). En el segundo estudio se usó un formato de ensayo más fisiológicamente relevante donde las células positivas de BCMA-GPRC5D están ausentes en sangre completa humana sana, y aquí se añadió BGCB491 en 6 muestras de sangre completa normal de donantes sanos a diversas concentraciones durante 48 horas (Figura 34B). Después, se midieron los efectos de la activación y citotoxicidad de las células T al anotar las células T positivas de CD25, CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ o muerte celular porcentual de varias células sanguíneas (Figura 34C; neutrófilos, monocitos, células B, células NK, plasmablastos) mediante citometría de flujo. El BGCB491 no tuvo un impacto significativo en la activación de las células T o en muerte celular no específica en

ausencia de células diana que expresan BCMA-GPRC5D (Figuras 34B y C). Se observó una activación mínima de células T a concentraciones >10 nM.

Parte 2. Estudios in vivo

5 La eficacia antitumoral de BGCB491 se evaluó en xenoinjertos de MM humanos de RPMI 8226 (Estudio A) y KO de CRISPR de H929 (Estudio B). Para proporcionar un huésped adecuado para injertar tumores humanos y células T humanas, se usaron ratones hembra NSG (es decir, inmunodeficiencia combinada severa [*scid*] no obesa diabética [NOD] gamma o NOD.Cg-*Prkdc*^{*scid*} 10 *Il2rg*^{*tm1Wjl*}/SzJ) para ambos estudios.

En el estudio A, a los ratones se le implantaron SC con células RPMI 8226 en el día 0. Las células pan T humanas se injertaron por vía intraperitoneal (IP) el día 18 después del injerto de células tumorales. Se administraron tratamientos con vehículo, BGCB491, teclistamab, o talquetamab IP comenzando el día 19 y se continuó dos 15 veces por semana para un total de 8 tratamientos. El estudio B se realizó como un estudio de prevención que inyecta células pan T expandidas humanas en el día -1. Se implantaron células KO de BCMA de H929 SC en el flanco izquierdo de ratones NSG, mientras que se implantaron células KO de GPRC5D de H929 SC en el flanco derecho el día 0. Los tratamientos con vehículo (es decir, solución salina regulada 20 con fosfato [PBS]), BGCB491, teclistamab y talquetamab se iniciaron el Día 1, y se administraron dos veces por semana durante 7 tratamientos.

En el estudio A (modelo de regresión) la variación porcentual de inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) del xenoinjertos de RPMI 8226 se

calculó el día 38, cuando > 70 % de los animales de control tratados con vehículo permanecieron en el estudio. La densidad del receptor por célula para BCMA y GPRC5D es 2317 y 486, respectivamente, en células RPMI 8226. Se observó una Δ TGI estadísticamente significativa con BGCB491 a 0,4 mg/kg (equivalente a

5 aproximadamente 8 μ g para un ratón de 20 gramos), 1 mg/kg (20 μ g/ratón) y 2,5 mg/kg (50 μ g/ratón), lo que dio como resultado valores de Δ TGI del 90,5 %, 106,2 % y 111,2 %, respectivamente ($p < 0,05$ para todos los grupos frente a los controles de vehículo) (Figura 35). La dosis más baja de 0,1 mg/kg (2 μ g/ratón) dio como resultado un 38,4 % de Δ TGI ($p=0,035$), que se consideró no efectiva. El

10 teclistamab inhibió el crecimiento tumoral con 85 % de Δ TGI a 0,4 mg/kg, 105,6 % de Δ TGI a 1 mg/kg, y 111,9 % de Δ TGI a 2,5 mg/kg, respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con PBS, mientras que el talquetamab dosificado a 2,5 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral de RPMI 8226 en 77,2 % de Δ TGI ($p < 0,05$ para todos los grupos frente a los controles tratados con PBS).

15 En el modelo RPMI 8226, se continuó la observación de regresiones de tumor mediadas por BGCB491 por más de 2 semanas después del abandono del tratamiento. Se evaluó la regresión de tumor (TR, por sus siglas en inglés) porcentual en comparación con la carga tumoral inicial el día 60, que fue 19 días después de la última dosis. Se observó regresión tumoral con BGCB491 a 1 y

20 2,5 mg/kg que resultan en valores de TR de 80,27 % ($p < 0,0001$) y 100 % ($p < 0,0001$), respectivamente. La dosis de 0,4 mg/kg tuvo 28,7 % de TR en el día 60, pero no fue estadísticamente significativa. El teclistamab también provocó TR con 68,88 % ($p=0,0025$) a 1 mg/kg y 100 % ($p < 0,0001$) a 2,5 mg/kg. En las

pruebas in vitro mediante el uso de células RPMI 8226 en un ensayo de incubación de 72 horas, el BGCB491 mostró un perfil de citotoxicidad similar sin efecto aditivo en comparación con el teclistamab o talquetamab individualmente.

En el Estudio B (modelo profiláctico), el porcentaje TGI se calculó el día 22
 5 después de la implantación del tumor, cuando >70 % de los animales permanecieron en el estudio. Se observó una TGI estadísticamente significativa contra los tumores KO de BCMA con BGCB491 a 0,1, 0,25 y 0,5 mg/kg que dio como resultado 89,2 %, 91,1 % y 83,6 % de TGI, respectivamente, en comparación con los controles tratados con PBS (todos los valores $p < 0,05$;
 10 Figura 36). El teclistamab no tuvo eficacia en los niveles de dosis probados (0,1 mg/kg, 17,2 % de TGI; y 0,25 mg/kg, 19,9 % de TGI), mientras que el talquetamab inhibió el crecimiento tumoral al 100 % en los niveles de dosis de 0,1 y 0,25 mg/kg ($p < 0,05$). Contra tumores de KO de GPRC5D, el tratamiento de BGCB491 dio como resultado una eficacia significativa con un 100 % de TGI a
 15 niveles de dosis de 0,1, 0,25 y 0,5 mg/kg ($p < 0,05$ para todos los grupos). La dosis de 0,025 mg/kg tuvo un efecto menor de 22,09 % de TGI que no se consideró biológicamente significativo (34). El teclistamab inhibió el crecimiento tumoral de KO de GPRC5D de H929 en un 100 % de TGI en ambos niveles de dosis de 0,1 y 0,25 mg/kg ($p < 0,05$); el talquetamab no tuvo efecto. La densidad
 20 del receptor por célula para BCMA y GPRC5D es 1 y 957, respectivamente, en células KO de BCMA de H929. La densidad del receptor por célula para BCMA y GPRC5D es 3926 y 19, respectivamente, en células KO de GPRC5D de H929.

