

ANTICUERPOS ANTI-IL-2R AGONISTAS Y MÉTODOS DE USO

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 63/170,383, presentada el 2 de abril de 2021, y la solicitud provisional de Estados Unidos No. 63/239,883, presentada el 1 de septiembre de 2021, el contenido de cada una de las cuales se incorpora por referencia en la presente en sus totalidades.

La presente solicitud contiene un listado de secuencias, que se ha presentado por vía electrónica en el formato ASCII y se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Esta copia ASCII, creada el 28 de marzo de 2022, se nombra 60792_00054WO01_(TNO-0038-WO)_SL.txt y tiene un tamaño de 90,527 bytes.

La presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen al receptor de interleucina-2 (IL-2) (IL2R) y exhiben actividad agonista. La divulgación se refiere además a métodos de elaboración de estos anticuerpos, composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden estos anticuerpos, y al uso de los anticuerpos y composiciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que se median por la vía de señalización de IL2/IL2R.

A pesar de tener una potente actividad inmunoactivadora y el potencial para inducir regresión tumoral duradera en pacientes con cáncer, el éxito de IL-2 como agente inmunoterapéutico se ha limitado por toxicidades severas limitantes de dosis. Estos eventos adversos se deben en gran medida a la captación preferencial de IL-2 por células que expresan el receptor trimérico de alta afinidad, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, tal como células T reguladoras (Treg) y células endoteliales. La presente divulgación se refiere a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos solo de cadena pesada multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos solo de cadena pesada biespecíficos) que se unen a y activan la señalización a través del complejo de receptor de IL-2R $\beta\gamma$ dimérico que se expresa en células T en reposo y células NK. Al evitar la unión a IL-2R α , los anticuerpos descritos en la presente eliminan la activación de Treg preferencial de IL-2 nativa, en tanto que mantienen efectos estimulantes potentes en otros subconjuntos de células T junto con células NK. Además, la presencia de una región Fc en los anticuerpos de ejemplo descritos en la presente extiende significativamente la semivida *in vivo* sobre la de la IL-2 recombinante, que permite un programa de dosificación más conveniente en un contexto terapéutico. Los estudios *in vivo* tanto en ratones como en monos cynomolgus han confirmado la actividad biológica *in vivo*, farmacocinética extendida y perfil de seguridad mejorado de los anticuerpos de ejemplo descritos en la presente. En conjunto, estos resultados respaldan el uso de estos anticuerpos como agonistas de IL-2R seguros y efectivos, así como el uso de la vía de señalización de IL-2 como enfoque de tratamiento terapéutico para múltiples tipos de cáncer.

La capacidad de aprovechar el sistema inmunitario contra tumores se ha establecido firmemente, con interleucina-2 (IL-2) que es una de las primeras proteínas recombinantes que se usó de manera exitosa como tratamiento para cáncer hace casi 40 años. Lotze et al., *Journal of Immunology* 135(4), 2865-75 (1985); Rosenberg, S. A. *J Immunol* 192, 5451-58 (2014). IL-2 es un regulador clave de las células inmunitarias, que induce la proliferación tanto de células T como de células asesinas naturales (NK). Sin embargo, IL-2 es una citocina pleiotrópica que también induce la proliferación de células T reguladoras (Treg) inmunosupresoras. Fontenot et al., *Nat Immunol* 6, 1142-51 (2005). Las diferentes funciones de IL-2 se determinan por la composición de subunidades de complejo de receptor de IL-2 expresadas en diferentes células diana. Boyman et al., *Nat Rev Immunol* 12, 180-90 (2012). El complejo de receptor de IL-2 de alta afinidad se compone de IL-2RA (CD25), IL-2RB (CD122) y el receptor de cadena gamma común IL-2RG (CD132), y se expresa constitutivamente en células Treg CD4+FoxP3+ y de manera transitoria en células T activadas. Waldmann, T. A., *Nat Rev Immunol* 6, 595-601 (2006). El receptor de afinidad intermedia se compone solo de IL-2RB e IL-2RG, y se expresa en células T en reposo, células T efectoras de memoria CD8+ y células NK. Choudhry, H. et al, *Biomed Res Int* 2018, 1-7 (2018). La subunidad de IL-2RA no se requiere para la señalización JAK-STAT corriente abajo, pero su asociación con IL-2RB e IL-2RG proporciona una afinidad 100 veces mayor a IL-2 en comparación con el receptor heterodimérico compuesto solo de IL-2RB e IL-2RG. Con base en estas diferencias de unión a receptor y expresión específica de células, se ha propuesto que las Treg inmunosupresoras sirven como amortiguador para consumir bajos niveles de IL-2 y crear un efecto umbral para la expansión mediada por IL-2 de linfocitos efectores. Feinerman, O. et al., *Mol Syst Biol* 6, 437 (2010).

Debido a sus propiedades de señalización únicas, la IL-2 de dosis baja se ha usado clínicamente para estimular las Treg para tratar la autoinmunidad, en tanto que IL-2 de dosis alta se desarrolló y aprobó (Proleukin®) para el tratamiento del melanoma metastásico y el carcinoma metastásico de células renales, con respuestas duraderas observadas en 7-12 % de los pacientes. McDermott, D. F. et al., *J Clin Oncol* 23, 133-141 (2004); Payne, R. et al., *J Immunother Cancer* 2, 13 (2014); Atkins, M. B. et al., *J Clin Oncol* 17, 2105-2105 (1999); Rosenberg, S. A. et al., *Ann Surg* 228, 307-319 (1998). Sin embargo, su corta semivida y su estrecha ventana terapéutica han creado desafíos significativos para el uso seguro y efectivo de IL-2 en pacientes. Específicamente, Proleukin® tiene efectos secundarios severos, incluido síndrome de fuga vascular, hipotensión y toxicidades hepáticas que han limitado su uso en inmunoterapia contra cáncer. Se ha mostrado que la toxicidad de fuga vascular se relaciona con la expresión de IL-2R de alta afinidad en células endoteliales vasculares y en células endoteliales de pulmón, que conduce a edema pulmonar. Krieg, C., et al., *Proc National Acad*

Sci 107, 11906–11 (2010). Los efectos antitumorales de Proleukin® se comprometen aún más por su unión preferencial al receptor de alta afinidad en las células Treg, que reduce su eficacia como terapia anti-cáncer. Schwartzentruber, D. J. et al., *New Engl J Medicine* 364, 2119–2127 (2011); Rezvani, K. et al., *Blood* 108, 1291–1297 (2006). Como ejemplo, en pacientes con melanoma que reciben terapia de IL-2 de dosis altas, se encontró que las células Treg positivas para coestimulador (ICOS+) son la población de linfocitos más proliferativa en la sangre después del tratamiento con IL-2, y un alto número de Treg ICOS+ correspondió con los peores resultados de paciente. Sim, G. C. et al., *J Clin Invest* 124, 99–110 (2014).

Debido a la naturaleza pleiotrópica de IL-2 nativa y sus limitaciones asociadas como molécula terapéutica, ha habido un esfuerzo sustancial para modificar variantes de IL-2 que reduzcan las toxicidades limitantes de dosis y por lo tanto, amplíen la ventana terapéutica. Murer, P. et al., *New Biotechnol* 52, 42–53 (2019); Arenas-Ramirez, N. et al., *Trends Immunol* 36, 763–77 (2015). Las proteínas variantes que evitan la activación preferencial de células que expresan IL-2R de alta afinidad, tal como Treg y células endoteliales vasculares, son un enfoque para lograr este objetivo. En un esfuerzo por crear esta molécula, otros enfoques han implicado mutar la interfase de unión a IL-2RA en IL-2, unir polietilenglicol a la proteína IL-2, crear proteínas IL-2 sintéticas y generar un anticuerpo que bloquea el dominio de unión a IL-2RA. Silva, D.-A. et al., *Nature* 565, 186–191 (2019); Charych, D. H. et al., *Clin Cancer Res* 22, 680–690 (2016); Arenas-Ramirez, N. et al., *Sci Transl Med* 8, 367ra166–367ra166 (2016); Levin, A. M. et al., *Nature* 484, 529–533 (2012); Lopes, J. E. et al., *J Immunother Cancer* 8, e000673 (2020). Como una alternativa a IL-2, otros han modificado variantes de IL-15 que se unen a subunidades de IL-2RB/IL-2RG. La subunidad de receptor específico de IL-15 se une naturalmente a IL-15 en *trans* de células presentadoras de antígeno; por lo tanto, una proteína recombinante de IL-15 activa requiere una construcción de cadena individual que exprese tanto IL-15 como la subunidad de receptor. Bennett, M. J. et al. Abstract 5565: Potency-reduced IL15/IL15R α heterodimeric Fc-fusions display enhanced *in vivo* activity through increased exposure. 5565–5565 (2018) doi:10.1158/1538-7445.am2018-5565. Las citocinas mutadas también se han fusionado a anticuerpos o dominios Fc para incrementar la semivida *in vivo* de las moléculas y localizar las citocinas en el sitio tumoral. Murer, P. et al., *New Biotechnol* 52, 42–53 (2019); Klein, C. et al., *Oncoimmunology* 6:3 e1277306 (2017); Schliemann, C. et al., *Blood* 120, 3716–3716 (2012). En tanto que algunas de estas proteínas modificadas tienen la actividad funcional deseada, muchas sufren de altos niveles de inmunogenicidad *in vivo* y presentan desafíos con la fabricación y estabilidad *in vivo*. Brummelen, E. M. J. van et al., *Oncotarget* 9, 24737–49 (2018); Groot, A. S. D. et al., *Trends Immunol* 28, 482–90 (2007); Schellekens, H., *Nephrol Dial Transpl* 18, 1257–59 (2003); Verhoef, J. J. F., et al., *Drug Discov Today* 19, 1945–52 (2014). Por

lo tanto, la creación de un agonista antitumoral de la vía de IL-2 con la actividad biológica deseada, perfil de seguridad y propiedades ideales tipo fármaco sigue siendo un desafío significativo para el campo.

Las moléculas de la presente divulgación combinan las propiedades favorables tipo fármaco de los anticuerpos con el comportamiento funcional de las moléculas que facilitan la asociación de IL-2RB e IL-2RG y la señalización corriente abajo. Los aspectos de la divulgación incluyen secuencias de anticuerpo, tal como secuencias de anticuerpo completamente humano, tal como anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) completamente humanos que se unen simultáneamente a subunidades de IL-2Rp e IL-2RG y por lo tanto imitan la actividad de IL-2 en tanto que evitan la unión a IL-2RA. Además de exhibir la activación y expansión deseadas de células efectoras inmunitarias, los anticuerpos agonistas de IL-2RB/G biespecíficos descritos en la presente también evitan la expansión preferencial de Treg supresoras, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Modalidades de ejemplo no limitantes (conjunto 1)

Sin limitación, algunas modalidades/características de ejemplo de esta divulgación incluyen:

1. Un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
 - (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o
 - (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o
 - (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.
2. El anticuerpo de la característica 1, que comprende:
 - (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o
 - (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o
 - (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.
3. El anticuerpo de la característica 1 o 2, que comprende:
 - (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y
 - (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y
 - (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.
4. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-3, que comprende:
 - (a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; o

(b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; o

(c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; o

5 (d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10.

5. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-4, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 11-14.

10 6. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-5, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 11-14.

7. Un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

15 G G S I S S S X1 W (SEQ ID NO: 26)

donde X1 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I X2 H S G S T (SEQ ID NO: 27)

donde X2 es D o S; y

20 (c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

X3 R G X4 W E L X5 D A F D I (SEQ ID NO: 28)

donde X3 es G o A;

X4 es S o Q; y

X5 es S o T.

25 8. Un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F T F S X1 Y G (SEQ ID NO: 29)

donde X1 es S o T;

30 (b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I S Y D G S N X2 (SEQ ID NO: 30)

donde X2 es K o R; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

A R D L D Y D X3 L T G D P V G G F D I (SEQ ID NO: 31)

35 donde X3 es V o I.

9. Un anticuerpo que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
- (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o
 - 5 (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o
 - (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos sustituciones (por ejemplo, 0, 1 o 2) en cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.
10. El anticuerpo de la característica 9, que comprende:
- 10 (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o
 - (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o
 - (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.
11. El anticuerpo de la característica 9 o 10, que comprende:
- (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y
 - 15 (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y
 - (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.
12. El anticuerpo de cualquiera de las características 9-11, que comprende:
- (a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
 - 20 (b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
 - (c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
 - 25 (d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.
13. El anticuerpo de cualquiera de las características 9-12, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 22-25.
14. El anticuerpo de cualquiera de las características 9-13, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 22-25.
- 30 15. Un anticuerpo que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
- (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

$$G F X_1 X_2 X_3 X_4 Y Y \text{ (SEQ ID NO: 32)}$$
 - 35 donde X_1 es T o I;

X2 es F o V;

X3 es S, N o G; y

X4 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

5 I S X5 S G X6 X7 I (SEQ ID NO: 33)

donde X5 es S o N;

X6 es D, S, G o N; y

X7 es T o I; y

10 (c) una secuencia de CDR3 que comprende la secuencia ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20).

16. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-15, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco de VH humano.

17. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-16, en donde el anticuerpo es multiespecífico.

15 18. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-17, en donde el anticuerpo es biespecífico.

19. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-18, en donde el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG.

20. Un anticuerpo que comprende:
20 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:

una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;

una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y

una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:

25 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;

una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y

una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

21. El anticuerpo de la característica 20, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11, y la segunda región
30 variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22.

22. El anticuerpo de la característica 20 o 21, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

23. El anticuerpo de cualquiera de las características 20-22, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 53 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 61.
24. Un anticuerpo que comprende:
- 5 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
- una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
- una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
- una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
- una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
- 10 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
- una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
- una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
25. El anticuerpo de la característica 24, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región
- 15 variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23.
26. El anticuerpo de la característica 24 o 25, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.
27. El anticuerpo de cualquiera de las características 24-26, que comprende un primer
- 20 polipéptido que comprende SEQ ID NO: 62 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 63.
28. Un anticuerpo que comprende:
- una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
- una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2;
- 25 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5; y
- una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; y
- una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
- una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
- una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
- 30 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
29. El anticuerpo de la característica 28, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23.