Los animales se monitorearon después del tratamiento hasta que los signos de la morbilidad relacionada con la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en inglés) se manifestaron en el momento en que los animales fueron sacrificados y el estudio concluyó.

5 En breve, el BGCB491 de mAb triespecífico exhibió eficacia en numerosas líneas celulares de MM y fue capaz de agotar una población clonal que expresó un objetivo solo u objetivos duales. El BGCB491 también pudo destruir las células que expresan la diana en un entorno más fisiológico como el ensayo de sangre completa. Notablemente, el BGCB491 pudo agotar las células
10 plasmáticas del paciente con MM de una manera dependiente de la dosis. La eficacia del BGCB491 también se reflejó en reducciones significativas en el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de ratón in vivo. Finalmente, no hubo activación de células T no específica o citotoxicidad de células diana negativas. Estos resultados indican que el BGCB491 puede tener un potencial
15 terapéutico significativo en el tratamiento de pacientes con MM.

En un estudio in vivo adicional, la eficacia antitumoral del BGCB491 se evaluó en xenoinjertos de MM humanos MM.1S (estudio C). Para proporcionar un huésped adecuado para injertar tumores humanos y células T humanas, se usaron ratones hembra NSG (es decir, inmunodeficiencia combinada severa [*scid*] no
20 obesa diabética [NOD] gamma o NOD.Cg-*Prkdc*^{*scid*} *Il2rg*^{*tm1Wjl*}/SzJ) para el estudio.

En el Estudio C, los ratones se implantaron SC con células MM.1S el día 0. Las células pan T expandidas humanas se injertaron por vía intraperitoneal (IP) el día 13 después del injerto de células tumorales, y se administraron

tratamientos con vehículo, BGCB491, teclistamab o talquetamab IP a partir del día 15 y continuaron dos veces por semana durante un total de 7 tratamientos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó el día 34 después de la implantación del tumor, cuando >70 % de los animales permaneció en el estudio. Se observó un TGI estadísticamente significativo contra los tumores MM.1S con BGCB491 a 0,025, 0,1, 0,5 y 1 mg/kg que dio como resultado 66,9 %, 91,2 %, 99,7 % y 100 % de TGI, respectivamente, en comparación con los controles tratados con PBS (todos los valores de $p < 0,05$; **Figura 45**). El teclistamab inhibió el crecimiento tumoral en ambos niveles de dosis probados (0,1 mg/kg, 73,7 % de TGI; y 0,5 mg/kg, 92,3 % TGI ($p < 0,05$)). El talquetamab fue efectivo con 90,9 % de TGI a 0,025 mg/kg y 99,4 % a 0,1 mg/kg ($p < 0,05$).

Regresiones tumorales mediadas por BGCB491 durante 2 semanas después del abandono del tratamiento. Se evaluó la regresión de tumor (TR) porcentual en comparación con la carga tumoral inicial el día 51, 14 días después de la última dosis. Se observó regresión tumoral con BGCB491 a 0,5 y 1 mg/kg, lo que dio como resultado valores de TR de 100 % cada uno (8 de 8 regresiones completas de los tumores establecidos). La dosis de 0,4 mg/kg tuvo 28,7 % de TR en el día 60, pero no fue estadísticamente significativa. El teclistamab no provocó ninguna regresión tumoral, pero el talquetamab a 0,1 mg/kg dio como resultado un 100 % de TR de tumores MM.1S establecidos.

Ejemplo 12: Afinidad de terapéutica a especies humanas y otras

El brazo de unión a CD3 (es decir, CD3B376) se une a CD3 de macaco cynomolgus. Brevemente, la unión se midió mediante citometría de flujo después de incubar células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humana y de macaco cynomolgus con GCDB381 (es decir, Fab de CD3B376 en anticuerpo IgG1-AAS bivalente), CD3B891 (es decir, CD3B376xNull, anticuerpo biespecífico IgG1-AAS), o control nulo.

El brazo de unión a BCMA (BCMB601, que contiene scFv de BCMB519) no se unió a BCMA de macaco cynomolgus (Tabla 19A).

Los brazos de unión a GPRC5D (es decir, GC5B680) y a BCMA se evaluaron para determinar la reactividad cruzada con el macaco cynomolgus como parte de la molécula BGCB463, que usa los brazos de unión idénticos que el BGCB491. La reactividad cruzada con respecto a monos cynomolgus se perfiló para ambos brazos de scFv de unión al objetivo mediante el uso de unión celular basada en FACS a 37 °C durante 1 hora con K562 que expresa de manera estable GPRC5D o BCMA humano o de macaco cynomolgus. El valor de EC_{50} basado en células para el brazo scFv de GC5B680 fue de aproximadamente 30 nM contra las células que expresan el GPRC5D humano y aproximadamente 10 veces más débil (aproximadamente 400 nM) en células que expresan el GPRC5D de macaco cynomolgus. En contraste, el valor de EC_{50} basado en células para el brazo scFv de BCMB519 fue de aproximadamente 145 nM para BCMA humano, mientras que no hubo unión detectable a BCMA de cynomolgus hasta 2 μ M.

Ejemplo 13: Evaluación de la toxicidad fuera de la diana

El potencial de riesgos debido a la unión o actividad funcional fuera del objetivo asociada con los brazos de unión al antígeno de tumor se evaluó mediante el uso de la micromatriz de células Retrogenix™ (no se observaron inconvenientes fuera del objetivo) y el ensayo de línea celular de selectividad funcional TAA⁺ respectivamente.

La selectividad del brazo de CD3 de BGCB491 se demostró por la falta de citotoxicidad y activación de células T en ausencia de células que expresan el objetivo (Figuras 34A-34C; ver el Ejemplo 12).

Evaluación de unión fuera de la diana de GPRC5D

El aglutinante de GPRC5D (GC5B1257.001, scFv-Fc de GC5B680 de anti-GPRC5D), cuando se evaluó su unión frente a células HEK293 fijas que expresan individualmente una genoteca de 5868 proteínas de membrana plasmática humana de longitud completa y secretadas humanas ancladas a la superficie de la célula (que incluye todos los miembros de la familia conocidos del receptor acoplado a la proteína G Familia C Grupo 5 [GPRC5]) y 371 heterodímeros, se determinó que se une específicamente a su objetivo primario, GPRC5D. No se identificaron interacciones fuera del objetivo, lo que demuestra la especificidad objetivo del dominio de unión a GPRC5D contenido en BGCB491.