30. El anticuerpo de la característica 28 o 29, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.
31. El anticuerpo de cualquiera de las características 28-30, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 64 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 65.
32. Un anticuerpo que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10; y
 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
33. El anticuerpo de la característica 32, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22.
34. El anticuerpo de la característica 32 o 33, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.
35. El anticuerpo de cualquiera de las características 32-34, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 66 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 67.
36. Un anticuerpo que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

37. El anticuerpo de la característica 36, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 24.
38. El anticuerpo de la característica 36 o 37, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 24.
39. El anticuerpo de cualquiera de las características 36-38, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 34 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 35.
40. Un anticuerpo que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.
41. El anticuerpo de la característica 40, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 25.
42. El anticuerpo de la característica 40 o 41, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 25.
43. El anticuerpo de cualquiera de las características 40-42, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 36 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 37.
44. El anticuerpo de cualquiera de las características 20, 24, 28, 32, 36 o 40, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH.
45. El anticuerpo de cualquiera de las características 20, 24, 28, 32, 36, 40 o 44, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH.
46. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-22, 24-26, 28-30, 32-34, 36-38, 40-42, 44 o 45, en donde el anticuerpo comprende una región Fc.

47. El anticuerpo de la característica 46, en donde la región Fc es una región Fc variante.
48. El anticuerpo de la característica 47, en donde la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.
5. 49. El anticuerpo de la característica 47 o 48, en donde la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización.
50. El anticuerpo de la característica 49, en donde las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra).
10. 51. El anticuerpo de la característica 49 o 50, en donde las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra).
20. 52. El anticuerpo de cualquiera de las características 49-51, en donde las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).
30. 35

53. El anticuerpo de cualquiera de las características 47-52, en donde la región Fc variante es una región Fc silenciada.
54. El anticuerpo de la característica 53, en donde la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269,
5 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU.
55. El anticuerpo de la característica 53 o 54, en donde la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación.
56. El anticuerpo de cualquiera de las características 53-55, en donde la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G,
10 DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2) y/o mutaciones K322A y L234A/L235A.
57. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-22, 24-26, 28-30, 32-34, 36-38, 40-42 o 44-56, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1.
- 15 58. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-22, 24-26, 28-30, 32-34, 36-38, 40-42 o 44-57, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.
59. El anticuerpo de la característica 58, en donde la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54).
- 20 60. El anticuerpo de la característica 58, en donde la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55).
61. El anticuerpo de cualquiera de las características 58-60, en donde el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56).
- 25 62. El anticuerpo de cualquiera de las características 58-61, en donde el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A.
63. El anticuerpo de cualquiera de las características 58-62, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58).
- 30 64. El anticuerpo de cualquiera de las características 58-62, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W.
65. El anticuerpo de cualquiera de las características 58-62, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una
35 mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

66. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-65, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
67. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-66, en donde el anticuerpo es un anticuerpo aislado.
- 5 68. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una molécula de IgG intacta.
69. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-68, en donde el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta.
70. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-68, en donde el anticuerpo es una
10 molécula de IgG2 intacta.
71. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-68, en donde el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta.
72. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta.
- 15 73. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta.
74. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta.
75. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una
20 porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta.
76. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple.
77. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-67, en donde el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.
- 25 78. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-77, en donde el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.
79. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-78, en donde el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.
80. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-79, en donde el anticuerpo tiene una
30 afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de

aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

81. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-80, en donde el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

5 82. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-81, en donde el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

83. El anticuerpo de cualquiera de las características 80-82, en donde K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético.

84. El anticuerpo de cualquiera de las características 80-83, en donde K_d se mide usando
10 un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético.

85. El anticuerpo de cualquiera de las características 80-82, en donde K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

86. El anticuerpo de cualquiera de las características 1-85, en donde el anticuerpo funciona
15 como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

87. Una composición farmacéutica que comprende:
un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86; y
un excipiente farmacéuticamente aceptable.

88. La composición farmacéutica de la característica 87, en donde la composición
20 farmacéutica se adapta para administración intravenosa.

89. La composición farmacéutica de la característica 87, en donde la composición farmacéutica se adapta para administración subcutánea.

90. Un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86.

25 91. Un vector que comprende un polinucleótido de la característica 90.

92. Una célula (por ejemplo, una célula CHO) que comprende un vector de la característica 91.

93. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, el método que comprende:

30 cultivar una célula (por ejemplo, una célula CHO) de acuerdo con la característica 92 bajo condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo; y
aislar el anticuerpo de la célula y/o un medio de cultivo celular en el cual se cultiva la célula.

94. Un método para elaborar un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, el método que comprende inmunizar un animal transgénico (por ejemplo, una rata transgénica, un animal UniRat®) con IL2R e identificar secuencias de cadena pesada de unión a IL2R.
95. Un kit para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad del mismo
- 5 que comprende:
- un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-89; y
- instrucciones de uso.
96. El kit de la característica 95, que comprende además al menos un reactivo adicional.
- 10 97. El kit de la característica 96, en donde el al menos un reactivo adicional comprende un fármaco quimioterapéutico.
98. Un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un individuo en necesidad del mismo una dosis efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-
- 15 89.
99. El método de la característica 98, en donde el anticuerpo o composición farmacéutica se administra en conjunto con otro curso de terapia.
100. El método de la característica 98 o 99, en donde el anticuerpo o composición farmacéutica se administra en conjunto con un régimen de quimioterapia.
- 20 101. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad del mismo.
102. El uso de la característica 101, en donde el medicamento se propone para administración en conjunto con otro curso de terapia.
- 25 103. El uso de la característica 101 o 102, en donde el medicamento se propone para administración en conjunto con un régimen de quimioterapia.
104. Un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-89, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad del mismo.
- 30 105. El anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 104, en donde el anticuerpo o composición farmacéutica se propone para uso en conjunto con otro curso de terapia.
106. El anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 104, en donde el anticuerpo o composición farmacéutica se propone para uso en conjunto con un
- 35 régimen de quimioterapia.

107. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de cualquiera de las características 95-106, en donde la enfermedad o trastorno es un cáncer.
108. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 107, en donde el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico.
- 5 109. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 107 o 108, en donde el cáncer es un cáncer de tumor sólido.
110. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 109, en donde el cáncer de tumor sólido se selecciona de carcinoma de células renales, melanoma, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de
- 10 células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.
111. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 107 o 108, en donde el cáncer es un cáncer líquido.
- 15 112. El kit, método, uso, anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 111, en donde el cáncer líquido es mieloma múltiple o leucemia mieloide aguda.
113. Un método para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria, el método que comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-
- 20 89.
114. Un método para estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria, el método que comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-89.
- 25 115. El método de la característica 113 o 114, en donde la célula inmunitaria se selecciona de una célula T CD4+, una célula T CD8+ y una célula aniquiladora natural (NK).
116. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86 en la preparación de un medicamento para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria en un individuo en necesidad del mismo.
- 30 117. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86 en la preparación de un medicamento para estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria en un individuo en necesidad del mismo.
118. El uso de la característica 116 o 117, en donde la célula inmunitaria se selecciona de una célula T CD4+, una célula T CD8+ y una célula aniquiladora natural (NK).
- 35

119. Un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-89, para uso en un método para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria.

5 120. Un anticuerpo de cualquiera de las características 1-86, o una composición farmacéutica de cualquiera de las características 87-89, para uso en un método para estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria.

121. El anticuerpo para uso o composición farmacéutica para uso de la característica 119 o 120, en donde la célula inmunitaria se selecciona de una célula T CD4+, una célula T CD8+ y una célula asesina natural (NK).

10 Modalidades de ejemplo no limitantes (conjunto 2)

Sin limitación, algunas modalidades/cláusulas de ejemplo de esta divulgación incluyen:

1. Un anticuerpo solo de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

15 (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o

(b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o

(c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

20 2. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 1, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco de VH humano.

3. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 1 o 2, que comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1.

25 4. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 1-3, que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o

(b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o

(c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

5. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 4, que comprende:

30 (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y

(b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

6. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 5, que comprende:

35 (a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; o

(b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; o

(c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; o

5 (d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10.

7. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 1-5, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 11-14.

10 8. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 7, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11-14.

9. Un anticuerpo solo de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

15 (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G G S I S S S X1 W (SEQ ID NO: 26)

donde X1 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I X2 H S G S T (SEQ ID NO: 27)

20 donde X2 es D o S; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

X3 R G X4 W E L X5 D A F D I (SEQ ID NO: 28)

donde X3 es G o A;

X4 es S o Q; y

25 X5 es S o T.

10. Un anticuerpo solo de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F T F S X1 Y G (SEQ ID NO: 29)

30 donde X1 es S o T;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I S Y D G S N X2 (SEQ ID NO: 30)

donde X2 es K o R; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

35 A R D L D Y D X3 L T G D P V G G F D I (SEQ ID NO: 31)

donde X3 es V o I.

11. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 9-10, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

12. Un anticuerpo solo de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o

(b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o

(c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

13. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 12, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco de VH humano.

14. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 12 o 13, que comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1.

15. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 12-14, que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o

(b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o

(c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

16. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 15, que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y

(b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

17. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 16, que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

18. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 12-16, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 22-25.
19. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 18, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-25.
20. Un anticuerpo solo de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
- (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:
- G F X1 X2 X3 X4 Y Y (SEQ ID NO: 32)
- donde X1 es T o I;
X2 es F o V;
X3 es S, N o G; y
X4 es D o N;
- (b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:
- I S X5 S G X6 X7 I (SEQ ID NO: 33)
- donde X5 es S o N;
X6 es D, S, G o N; y
X7 es T o I; y
- (c) una secuencia de CDR3 que comprende la secuencia ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20).
21. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 20, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.
22. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 1-21, que es multiespecífico.
23. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 22, que es biespecífico.
24. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 22 o 23, que se une a IL2RB e IL2RG.
25. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 1-24, que comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.
26. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 25, en donde la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54).

27. El anticuerpo solo de cadena pesada de la cláusula 25, en donde la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55).
28. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 25-27, en donde el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56).
29. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 25-27, en donde el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A.
30. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 25-29, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58).
31. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 25-29, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W.
32. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 25-29, en donde el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.
33. El anticuerpo solo de cadena pesada de cualquiera de las cláusulas 22-32, que funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.
34. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
 - una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 - una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
 - una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
 - una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; y
 - una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 - una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 - una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y
 - una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
35. El anticuerpo de la cláusula 34, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22.
36. El anticuerpo de la cláusula 35, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

37. El anticuerpo de la cláusula 36, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 53 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 61.
38. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 5 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 10 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
39. El anticuerpo de la cláusula 38, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23.
- 15 40. El anticuerpo de la cláusula 39, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.
41. El anticuerpo de la cláusula 40, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 62 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 63.
- 20 42. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; y
 25 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
43. El anticuerpo de la cláusula 42, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23.
- 30 44. El anticuerpo de la cláusula 43, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.

45. El anticuerpo de la cláusula 44, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 64 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 65.
46. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 5 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10; y
 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
 10 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
47. El anticuerpo de la cláusula 46, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22.
- 15 48. El anticuerpo de la cláusula 47, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.
49. El anticuerpo de la cláusula 48, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 66 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 67.
- 20 50. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
 25 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16;
 una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y
 una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.
51. El anticuerpo de la cláusula 50, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 24.
- 30 52. El anticuerpo de la cláusula 51, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 24.

53. El anticuerpo de la cláusula 52, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 34 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 35.
54. Un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:
una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
- 5 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1;
una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y
una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y
una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
- 10 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15;
una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19; y
una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.
55. El anticuerpo de la cláusula 54, en donde la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 25.
- 15 56. El anticuerpo de la cláusula 55, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 25.
57. El anticuerpo de la cláusula 56, que comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 36 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 37.
- 20 58. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57.
59. Un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57.
60. Un vector que comprende el polinucleótido de la cláusula 59.
61. Una célula que comprende el vector de la cláusula 60.
- 25 62. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, el método que comprende cultivar una célula de acuerdo con la cláusula 61 bajo condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo, y aislar el anticuerpo de la célula y/o un medio de cultivo celular en el cual se cultiva la célula.
63. Un método para elaborar un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, el método
- 30 que comprende inmunizar un animal UniRat con IL2R e identificar secuencias de cadena pesada de unión a IL2R.
64. Un kit para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad, que comprende un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o una composición farmacéutica de la cláusula 58, e instrucciones de uso.
- 35 65. El kit de la cláusula 64, que comprende además al menos un reactivo adicional.

66. El kit de la cláusula 65, en donde el al menos un reactivo adicional comprende un fármaco quimioterapéutico.
67. Un método de tratamiento, que comprende administrar a un individuo en necesidad una dosis efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o una composición farmacéutica de la cláusula 58.
68. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad.
69. El anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o la composición farmacéutica de la cláusula 58, para uso en terapia en un individuo en necesidad.
70. Un método para el tratamiento de un cáncer, que comprende administrar a un sujeto con el cáncer un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o una composición farmacéutica de la cláusula 58.
71. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 67-70, en donde el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico.
72. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 67-71, en donde el cáncer es un cáncer de tumor sólido.
73. El método o uso de la cláusula 72, en donde el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma de células renales, melanoma, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.
74. Un método para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria, el método que comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o una composición farmacéutica de la cláusula 58.
75. Un método para estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria, el método que comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 1-57, o una composición farmacéutica de la cláusula 58.
76. El método de la cláusula 74 o 75, en donde la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en: una célula T CD4+, una célula T CD8+ y una célula aniquiladora natural (NK).
- IL-2R, también conocido como receptor de interleucina-2, es una proteína heterodimérica expresada en la superficie de diferentes células inmunitarias, que sirve como un ligando cognado para interleucina 2 (IL-2). El complejo de IL-2R se compone de diferentes combinaciones de las cadenas de proteínas IL-2R α (IL2RA), IL-2R β (IL2RB) e IL-2R γ (IL2RG). IL-2RA también se refiere como CD25, y la secuencia de IL2RA humana (UniProtKB No.

P01589) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 38. IL-2RB también se refiere como CD122, y la secuencia de IL2RB humana (UniProtKB No. P14784) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 39. IL-2RG también se refiere como CD132, y la secuencia de IL2RG humana (UniProtKB No. P31785) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 40. La secuencia de
 5 IL-2 humana (UniProtKB No. P60568) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 41.

Los aspectos de la divulgación se refieren a un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en
 10 cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de
 15 SEQ ID NO: 7-10.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de
 SEQ ID NO: 7-10.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende:

(a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; o

(b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; o

25 (c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; o

(d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10.