Evaluación de unión fuera del objetivo de BCMA

El aglutinante de BCMA (BCMB601.001, scFv-Fc de BCMB519 de anti-BCMA) cuando se evaluó su unión frente a células HEK293 fijas que expresan individualmente una genoteca de 5475 proteínas de membrana plasmática humana de longitud completa y secretadas humanas ancladas a la superficie de

la célula y 371 heterodímeros, se determinó que se une específicamente a su objetivo primario, BCMA (TNFRSF17). No se identificaron interacciones fuera del objetivo, lo que demuestra la especificidad objetivo del dominio de unión a BCMA contenido en BGCB491.

5 *Selectividad funcional en líneas celulares negativas al antígeno asociadas a tumores*

La especificidad del antígeno de BGCB491 se caracteriza además en un ensayo funcional in vitro mediante el uso de un panel de 5 líneas celulares de cáncer que carecen de expresión de GPRC5D, BCMA, y CD3 (como se confirma por citometría de flujo), pero por transcriptómica se predice que expresan >50 %
 10 de las proteínas de superficie celular conocidas. En estudios de cocultivo con células T derivadas de donantes sanos, BGCB491 se evalúa para la inducción de la liberación de citocina B dependiente de células dependientes de anticuerpos, de granzima B, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-2 cuando se añade a cocultivos con células diana que
 15 expresan GPRC5D y BCMA (es decir, células H929). Estos datos pueden respaldar la especificidad del antígeno de BGCB491 para GPRC5D y BCMA.

Ejemplo 14: Tolerancia local

Las reacciones de piel se evaluaron en un estudio de PK en minicerdos
 20 tratados con 0,1 o 0,01 mg/kg de BGCB491 SC en 2 a 2,5 ml a 0,05 y 0,5 mg/ml, respectivamente (ver la farmacocinética de minicerdo de Göttingen en el Ejemplo 16). No se observaron reacciones en la piel.

Ejemplo 15: Farmacocinética en especies preclínicas

Farmacocinética de ratón

Las propiedades de PK del suero y el tumor de BGCB491 se caracteriza en un modelo de xenoinjerto de MM.1S NSG después de una inyección IV única a 0,5 y 0,1 mg/kg.

Farmacocinética de macaco cynomolgus

Las propiedades de PK de BGCB491 se caracterizaron mediante un estudio de PK sin GLP de dosis única en monos cynomolgus hembra (n=3). Se administró BGCB491 IV a monos cynomolgus a un nivel de dosis de 0,5 mg/kg (histidina 10 mM, pH 6,5). Se usó un inmunoensayo calificado de electroquimioluminiscencia (ECLIA) de MSD para cuantificar las concentraciones de BGCB491 total. La exposición a fármacos sistémica de BGCB491 evaluada mediante la concentración de suero máxima ($C_{\text{máx}}$) y el área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo (AUC) del intervalo de 1 dosis se muestra en la Tabla 31 y las concentraciones séricas de BGCB491 se ilustran en la Figura 37.

Tabla 31: Estimaciones de parámetros de PK de BGCB491 totales y medios (SD) después de una dosis IV única de 0,5 mg/kg en monos cynomolgus (Grupo 2; n = 3/grupo)

Identificación	$C_{\text{máx}}$ µg/ml	AUC _{última} (µg·día/ml)	AUC _{inf.} (µg·día/ml)	CL (ml/kg/día)	V_z (ml/kg)	$T_{1/2}$ (día)
2501	9,39	35,61	35,81	13,96	74,51	3,70
2502	8,49	32,73	32,95	15,17	137,01	6,26
2503	9,22	47,95	48,74	10,26	126,52	8,55

Media	9,03	38,76	39,17	13,13	112,68	6,17
SD	0,48	8,08	8,41	2,56	33,47	2,43

AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo extrapolada al infinito, AUC_{última}, área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo hasta el último punto de muestreo; CL, eliminación sistémica; C_{máx}, concentración de suero máxima; IV, intravenoso; FC, farmacocinética; DE, desviación estándar; T_{1/2}, vida media de eliminación de fase terminal; V_z, eliminación sistémica total.

5

Farmacocinética de minicerdo de Göttingen

Las propiedades de PK de BGCB491 se caracterizaron mediante un estudio de PK sin GLP de dosis única en minicerdos Göttingen machos (n=4/grupo). Se administró BGCB491 IV a minicerdos a un nivel de dosis de 0,1 mg/kg o SC a niveles de dosis de 0,1 o 0,01 mg/kg (histidina 10 mM, pH 6,5). Se usó ECLIA calificado de MSD para cuantificar las concentraciones de BGCB491 total. El estudio de PK de minicerdo se usó para estimar los parámetros del índice de absorción (k_a) y de biodisponibilidad SC (F) para BGCB491. La exposición a fármacos (C_{máx} y AUC_{inf}) aumentó con la dosis de manera aproximadamente proporcional a la dosis en el rango de dosis de 0,01 a 0,1 mg/kg. La exposición sistémica del fármaco de BGCB491 evaluada mediante C_{máx} y AUC de 1 intervalo de dosis se muestra en la Tabla 32, y las concentraciones séricas de BGCB491 se ilustran en FIGURA 39A.

15

20

Tabla 32: Estimaciones de parámetros de PK de BGCB491 totales y medios (SD) después de una dosis única de BGCB491 en minicerdos masculinos (n=4/grupo)

Identificación	C _{máx} μg/ml	T _{máx} ^a (día)	AUC _{última} (μg·día/ml)	AUC _{inf} (μg·día/ml)	CL (ml/kg/día)	V _z (ml/kg)	T _{1/2} (día)
Grupo 1: 0,01 mg/kg SC							
1001	0,0512	2,00	0,9688	1,3280	-	-	15,80
1002	0,0515	0,25	0,3699	0,5884	-	-	6,73
1003	0,0473	3,00	0,5145	1,0341	-	-	12,54
1004	0,0587	1,00	0,5769	0,9630	-	-	10,12

Media	0,0522	1,50	0,6075	0,9784	-	-	11,30
SD	0,0047	0,25-3,00	0,2560	0,3042	-	-	3,83
Grupo 2: 0,1 mg/kg SC							
2001	0,6308	2,00	10,1287	13,5595	-	-	15,22
2002	0,6264	2,00	7,1009	9,1614	-	-	8,23
2003	0,4533	7,00	5,4560	7,9707	-	-	9,52
2004	0,4717	4,00	5,9607	11,4536	-	-	14,90
Media	0,5455	3,00	7,1616	10,5363	-	-	11,97
SD	0,0962	2,00-7,00	2,0943	2,4802	-	-	3,61
Grupo 3: 0,1 mg/kg IV							
3001	1,6311	-	6,1690	8,5061	11,7563	97,0290	5,72
3002	1,8074	-	13,3265	20,4865	4,8813	154,0263	21,87
3003	1,8519	-	6,7074	9,8693	10,1324	95,3027	6,52
3004	1,6333	-	11,7039	16,0389	6,2348	148,9873	16,56
Media	1,7309	-	9,4767	13,7252	8,2512	123,8363	12,67
SD	0,1154	-	3,5773	5,5730	3,2273	32,0250	7,87

AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo extrapolada al infinito, AUC_{última}, área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo hasta el último punto de muestreo; CL, eliminación sistémica; C_{máx}, concentración de suero máxima; IV, intravenoso; FC, farmacocinética; DE, desviación estándar; T_{1/2}, vida media de eliminación de fase terminal; T_{máx}, tiempo hasta la concentración de suero máxima; V_z, eliminación sistémica total.

El AUC extrapolado fue de >20 % para todos los animales.

^a La mediana y el intervalo se presentan para T_{máx}.

Referencias

- 1 Ridgway, J. B., Presta, L. G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* **9**, 617-621, doi:10.1093/protein/9.7.617 (1996).
- 5 2 Tustian, A. D., Endicott, C., Adams, B., Mattila, J. & Bak, H. Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity. *MAbs* **8**, 828-838, doi:10.1080/19420862.2016.1160192 (2016).
- 3 Von Kreudenstein, T. S. et al. Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. *MAbs* **5**, 646-654, doi:10.4161/mabs.25632 (2013).
- 10 4 De Groot, A. S. & Martin, W. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clinical immunology* **131**, 189-201, doi:10.1016/j.clim.2009.01.009 (2009).
- 15 5. Usmani SZ, Berdeja JG, Truppel-Hartmann A, et al. KarMMa-4: Idecabtagene vicleucel (ide-cel, bb2121), a BCMA-directed CAR T-cell therapy in high-risk newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2021;39(15_suppl):TPS8053. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS8053
- 20 6. Berdeja JG, Krishnan AY, Oriol A, et al. Updated results of a phase 1, first-in-human study of talquetamab, a G protein-coupled receptor family C group 5 member D (GPRC5D) x CD3 bispecific antibody, in relapsed/refractory multiple myeloma (MM). *J Clin Oncol.* 2021;39(15_suppl):8008. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8008

7. Usmani SZ, Berdeja JG, Madduri D, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen (BCMA)-directed chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy, in relapsed/refractory multiple myeloma (R/R MM): updated results from CARTITUDE-1. J Clin Oncol. 2021;39(15_suppl):8005. doi:
5 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8005
8. Maus MV, June CH. Zoom Zoom: racing CARs for multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2013;19(8):1917-1919. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0168
9. Darce JR, Arendt BK, Chang SK, Jelinek DF. Divergent effects of BAFF on human memory B cell differentiation into Ig-secreting cells. J Immunol.
10 2007;178(9):5612-5622. doi:10.4049/jimmunol.178.9.5612
10. Tai YT, Anderson KC. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. Immunotherapy. 2015;7(11):1187-1199. doi:10.2217/imt.15.77
11. Patel DR, Wallweber HJ, Yin J, et al. Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. J Biol Chem. 2004;279(16):16727-16735.
15 doi:10.1074/jbc.M312316200
12. Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn PH, et al. γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. Nat Commun. 2015;6:7333. Publicada el 11-Jun-2015. doi:10.1038/ncomms8333
13. Pillarisetti K, Powers G, Luistro L, et al. Teclistamab is an active T cell-redirecting
20 bispecific antibody against B-cell maturation antigen for multiple myeloma. Blood Adv. 2020;4(18):4538-4549. doi:10.1182/bloodadvances.2020002393

14. Sanchez E, Li M, Kitto A, et al. Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol.* 2012;158(6):727-738. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09241.x
15. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(3):290-296. doi:10.1038/icb.2014.93
16. Strohl WR, Naso M. Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor (CAR)-T cells as approaches to kill cancer cells. *Antibodies (Basel).* 2019;8(3):41. Publicada el 3-Jul-2019. doi:10.3390/antib8030041
17. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia.* 2020;34(4):985-1005. doi:10.1038/s41375-020-0734-z
18. Bräuner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, Brodin B, Krogsgaard-Larsen P, O'Hara P. Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1518(3):237-248. doi:10.1016/s0167-4781(01)00197-x
19. Atamaniuk J, Gleiss A, Porpacz E, et al. Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(9):953-960. doi:10.1111/j.1365-2362.2012.02679.x
20. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M, et al. Aislamiento robusto de células plasmáticas malignas en mieloma múltiple. *Blood.* 2014;123(9):1336-1340. doi:10.1182/blood-2013-09-529800

21. Smith EL, Harrington K, Staehr M, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2019;11(485):eaau7746. doi:10.1126/scitranslmed.aau7746
22. Pillarisetti K, Edavettal S, Mendonça M, et al. A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma. *Blood.* 2020;135(15):1232-1243. doi:10.1182/blood.2019003342
23. Verkleij CPM, Broekmans MEC, van Duin M, et al. Preclinical activity and determinants of response of the GPRC5DxCD3 bispecific antibody talquetamab in multiple myeloma. *Blood Adv.* 2021;5(8):2196-2215. doi:10.1182/bloodadvances.2020003805
24. Kodama T, Kochi Y, Nakai W, et al. Anti-GPRC5D/CD3 bispecific T-cell-redirecting antibody for the treatment of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(9):1555-1564. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1216
25. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2048-2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422
26. Seckinger A, Delgado JA, Moser S, et al. Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer Cell.* 2017;31(3):396-410. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.002
27. Inoue S, Nambu T, Shimomura T. The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. *J Invest Dermatol.* 2004;122(3):565-573. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.12628.x

28. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117(18):4691-4695. doi:10.1182/blood-2010-10-299487
- 5 29. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol*. 2007;18 Suppl 1:i3-i8. doi:10.1093/annonc/mdl443
30. Michels TC, Petersen KE. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2017;95(6):373-383.
31. Gandhi UH, Cornell RF, Lakshman A, et al. Outcomes of patients with multiple
10 myeloma refractory to CD38-targeted monoclonal antibody therapy. *Leukemia*. 2019;33(9):2266-2275. doi:10.1038/s41375-019-0435-7
32. Dimopoulos MA, San-Miguel J, Belch A, et al. Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of POLLUX. *Haematologica*.
15 2018;103(12):2088-2096. doi:10.3324/haematol.2018.194282
33. Kumar SK, Callander NS, Adekola K, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(12):1685-1717. Publicada el 2-Dic-2020. doi:10.6004/jnccn.2020.0057
34. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, et al. Relationships between drug activity
20 in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 2001;84(10):1424-1431. doi:10.1054/bjoc.2001.1796

35. Chiu A, Xu W, He B, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109(2):729-739. doi:10.1182/blood-2006-04-015958
36. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al. BAFF selectively enhances the survival
5 of plasmablasts generated from human memory B cells [published correction appears in *J Clin Invest*. abril de 2004;113(7):1069]. *J Clin Invest*. 2003;112(2):286-297. doi:10.1172/JCI18025
37. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004;199(1):91-
10 98. doi:10.1084/jem.20031330
38. Bu DX, Singh R, Choi EE, et al. Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2018;9(40):25764-25780. Publicada el 25-May-2018. doi:10.18632/oncotarget.25359
- 15 39. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2048-2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422
40. Laâbi Y, Gras MP, Carbonnel F, et al. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a
20 malignant T cell lymphoma. *EMBO J*. 1992;11(11):3897-3904.
41. Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(7):1147-1154. doi:10.1093/nar/22.7.1147

42. Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005;204:43-54. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00219.x
43. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol.* 2004;173(2):807-817. doi:10.4049/jimmunol.173.2.807
44. Venkateshaiah SU, Bam R, Li X, Khan S, Ling W, Randal SS, Yaccoby S. GPRC5D is a cell surface plasma cell marker whose expression is high in myeloma cells and reduced following coculture with osteoclasts. *Blood.* 2013;122(21):3099. doi: 10.1182/blood.V122.21.3099.3099
45. Kamperschroer C, Shenton J, Lebrec H, Leighton JK, Moore PA, Thomas O. Summary of a workshop on preclinical and translational safety assessment of CD3 bispecifics. *J Immunotoxicol.* 2020;17(1):67-85. doi:10.1080/1547691X.2020.1729902
46. Li J, Piskol R, Ybarra R, et al. CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity. *Sci Transl Med.* 2019;11(508):eaax8861. doi:10.1126/scitranslmed.aax8861
47. Leong SR, Sukumaran S, Hristopoulos M, et al. An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;129(5):609-618. doi:10.1182/blood-2016-08-735365
48. Singh A, Dees S, Grewal IS. Overcoming the challenges associated with CD3+ T-cell redirection in cancer. *Br J Cancer.* 2021;124(6):1037-1048. doi:10.1038/s41416-020-01225-5

49. Jain T, Litzow MR. Management of toxicities associated with novel immunotherapy agents in acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2020;11:2040620719899897. Publicada el 20-Ene-2020. doi:10.1177/2040620719899897
- 5 50. Ling J, Zhou H, Jiao Q, Davis HM. Interspecies scaling of therapeutic monoclonal antibodies: initial look. *J Clin Pharmacol.* 2009;49(12):1382-1402. doi:10.1177/0091270009337134
51. Woo S, Jusko WJ. Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metab Dispos.* 10 2007;35(9):1672-1678. doi:10.1124/dmd.107.015248
52. Li J, Stagg NJ, Johnston J, et al. Membrane-proximal epitope facilitates efficient T cell synapse formation by anti-FcRH5/CD3 and is a requirement for myeloma cell killing. *Cancer Cell.* 2017;31(3):383-395. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.001
53. ClinicalTrials.gov. NCT02879695: Blinatumomab and nivolumab with or without ipilimumab in treating patients with poor-risk relapsed or refractory CD19+ precursor B-lymphoblastic leukemia. 15 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02879695. Accedido: 23 de junio de 2021.
54. Guillerey C, Nakamura K, Pichler AC, et al. Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model. *JCI Insight.* 20 2019;5(14):e125932. Publicada el 13-Jun-2019. doi:10.1172/jci.insight.125932

Los fundamentos de todas las patentes, solicitudes publicadas y referencias citadas en la presente descripción, se incorporan en su totalidad como referencia.

Si bien se mostraron y se describieron particularmente modalidades ilustrativas, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse varios
5 cambios en la forma y en los detalles de la presente descripción sin apartarse del alcance de las modalidades comprendidas en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

Sec. con núm. de ident.: 1 CD3B376 LCDR1

TGTSSNIGTYKFVS

5 **Sec. con núm. de ident.: 2** CD3B376 LCDR2

EVSKRPS

Sec. con núm. de ident.: 3 CD3B376 LCDR3

VSYAGSGTLL

10

Sec. con núm. de ident.: 4 CD3B376 HCDR1

GDSVFNNNAAWS

Sec. con núm. de ident.: 5 CD3B376 HCDR2

15 RTYYRSKWLYD

Sec. con núm. de ident.: 6 CD3B376 HCDR3

GYSSSFYD

20 **Sec. con núm. de ident.: 7** CD3B376 VL

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS

KRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

Sec. con núm. de ident.: 8 CD3B376 VH

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGR
TYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSS
FDYWGQGTLVTVSS

5

Sec. con núm. de ident.: 9 GC5B680 LCDR1

RSSQSLVHSDGNTYLS

Sec. con núm. de ident.: 10 GC5B680 LCDR2

10 KISNRFF

Sec. con núm. de ident.: 11 GC5B680 LCDR3

MQATQFPHT

15 **Sec. con núm. de ident.: 12** GC5B680 HCDR1

GFSLTNIRMSVS

Sec. con núm. de ident.: 13 GC5B680 HCDR2

HIFSNDEKS

20

Sec. con núm. de ident.: 14 GC5B680 HCDR3

MRLPYGMDV

Sec. con núm. de ident.: 15 GC5B680 VL

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKIS
NRFFGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHTFGQGTKLEIK

5 **Sec. con núm. de ident.: 16** GC5B680 VH

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
NDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARMRLPYGMDV
WGQGTTVTVSS

10 **Sec. con núm. de ident.: 17** BCMB519 LCDR1

RASQSISSSFLT

Sec. con núm. de ident.: 18 BCMB519 LCDR2

GASSRAT

15

Sec. con núm. de ident.: 19 BCMB519 LCDR3

QHYGSSPMYT

Sec. con núm. de ident.: 20 BCMB519 HCDR1

20 GFTFSSYAMS

Sec. con núm. de ident.: 21 BCMB519 HCDR2

AISGSGGSTY

Sec. con núm. de ident.: 22 BCMB519 HCDR3

DEGYSSGHYYGMDV

Sec. con núm. de ident.: 23 BCMB519 VL

5 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKLEIK

Sec. con núm. de ident.: 24 BCMB519 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
10 GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSG
HYYGMDVWGQGTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 25 enlazador

GGSEGKSSGSGSESKSTGGS

15

Sec. con núm. de ident.: 26 cadena pesada 1 de BGCB463

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGR
TYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSS
FDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
20 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 27 cadena ligera 1 de BGCB463

5 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS
RPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGKLT
LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE
TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10 **Sec. con núm. de ident.: 28** cadena pesada 2 de BGCB463

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYK
ISNRFFGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHTFGQGTKL
EIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNI
RMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNV
15 DPVDTATYYCARMRLPYGMDVWGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSE
20 GKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQ
QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYG
SSPMYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLLES GGGLVQPGGS

LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 29 cadena pesada 1 de BGCB491

5 QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGR
TYYSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSS
FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
10 SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQT
PLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFF
15 GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHTFGQGTKLEIKGG
SEGKSSGSGSESKSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSV
SWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVD
TATYYCARMRLPYGMDVWGQGTTVTVSS

20 **Sec. con núm. de ident.: 30** cadena ligera de BGCB491

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS
RPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTV

LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE
 TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Sec. con núm. de ident.: 31 cadena pesada 2 de BGCB491

5 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
 TGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKLEIKGG
 SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS
 WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEA
 10 AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 **Sec. con núm. de ident.: 32** BCMA CDR

SGSYFWG

Sec. con núm. de ident.: 33 BCMA CDR

SIYYSGITYYNPSLKS

20

Sec. con núm. de ident.: 34 BCMA CDR

HDGAVAGLFDY

Sec. con núm. de ident.: 35 BCMA CDR

SSSYWVG

Sec. con núm. de ident.: 36 BCMA CDR

5 SIYYSGSTYYNPSLKS

Sec. con núm. de ident.: 37 BCMA CDR

HDGATAGLFDY

10 **Sec. con núm. de ident.: 38** BCMA CDR

SSSYFWG

Sec. con núm. de ident.: 39 BCMA CDR

GGNNIGSKSVH

15

Sec. con núm. de ident.: 40 BCMA CDR

DDSDRPS

Sec. con núm. de ident.: 41 BCMA CDR

20 QVWDSSSDHVV

Sec. con núm. de ident.: 42 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFD
YWGQGTLVTVSSA

5 **Sec. con núm. de ident.: 43** BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFD
YWGQGTLVTVSSA

10 **Sec. con núm. de ident.: 44** BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFD
YWGQGTLVTVSSA

15 **Sec. con núm. de ident.: 45** BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLF
DYWGQGTLVTVSSA

20 **Sec. con núm. de ident.: 46** BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFD
YWGQGTLVTVSSA

Sec. con núm. de ident.: 47 BCMA VH

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY
YSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLF
DYWGQGTLVTVSSA

5

Sec. con núm. de ident.: 48 BCMA VL

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVYDDSDRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL

10 **Sec. con núm. de ident.: 49** GPRC5D CDR

SYAIS

Sec. con núm. de ident.: 50 GPRC5D CDR

NYWMS

15

Sec. con núm. de ident.: 51 GPRC5D CDR

SYFIG

Sec. con núm. de ident.: 52 GPRC5D CDR

20 GYTMN

Sec. con núm. de ident.: 53 GPRC5D CDR

GIIPIFGTANYAQKFQG

Sec. con núm. de ident.: 54 GPRC5D CDR

GISYSGGSKYYASSVKG

Sec. con núm. de ident.: 55 GPRC5D CDR

5 IIYPGKSDTRYSPSFQG

Sec. con núm. de ident.: 56 GPRC5D CDR

LINPYNSDTNYAQLQG

10 **Sec. con núm. de ident.: 57** GPRC5D CDR

ESRWRGYKLD

Sec. con núm. de ident.: 58 GPRC5D CDR

AAFDGRRVRLD

15

Sec. con núm. de ident.: 59 GPRC5D CDR

VYSFGGRHKALFDY

Sec. con núm. de ident.: 60 GPRC5D CDR

20 VALRVALDY

Sec. con núm. de ident.: 61 GPRC5D CDR

RASQSISSYLN

Sec. con núm. de ident.: 62 GPRC5D CDR

RASQSVSSYLA

Sec. con núm. de ident.: 63 GPRC5D CDR

5 KASQNVATHVG

Sec. con núm. de ident.: 64 GPRC5D CDR

AASSLQS

10 **Sec. con núm. de ident.: 65** GPRC5D CDR

DASNRAT

Sec. con núm. de ident.: 66 GPRC5D CDR

SASYRYS

15

Sec. con núm. de ident.: 67 GPRC5D CDR

QQSYSTPLT

Sec. con núm. de ident.: 68 GPRC5D CDR

20 QQRSNWPLT

Sec. con núm. de ident.: 69 GPRC5D CDR

QQYNRYPYT

Sec. con núm. de ident.: 70 GPRC5D CDR

DYGMH

Sec. con núm. de ident.: 71 GPRC5D CDR

5 SYWIG

Sec. con núm. de ident.: 72 GPRC5D CDR

GYAMS

10 **Sec. con núm. de ident.: 73** GPRC5D CDR

SYGIS

Sec. con núm. de ident.: 74 GPRC5D CDR

GYSFTGYTMN

15

Sec. con núm. de ident.: 75 GPRC5D CDR

SYAMS

Sec. con núm. de ident.: 76 GPRC5D CDR

20 GFSLTSYNVH

Sec. con núm. de ident.: 77 GPRC5D CDR

AIKYSGGSTYYADSVKG

Sec. con núm. de ident.: 78 GPRC5D CDR

GISYSGGSKYYADSVKG

Sec. con núm. de ident.: 79 GPRC5D CDR

5 IIYPGDSDTRYSPSFQG

Sec. con núm. de ident.: 80 GPRC5D CDR

AISGSGGSTYYADSVKG

10 **Sec. con núm. de ident.: 81** GPRC5D CDR

GIIPIFGNINYAQKFQG

Sec. con núm. de ident.: 82 GPRC5D CDR

LINPYNGDTN

15

Sec. con núm. de ident.: 83 GPRC5D CDR

VIWAGGSTNYNSALMS

Sec. con núm. de ident.: 84 GPRC5D CDR

20 RAESGPGLDY

Sec. con núm. de ident.: 85 GPRC5D CDR

AAWDFGRRVRLDY

Sec. con núm. de ident.: 86 GPRC5D CDR

IGFYGRSFRIFDY

Sec. con núm. de ident.: 87 GPRC5D CDR

5 VDRSFGRSRYTLDY

Sec. con núm. de ident.: 88 GPRC5D CDR

VSRRFKRFAYYFDY

10 **Sec. con núm. de ident.: 89** GPRC5D CDR

SNFLPVVFDY

Sec. con núm. de ident.: 90 GPRC5D CDR

DGIRLRFAY

15

Sec. con núm. de ident.: 91 GPRC5D CDR

KSSQSVLYSSNNKNYLA

Sec. con núm. de ident.: 92 GPRC5D CDR

20 RASQSVRKSLA

Sec. con núm. de ident.: 93 GPRC5D CDR

WASTRES

Sec. con núm. de ident.: 94 GPRC5D CDR

TASNRAT

Sec. con núm. de ident.: 95 GPRC5D CDR

5 QQYYSTPLT

Sec. con núm. de ident.: 96 GPRC5D CDR

QQYFRAPIT

10 **Sec. con núm. de ident.: 97** GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP
IFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARES RWRGYKL
DYWGQGTLVTVSS

15 **Sec. con núm. de ident.: 98** GPRC5D VH

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGIS
YSGGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKAAFD FGR
RAVRLDYWGQGTLVTVSS

20 **Sec. con núm. de ident.: 99** GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIIYP
GKSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRH
KALFDYWGQGTLVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 100 GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLI
 NPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVA
 LDYWGQGTLVTVSS

5

Sec. con núm. de ident.: 101 GPRC5D VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGGTKVEIK

10 **Sec. con núm. de ident.: 102** GPRC5D VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 103 GPRC5D VL

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASY
 RYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTYTFGQGGTKLEIK

Sec. con núm. de ident.: 104 GPRC5D VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIK
 20 YSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPG
 LDYWGQGTLVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 105 GPRC5D VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGIS
YSGGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGR
RAVRLDYWGQGTLVTVSS

5 **Sec. con núm. de ident.: 106** GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYP
GDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFR
IFDYWGQGTLVTVSS

10 **Sec. con núm. de ident.: 107** GPRC5D VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYP
GDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRH
KALFDYWGQGTLVTVSS

15 **Sec. con núm. de ident.: 108** GPRC5D VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGR
SRYTLDYWGQGTLVTVSS

20 **Sec. con núm. de ident.: 109** GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGII
PIFGNINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVSRRFKRFA
YYFDYWGQGTLVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 110 GPRC5D VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLI
NPYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVA
LDYWGQGTLVTVSS

5

Sec. con núm. de ident.: 111 GPRC5D VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVF
DYWGQGTLVTVSS

10

Sec. con núm. de ident.: 112 GPRC5D VH

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWAG
GSTNYNSALMSRLTISKDTSKSQVVLMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRFAYW
GQGTLVTVSS

15

Sec. con núm. de ident.: 113 GPRC5D VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQG
TKVEIK

20

Sec. con núm. de ident.: 114 GPRC5D VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTKVEIKK

Sec. con núm. de ident.: 115 GPRC5D VL

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYSASY
 RYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQYNRYPTYTFGQGGTKLEIK

5 **Sec. con núm. de ident.: 116** GPRC5D

MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIIIESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNV
 LPTQLLFLLSVLGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLV
 RGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQIIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVLLVYV
 LFLMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRILFITVLFSIIIWVWISMILLRGNPQFQRQP
 10 QWDDPVVCIALVTNAWWFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPV TAYQHSFQV
 ENQELSRARDSDGAEEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV

Sec. con núm. de ident.: 117 CD3 CDR 1

TYAMN

15

Sec. con núm. de ident.: 118 CD3 CDR 2

RIRSKYNNYATYYAASVKG

Sec. con núm. de ident.: 119 CD3 CDR 3

20 HGNFGNSYVSWFAY

Sec. con núm. de ident.: 120 CD3 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
 SKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFG
 NSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

5 **Sec. con núm. de ident.: 121** cadena pesada de CD3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
 SKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFG
 NSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVD
 10 HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

15

Sec. con núm. de ident.: 122 CD3 CDR 1

RSSTGAVTTSNYAN

Sec. con núm. de ident.: 123 CD3 CDR 2

20 GTNKRAP

Sec. con núm. de ident.: 124 CD3 CDR 3

ALWYSNLWV

Sec. con núm. de ident.: 125 CD3 VL

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
 RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

5 **Sec. con núm. de ident.: 126** cadena ligera de CD3

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT
 NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKL
 TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG
 VETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10