30 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco de VH humano.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene seis o menos (por ejemplo, cinco o menos, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos; seis, cinco, cuatro, tres, dos, uno, cero) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 11-14. En algunas modalidades, el anticuerpo
 35 comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % (por ejemplo, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 11-14. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11-14.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % de homología (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C

en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En

algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, el anticuerpo funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

20 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

35 G G S I S S S X1 W (SEQ ID NO: 26)

donde X1 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I X2 H S G S T (SEQ ID NO: 27)

donde X2 es D o S; y

5 (c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

X3 R G X4 W E L X5 D A F D I (SEQ ID NO: 28)

donde X3 es G o A; X4 es S o Q; y X5 es S o T.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

30 En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T

en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas

modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3

5 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, el anticuerpo funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M (por ejemplo, de aproximadamente 10⁻¹⁰

20 M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁹ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁹ M).

25 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁷ M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁸ M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de

30 aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁷ M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁸ M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo

cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo que se une a IL2RB, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

- 5 (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F T F S X1 Y G (SEQ ID NO: 29)

donde X1 es S o T;

- (b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I S Y D G S N X2 (SEQ ID NO: 30)

- 10 donde X2 es K o R; y

- (c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

A R D L D Y D X3 L T G D P V G G F D I (SEQ ID NO: 31)

donde X3 es V o I.

- 15 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

- 20 En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

- 30 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una
35 región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, el anticuerpo funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M (por ejemplo, de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁹ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁹ M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁷ M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁸ M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende:

(a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o

(d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene seis o menos (por ejemplo, cinco o menos,

cuatro o menos, tres o menos, dos o menos; seis, cinco, cuatro, tres, dos, uno, cero) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 22-25. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 22-25. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-25.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S,

L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio

CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, el anticuerpo funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo que se une a IL2RG, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F X1 X2 X3 X4 Y Y (SEQ ID NO: 32)

5 donde X1 es T o I; X2 es F o V; X3 es S, N o G; y X4 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I S X5 S G X6 X7 I (SEQ ID NO: 33)

donde X5 es S o N; X6 es D, S, G o N; y X7 es T o I; y

10 (c) una secuencia de CDR3 que comprende la secuencia ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20).

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

En algunas modalidades, el anticuerpo es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a IL2RB e IL2RG.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo que contiene región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada no contiene una secuencia CH1. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P

(SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A.

5 En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

25 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

30 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

35 En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; y

5 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la

numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc
5 silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra
10 comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio
15 CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio
20 CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 53 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 61.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.
25

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M (por ejemplo, de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁹ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁹ M).
30
35

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet
10 Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
15 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

20 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están
25 presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad
30 de secuencia a SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo
35 es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R

en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 62 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 63.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias

de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T

en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas

modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3

5 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 64 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo

15 tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de

20 aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de

25 aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d

30 de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los

35 ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10; y

5 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la

numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc
5 silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra
10 comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio
15 CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio
20 CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 66 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 67.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.
25

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).
30
35

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet
10 Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
15 una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

20 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están
25 presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad
30 de secuencia a SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo
35 es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R

en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 34 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias

de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG1 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG2 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una porción inmunológicamente activa de una molécula de IgG4 intacta. En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula tipo anticuerpo de cadena triple. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T

en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas

modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3

5 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 36 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo

15 tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de

20 aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de

25 aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d

30 de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los

35 ejemplos en la presente.

En un anticuerpo IgG convencional, la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera se debe en parte a una interacción hidrófoba entre la región constante de cadena ligera y el dominio constante CH1 de la cadena pesada. Hay residuos adicionales en las regiones marco 2 (FR2) y marco 4 (FR4) de cadena pesada que también contribuyen a esta interacción hidrófoba entre las cadenas pesada y ligera.

Se conoce, sin embargo, que los sueros de camélidos (suborden *Tylopoda* que incluye camellos, dromedarios y llamas) contienen un tipo principal de anticuerpos compuestos únicamente de cadenas H emparejadas (anticuerpos solo de cadena pesada o HCAb). Los anticuerpos solo de cadena pesada de *Camelidae* (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanaco*, *Lama alpaca* y *Lama vicugna*) tienen una estructura única que consiste en un dominio variable individual (VHH), una región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3), que son altamente homólogos a los dominios CH2 y CH3 de los anticuerpos clásicos. Estos anticuerpos solo de cadena pesada carecen del primer dominio de la región constante (CH1), que está presente en el genoma pero se empalma durante el procesamiento de ARNm. La ausencia del dominio CH1 explica la ausencia de la cadena ligera en los anticuerpos solo de cadena pesada puesto que este dominio es el lugar de anclaje para el dominio constante de la cadena ligera. Estos anticuerpos de cadena pesada solamente evolucionaron naturalmente para conferir especificidad de unión a antígeno y alta afinidad por tres CDR de anticuerpos convencionales o fragmentos de los mismos. Muyldermans, 2001; *J Biotechnol* 74:277–302; Revets et al., 2005; *Expert Opin Biol Ther* 5:111–124. Los peces cartilagosos, tal como tiburones, también han desarrollado un tipo distintivo de inmunoglobulina, designada como IgNAR, que carece de las cadenas de polipéptidos ligeras y se compone completamente por cadenas pesadas. Las moléculas de IgNAR se pueden manipular por modificación molecular para producir el dominio variable de un polipéptido de cadena pesada individual (vNAR). Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003).

La capacidad de los anticuerpos solo de cadena pesada desprovistos de cadena ligera para unirse al antígeno se estableció en la década de 1960 (Jaton et al. (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195). La inmunoglobulina de cadena pesada separada físicamente de la cadena ligera retuvo 80 % de la actividad de unión a antígeno con respecto al anticuerpo tetramérico. Sitia et al. (1990) *Cell*, 60, 781-790 demostraron que la remoción del dominio CH1 de un gen μ de ratón reordenado da por resultado la producción de un anticuerpo solo de cadena pesada, desprovisto de cadena ligera, en cultivo de células de mamífero. Los anticuerpos producidos retuvieron la especificidad de unión a VH y las funciones efectoras.

Se pueden generar anticuerpos de cadena pesada con alta especificidad y afinidad contra una variedad de antígenos a través de la inmunización (van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), y la porción VHH se puede clonar y expresar fácilmente en levadura (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Sus niveles de expresión, solubilidad y estabilidad son significativamente más altos que los de los fragmentos F(ab) o Fv clásicos. Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997).

Ratones en los cuales el locus de cadena ligera (L) λ (lambda) y/o los loci de cadena L λ y κ (kappa) se han silenciado funcionalmente y los anticuerpos producidos por estos ratones se describen en la patente de Estados Unidos No. 7,541,513 y 8,367,888. La producción recombinante de anticuerpos solo de cadena pesada en ratones y ratas se ha reportado, por ejemplo, en WO2006008548; publicación de solicitud de Estados Unidos No. 20100122358; Nguyen et al., 2003, *Immunology*; 109(1), 93-101; Brüggemann et al., *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90; y Zou et al., 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283. La producción de ratas inactivadas mediante microinyecciones embrionarias de nucleasas con dedos de zinc se describe en Geurts et al., 2009, *Science*, 325(5939):433. Los anticuerpos solo de cadena pesada solubles y los roedores transgénicos que comprenden un locus de cadena pesada heterólogo que produce estos anticuerpos se describen en la patente de Estados Unidos No. 8,883,150 y 9,365,655. Las estructuras CAR-T que comprenden anticuerpos de dominio individual como dominios de unión (direccionamiento) se describen, por ejemplo, en Iri-Sofla et al., 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641, y Jamnani et al., 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378-386.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos solo de cadena pesada que se unen a IL2RB, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y/o (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y/o (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-3; y (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 4-6; y (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 7-10.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende:

(a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; o

5 (b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; o

(c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; o

(d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10.

10 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco de VH humano.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene seis o menos (por ejemplo, cinco o menos, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos; seis, cinco, cuatro, tres, dos, uno, 15 cero) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 11-14. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 11-14. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una secuencia de región variable de cadena pesada 20 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11-14.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % de homología (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, 25 al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) 30 Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, 35 L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización

comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una

mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W.

- 5 En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

- 10 En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

- 15 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

- 30 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo

cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos solo de cadena pesada que se unen a IL2RB, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende:

- 5 (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G G S I S S X1 W (SEQ ID NO: 26)

donde X1 es D o N;

- (b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I X2 H S G S T (SEQ ID NO: 27)

- 10 donde X2 es D o S; y

- (c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

X3 R G X4 W E L X5 D A F D I (SEQ ID NO: 28)

donde X3 es G o A; X4 es S o Q; y X5 es S o T.

- 15 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

- En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos
20 aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

- En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1)
25 Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S,
30 L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C
35 en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido

Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W.

En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos solo de cadena pesada que se unen a IL2RB, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F T F S X1 Y G (SEQ ID NO: 29)

donde X1 es S o T;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

5 I S Y D G S N X2 (SEQ ID NO: 30)

donde X2 es K o R; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende la fórmula:

A R D L D Y D X3 L T G D P V G G F D I (SEQ ID NO: 31)

donde X3 es V o I.

10 En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 %
15 (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización
20 comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A
25 en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido
30 Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K
35 en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R

en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos solo de cadena pesada que se unen a IL2RG, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una secuencia de CDR1 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o (b) una secuencia de CDR2 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o (c) una secuencia de CDR3 que tiene dos o menos (por ejemplo, 0, 1 o 2) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y/o (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y/o (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

- 5 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende: (a) una secuencia de CDR1 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 15-16; y (b) una secuencia de CDR2 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 17-19; y (c) una secuencia de CDR3 que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 20-21.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende:

- 10 (a) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
- (b) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
- (c) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20; o
- 15 (d) una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

- 20 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene seis o menos (por ejemplo, cinco o menos, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos; seis, cinco, cuatro, tres, dos, uno, cero) sustituciones en cualquiera de SEQ ID NO: 22-25. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos
- 25 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 22-25. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-25.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc.

- 30 En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada se une a IL2RB e IL2RG. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

5 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet
10 Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos solo de cadena pesada que se unen a IL2RG, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende:

15 (a) una secuencia de CDR1 que comprende la fórmula:

G F X1 X2 X3 X4 Y Y (SEQ ID NO: 32)

donde X1 es T o I; X2 es F o V; X3 es S, N o G; y X4 es D o N;

(b) una secuencia de CDR2 que comprende la fórmula:

I S X5 S G X6 X7 I (SEQ ID NO: 33)

20 donde X5 es S o N; X6 es D, S, G o N; y X7 es T o I; y

(c) una secuencia de CDR3 que comprende la secuencia ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20).

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están presentes en un marco humano de VH.

25 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es multiespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada es biespecífico. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada se une a IL2RB e IL2RG.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada comprende además una
30 región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada no contiene una secuencia CH1. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende
35 una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende

una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada funciona como un agonista beta/gamma de receptor de IL2.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo

cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

5 una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y una
10 secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias
15 de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos
20 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 11, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con
30 una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3)
35 F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5)

Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ

ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 53 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 61.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

5 En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

10 Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

15 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

25 En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende

30 SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al

35 menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente

95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una

mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 62 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 63.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M (por ejemplo, de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a

aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad

de secuencia a SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista
 5 biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con
 10 una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3)
 15 F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización
 20 comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido
 25 Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R
 30 en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D

y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 64 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 65.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de

aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una Kd de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una Kd de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una Kd de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas

modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

5 En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena
10 pesada comprende SEQ ID NO: 14, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas
15 modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de
20 heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T
25 en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C
30 en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K
35 en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K

en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 66 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 67.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

- 5 una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende: una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

- En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 24.

- En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

- En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización

comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende

un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 34 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un T_{agg} de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-6} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-8} M; de aproximadamente 10^{-11} M a aproximadamente 10^{-9} M; de aproximadamente 10^{-10} M a aproximadamente 10^{-9} M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la Kd se mide de acuerdo con un método descrito en los
5 ejemplos en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico, que comprende:

una primera región variable de cadena pesada que se une a IL2RB, que comprende:
una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y una
10 secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8; y

una segunda región variable de cadena pesada que se une a IL2RG, que comprende:
una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19; y una
secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera región
15 variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la segunda región variable de cadena pesada están presentes en un marco humano de VH. En algunas modalidades, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en la primera y segunda regiones variables de cadena pesada están presentes en los marcos humanos de VH.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada tiene al menos
20 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % (por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, la primera región variable de cadena
25 pesada comprende SEQ ID NO: 12, y la segunda región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región Fc variante. En algunas
30 modalidades, la región Fc variante posee al menos aproximadamente 80 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %) de homología con una región Fc de secuencia nativa.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende alteraciones de
35 heterodimerización. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización

comprenden sustituciones de botón y ojal (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; o 9) T366W en un polipéptido de la Fc y T366S, L368A e Y407V en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones que crean nuevos puentes de disulfuro (por ejemplo, en una región Fc de IgG1 variante, 1) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 2) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; 3) Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; 4) L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; 5) T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o 6) D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra). En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización comprenden sustituciones de pares de carga (por ejemplo, 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; o 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc silenciada. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende la sustitución de uno o más (por ejemplo, dos o más) de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una sustitución que altera la glicosilación. En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende una mutación sin efector (por ejemplo, una mutación N297A, N297G, DANA (D265A+N297A) o una mutación DANG (D265A+N297G) en la región CH2). En algunas modalidades, la región Fc silenciada comprende mutaciones de K322A y L234A/L235A.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende además una secuencia de región constante de cadena pesada en la ausencia de una secuencia CH1. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada

anti-IL2R agonista biespecífico comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 54). En algunas modalidades, la región bisagra comprende una secuencia de región bisagra de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 56). En algunas modalidades, el dominio CH2 comprende un dominio CH2 de IgG4 humana variante que comprende una mutación F234A, una mutación L235A o tanto una mutación F234A como una mutación L235A. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W. En algunas modalidades, el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, L368A y una mutación Y407V.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico comprende un primer polipéptido que comprende SEQ ID NO: 36 y un segundo polipéptido que comprende SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una T_m de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C y un Tagg de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2R con una K_d de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M (por ejemplo, de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻⁶ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻⁹ M a aproximadamente 10⁻⁸ M; de aproximadamente 10⁻¹¹ M a aproximadamente 10⁻⁹ M; de aproximadamente 10⁻¹⁰ M a aproximadamente 10⁻⁹ M).

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 2.5 x 10⁻⁷ M.

En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

5 En algunas modalidades, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico tiene una afinidad por IL2RB con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 2.5×10^{-7} M y una afinidad por IL2RG con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 2.5×10^{-8} M.

10 En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide usando un instrumento ForteBio Octet Qk384 que comprende un sensor de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005) en modo cinético. En algunas modalidades, la K_d se mide de acuerdo con un método descrito en los ejemplos en la presente.

15 Los aspectos de la divulgación incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen polinucleótidos que codifican para un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente.

20 Los aspectos de la divulgación incluyen vectores que comprenden un polinucleótido como se describe en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen células que comprenden los vectores como se describen en la presente.

25 Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para producir un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente, los métodos que comprenden cultivar una célula como se describe en la presente bajo condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo, y aislar el anticuerpo de la célula y/o un medio de cultivo celular en el cual se cultiva la célula.

30 Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para elaborar un anticuerpo como se describe en la presente, los métodos que comprenden inmunizar un animal UniRat® con IL2R e identificar secuencias de cadena pesada de unión a IL2R.

Los aspectos de la divulgación incluyen kits para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad, que comprenden un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se

describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente, e instrucciones de uso.

En algunas modalidades, un kit comprende además al menos un reactivo adicional. En algunas modalidades, el al menos un reactivo adicional comprende un fármaco
5 quimioterapéutico.

Los aspectos de la divulgación incluyen métodos de tratamiento, que comprenden administrar a un individuo en necesidad una dosis efectiva de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista
10 biespecífico) como se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen el uso de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente en la preparación de un medicamento para el
15 tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer líquido, tal como, por ejemplo, mieloma múltiple o leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el
20 cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma de células renales, melanoma, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como
25 se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente, para uso en terapia en un individuo en necesidad.

Los aspectos de la divulgación incluyen un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente,
30 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un individuo en necesidad. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer líquido, tal como, por ejemplo, mieloma múltiple o leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer de
35 tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma de células renales, melanoma,

cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.

Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para el tratamiento de un cáncer, que comprenden administrar a un sujeto con el cáncer un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer líquido, tal como, por ejemplo, mieloma múltiple o leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma de células renales, melanoma, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.

Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria, los métodos que comprenden poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente.

Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria, el método que comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo solo de cadena pesada; un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R agonista biespecífico) como se describe en la presente, o una composición farmacéutica como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una célula T CD4+, una célula T CD8+ y una célula asesina natural (NK).

Estos y otros aspectos se explicarán adicionalmente en el resto de la divulgación, incluso en los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1 es una tabla que resume la cinética de unión de las construcciones de anticuerpo biespecífico listadas con respecto a IL2RB e IL2RG de cynomolgus y humano.

FIGURA 2, paneles A-C, son una serie de tablas de mapa de calor que representan las veces de inducción de STAT5 fosforilado (pSTAT5) en células T CD8+ de PBMC humanas tratadas con: UniAbs® biespecíficos anti-IL2Rβ/γ (panel A); UniAbs® mono-específicos anti-IL2Rβ y anti-IL2Rγ en una mezcla 1:1 o como agentes individuales (panel B); o IL-2 como control

(panel C) a 50 nM durante 1 hora. Los niveles de pSTAT5 se determinaron por citometría de flujo y se reportaron como intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) sobre la gMFI de células no estimuladas.

FIGURA 3, paneles A-C, son una serie de gráficas que muestran la unión celular del tipo de célula indicado como una función de la concentración para las construcciones de anticuerpos biespecíficos representadas. La unión celular se determinó por citometría de flujo y se reportó como intensidad fluorescente media geométrica (gMFI) sobre la gMFI de células teñidas solo con anticuerpo de detección secundario.

FIGURA 4, paneles A-E, son una serie de gráficas que muestran las curvas de dosis de fosforilación de STAT5 en PBMC humanas y de cyno como una función de la concentración para las construcciones de anticuerpos biespecíficos representadas y las moléculas de control (IL-2 y variante de IL-2). Los niveles de pSTAT5 se determinaron por citometría de flujo y se reportaron como un porcentaje del tipo de célula indicado.

FIGURA 5, paneles A-D, son una serie de gráficas que muestran la proliferación (curvas de dosis de Ki67) en las células humanas indicadas como una función de la concentración para las construcciones de anticuerpos biespecíficos representadas y las moléculas de control (IL-2 y variante de IL-2). Los niveles de Ki67 se determinaron por citometría de flujo y se reportaron como un porcentaje del tipo de célula indicado.

FIGURA 6, paneles A-D, son una serie de gráficas que muestran la secreción de citocinas en sangre entera humana como una función de la concentración para las construcciones de anticuerpos biespecíficos representadas y las moléculas de control (IL-2).

FIGURA 7, paneles A-B, proporcionan datos de internalización celular para las construcciones de anticuerpos biespecíficos indicadas. El panel A representa la internalización de los UniAb anti-IL2R β / γ indicados por células T CD8⁺ de PBMC humanas, como una función del tiempo. El panel B representa estos datos en formato tabular. Los niveles de superficie de UniAb se detectaron por citometría de flujo y se reportaron con respecto a las células que no se habían permitido internalizar. Las semividas observadas variaron de 0.27 horas a 0.81 horas. Como se observa aquí, la internalización dependió potencialmente parcialmente del brazo anti-IL2RG específico del anticuerpo biespecífico, ya que las moléculas que comprenden la secuencia de unión a IL2RG_F16B se internalizaron más rápido y en mayor grado que las moléculas que contienen diferentes secuencias de unión anti-IL2RG.

FIGURA 8, paneles A-B, proporcionan datos de PK del modelo de ratón en formatos gráfico (panel A) y tabular (panel B). Se administró a los ratones BALB/c (n = 3 por grupo por punto de tiempo) 1 mg/kg de los UniAb anti-IL2R β / γ indicados por inyección en vena de la cola. El suero se recolectó en 6 puntos de tiempo durante dos semanas y se probaron juntos por

ELISA para IgG4 humana. Los resultados se muestran como una función del tiempo (panel A) o en formato tabular (panel B).

FIGURA 9 es una tabla que resume varias propiedades de las construcciones de anticuerpo biespecífico indicadas. Todas las construcciones se expresaron en un sistema de expresión ExpiCHO y se purificaron en 2 pasos. La estabilidad se determinó con base en el porcentaje de agregación por SE-HPLC después del esfuerzo térmico. T_m y Tagg se midieron usando la plataforma UNcle. Para los experimentos de SE-HPLC, se corrieron 20 µg de proteína en una columna TSK gel G3000 de 5 µm.

FIGURA 10, paneles A-C, proporcionan datos resumidos de un modelo de ratón de GVHD. Los ratones NSG irradiados (5 por grupo de tratamiento) se injertaron con 20 millones de PBMC humanas cada uno. Entonces, los animales se trataron con vehículo solo (100 µl), 22 µg de rhIL-2 diariamente o una de las dos construcciones de anticuerpo biespecífico indicadas a 1 mg/kg en 100 µl dos veces por semana hasta el sacrificio (20 % de pérdida de peso corporal). El panel A proporciona una descripción general del modelo de ratón de GVHD y el esquema de dosificación posterior. El panel B muestra los pesos corporales de animales como una función del tiempo para los grupos experimentales indicados. El panel C representa un análisis de células de bazo de los ratones en el estudio, cosechadas después del día 5 de tratamiento. La proliferación de células T CD8⁺ y células T CD4⁺ se comparó entre los 4 grupos de tratamiento al medir la tinción de CFSE en las diferentes poblaciones de linfocitos. Las dos construcciones de anticuerpos biespecíficos probadas (IL2RB_F09C**IL2RG_F16A (BsAb-1) e IL2RB_F09G**IL2RG_F16B (BsAb-2)) mostraron células T CD8⁺ significativamente más proliferantes en comparación con rhIL-2 y el control de vehículo. Las células T CD4⁺ se expandieron en menor medida; sin embargo, se observó un incremento significativo en células T CD4⁺ proliferantes en ratones tratados con IL2RB_F09G **IL2RG_F16B (BsAb-2) en comparación con el control de vehículo (panel C). Los datos demuestran que los agonistas de receptor de citocinas promueven la activación y proliferación de efector inmunitario *in vivo* y aceleran la GVHD en ratones NSG injertados con huPBMC a una velocidad similar a los controles de citocinas.

FIGURA 11, paneles A-J, son una serie de gráficas que resumen los datos farmacodinámicos (PD) *in vivo* de un estudio en monos cynomolgus no de GLP. Los paneles A-E representan los porcentajes de los tipos de células indicados como una función del tiempo después de la dosis. Los paneles F-J representan la concentración de los tipos de células indicados por µl de sangre (x10⁵) como una función del tiempo después de la dosis. El panel K muestra la relación de células T CD8⁺ a células T CD4⁺ como una función del tiempo después de la dosis.

FIGURA 12, el panel A es una gráfica que muestra la concentración en suero como una función del tiempo (días) para el anticuerpo biespecífico indicado. El panel B es una tabla que muestra información de molécula, dosis y semivida ($t_{1/2}$).

FIGURA 13 es una gráfica que muestra el peso corporal (%) como una función del tiempo (día de estudio) para animales en un modelo de GVHD acelerada.

FIGURA 14 es una gráfica que muestra la probabilidad de supervivencia como una función del tiempo (día de estudio) para animales en un modelo de GVHD acelerada.

FIGURA 15, paneles A-C, son una recolección de gráficas que muestran la proliferación celular del tipo de célula indicado, medida a los 5 días después del tratamiento, y separada en grupos de tratamiento. El panel A muestra resultados para células T CD8+, el panel B muestra resultados para células T CD4+ y el panel C muestra resultados para células NK.

FIGURA 16, paneles A-L, son una recolección de gráficas que muestran la proliferación celular y la concentración celular absoluta para los tipos de células indicados bajo las condiciones de dosificación indicadas, como una función del tiempo.

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de anticuerpos en la presente se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar un entendimiento más profundo de la presente divulgación. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente divulgación se puede practicar sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y

procedimientos bien conocidos, conocidos por aquellos expertos en la técnica a fin de evitar oscurecer la divulgación.

Todas las referencias citadas a lo largo de la divulgación, incluidas las solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan por referencia en la presente en su totalidad. Cuando
5 existe alguna discrepancia en la definición entre las referencias citadas y las definiciones proporcionadas en la presente, prevalecen las definiciones proporcionadas en la presente.

Definiciones:

En algunas modalidades, “aproximadamente”, cuando se usa en conexión con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la
10 variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza de 95 % para la media) o ± 10 % del valor indicado, lo que sea mayor. En algunas modalidades, los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente
15 lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor señalado o intermedio en ese intervalo señalado, se abarca dentro de la divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños, también abarcados dentro de la divulgación, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Donde el intervalo señalado incluye uno o
20 ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de aquellos límites incluidos también se incluyen en la divulgación.

Por “que comprende”, se quiere decir que los elementos citados se requieren en la composición/método/kit, pero se pueden incluir otros elementos para formar la composición/método/kit, etc., dentro del alcance de la reivindicación o modalidad.

25 Por “que consiste esencialmente en”, se entiende una limitación del alcance de la composición o método descrito a los materiales o pasos especificados que no afectan materialmente la o las características básicas y novedosas de la presente divulgación.

Por “que consiste en”, se quiere decir la exclusión de la composición, método o kit de cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en la reivindicación o modalidad.

30 Los residuos de anticuerpos en la presente se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de EU. El sistema de numeración de Kabat se usa en general cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,
35 Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración de EU” o “índice de EU” se usa en general

cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice de EU reportado en Kabat *et al.*, *supra*). El “índice de EU como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de anticuerpos significan la numeración de residuos por el sistema de numeración de EU.

Los anticuerpos, también referidos como inmunoglobulinas, comprenden convencionalmente al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio amino terminal de las cadenas pesada y ligera es variable en secuencia, y por lo tanto se refiere comúnmente como un dominio de región variable, o un dominio variable pesado (VH) o variable ligero (VL). Los dos dominios se asocian convencionalmente para formar una región de unión específica, aunque como se analizará aquí, la unión específica también se puede obtener con secuencias variables solo de cadena pesada, y una variedad de configuraciones no naturales de anticuerpos se conocen y se usan en la técnica.

Una molécula de unión a antígeno o anticuerpo “funcional” o “biológicamente activo” (incluidos, por ejemplo, anticuerpos solo de cadena pesada y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), así como moléculas tipo anticuerpo de tres cadenas (TCA, descritas en la presente)) es uno capaz de ejercer una o más de sus actividades naturales en eventos estructurales, reguladores, bioquímicos o biofísicos. Por ejemplo, un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, puede tener la capacidad de unirse específicamente a un antígeno y la unión a su vez puede provocar o alterar un evento celular o molecular tal como transducción de señal o actividad enzimática. Un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, también puede bloquear la activación de ligando de un receptor o actuar como un agonista o antagonista. La capacidad de un anticuerpo u otra molécula de unión, por ejemplo, un TCA, para ejercer una o más de sus actividades naturales depende de varios factores, incluido el plegamiento y montaje adecuados de las cadenas de polipéptidos.

El término “anticuerpo” en la presente se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, monómeros, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos solo de cadena pesada, anticuerpos de tres cadenas, TCA, Fv de cadena individual (scFv), nanocuerpos, etc., y también incluye fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861. Los

anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

Por ejemplo, el término “anticuerpo” puede hacer referencia a una cadena pesada de longitud completa, una cadena ligera de longitud completa, una molécula de inmunoglobulina intacta o una porción inmunológicamente activa de cualquiera de estos polipéptidos, es decir, un polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, estas dianas incluyen, pero no se limitan a, una célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina divulgada en la presente puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina, incluidas subclases modificadas con porciones Fc alteradas que proporcionan una actividad celular efectora reducida o mejorada. Las cadenas ligeras de los presentes anticuerpos pueden ser cadenas ligeras kappa (Vkappa) o cadenas ligeras lambda (Vlambda). Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, la inmunoglobulina es de origen mayormente humano.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se presentan de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen contra un sitio antigénico individual. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente divulgación se pueden elaborar por el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, y también se pueden elaborar por ejemplo, mediante métodos de producción de proteínas recombinantes (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4,816,567).

El término “variable”, como se usa en relación con anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables de anticuerpo difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se llaman