Sec. con núm. de ident.: 127 enlazador

GGGSGGGS

Sec. con núm. de ident.: 128 enlazador

15 GGGSGGGSGGGS

Sec. con núm. de ident.: 129 enlazador

GGGSGGGSGGGSGGGS

20 **Sec. con núm. de ident.: 130** enlazador

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS

Sec. con núm. de ident.: 131 enlazador

GGGGS GGGGS GGGGS

Sec. con núm. de ident.: 132 enlazador

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

5

Sec. con núm. de ident.: 133 enlazador

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

Sec. con núm. de ident.: 134 enlazador

10 IRPRAIGGSKPRVA

Sec. con núm. de ident.: 135 enlazador

GKGGSGKGGSGKGG

15 **Sec. con núm. de ident.: 136** enlazador

GGKGS GGKGS GGKGS

Sec. con núm. de ident.: 137 enlazador

GGGKS GGGKS GGGKS

20

Sec. con núm. de ident.: 138 enlazador

GKGKSGKGKSGKGKS

Sec. con núm. de ident.: 139 enlazador

GGGKSGGKSGKGG

Sec. con núm. de ident.: 140 enlazador

5 GKPGSGKPGSGKPGS

Sec. con núm. de ident.: 141 enlazador

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

10 **Sec. con núm. de ident.: 142** enlazador

GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS

Sec. con núm. de ident.: 143 enlazador

STAGDTHLGGEDFD

15

Sec. con núm. de ident.: 144 enlazador

GEGSGEGSGEGGS

Sec. con núm. de ident.: 145 enlazador

20 GGEGSGGEGSGGEGS

Sec. con núm. de ident.: 146 enlazador

GEGESGEGESGEGES

Sec. con núm. de ident.: 147 enlazador

GGGESGGEGSGEGGS

Sec. con núm. de ident.: 148 enlazador

5 GEGESGEGESGEGESGEGES

Sec. con núm. de ident.: 149 enlazador

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

10 **Sec. con núm. de ident.: 150** enlazador

PRGASKSGSASQTGSAPGS

Sec. con núm. de ident.: 151 enlazador

GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

15

Sec. con núm. de ident.: 152 enlazador

GTSGSSGSGSGGSGSGGGG

Sec. con núm. de ident.: 153 enlazador

20 GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

Sec. con núm. de ident.: 154 enlazador

GSGS

Sec. con núm. de ident.: 155 enlazador

APAPAPAPAP

Sec. con núm. de ident.: 156 enlazador

5 APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

Sec. con núm. de ident.: 157 enlazador

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA

10 **Sec. con núm. de ident.: 158** lg1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
15 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 159 lg1

20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSFVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 160 Ig4

- 5 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
10 LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Sec. con núm. de ident.: 161 epítipo de CD3

QDGNEEMGGITQTP

- 15 **Sec. con núm. de ident.: 162** epítipo de BCMA

LLHACIPCQL

Sec. con núm. de ident.: 163 enlazador

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

20

Sec. con núm. de ident.: 164 BCMA CDR

SIYYSGRTYYNPSLKS

Sec. con núm. de ident.: 165 Secuencia de nucleótidos del gen de cadena pesada 1 de BGCB491 con región codificante del péptido señal subrayada.

ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGATTTG
GACCTGCTTGGGCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGACTCGTGCG
5 GCCTTCCCAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGCGACTCCGTGTTCA
ACAACAACGCCGCCTGGTCCTGGATCCGGCAGTCTCCATCTCGCGGTCTGGA
GTGGCTCGGTTCGCACCTACTACCGCTCTAAATGGCTGTACGACTACGCCGTG
TCCGTGAAGTCCCGGATCACCGTGAACCCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCA
CCCTGCAGCTGAACTCCGTGACCCCTGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGC
10 CAGAGGCTACTCCTCCTCCTTCGACTATTGGGGCCAAGGCACCCTCGTGACC
GTGTCCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCT
CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
15 CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGC
CGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
20 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTGTGGAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG

CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTG
5 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGTTACGCAGAAGTCTCTCTC
CCTGTCTCCGGGAAAAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGTGGCGG
AGGCGGTTCTGGTGGTGGTGGATCTGACATCGTGATGACCCAGACACCTCTG
AGCAGCCCCGTTACATTGGGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCA
10 GTCCCTGGTGCACCTCTGACGGCAACACCTACCTCTCTTGGCTGCAGCAGAGG
CCTGGACAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGATCTCCAACCGGTTCTTCGG
CGTGCCCGACAGATTTTCTGGATCTGGCGCTGGCACCGACTTCACCCTGAAG
ATTTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGGCCA
CACAGTTCCCTCACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGG
15 ATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGG
AAGCCAAGTGACCCTGAAAGAAAGCGGCCCTGTGCTGGTCAAGCCCACCGAA
AACTGACCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATATCCGGAT
GTCCGTGTCCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTGGCC
CACATCTTCTCCAACGACGAGAAGTCCTACTCCACCAGCCTGAAGTCCCGGCT
20 GACCATCTCCAGAGACACCTCCAAGTCTCAGGTGGTGCTGACACTGACCAAC
GTGGACCCTGTGGATACCGCCACCTACTACTGCGCCAGAATGAGACTGCCCT
ACGGCATGGATGTGTGGGGCCAGGGAACAACCGTGACCGTTTCTTCT

Sec. con núm. de ident.: 166 Secuencia de nucleótidos del gen ligero

BGCB491 con región codificante del péptido señal subrayada.

ATGGCTAGATCCGCACTGCTCATTCTGGCTCTGCTTCTGCTTGGACTGTTCTC
TCCTGGAGCATGGGGACAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGG
 5 CTCTCCCGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATC
 GGCACCTACAAGTTCGTGTCCTGGTATCAGCAACACCCCGACAAGGCCCCCA
 AAGTGCTGCTGTACGAGGTGTCCAAGCGGCCCTCTGGCGTGTCTCCAGATT
 CTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCA
 GGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTGTGTCCTACGCTGGCTCTGGCAC
 10 CCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACTGTCCTGGGTCAGCCCAAGGC
 TGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC
 AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG
 TGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTCGAAACCACCA
 CACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCT
 15 GACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCA
 TGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Sec. con núm. de ident.: 167 Secuencia de nucleótidos del gen de cadena

pesada 2 de BGCB491 con región codificante del péptido señal subrayada.

20 ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGATTTGG
ACCTGCTTGGGCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTGTCACTGT
 CTCCAGGCGAGAGAGCTACCCTGTCCTGTAGAGCCAGCCAGTCTATCTCCTCC
 TCCTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCCCTCGGCTGTTGAT

CTACGGTGCTTCTTCCAGAGCCACAGGCATCCCTGACAGATTCTCTGGCGGCG
GATCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTC
GCCGTGTACTACTGCCAGCACTACGGCAGCAGCCCCATGTACACATTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCC
5 GGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTTGAGCTGCTGGAATCTG
GCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGTTCTCTGAGACTGTCTTGCGCGCTTCC
GGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCTATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA
AGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCTCTGGCGGCAGCACCTACTAC
GCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACAC
10 CCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT
GTGCTAAGGACGAGGGCTACTCCTCCGGCCACTACTACGGAATGGATGTGTGG
GGCCAGGGCACCACAGTGACAGTCTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAAC
TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCCTCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
15 GGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTGCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
20 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC

AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA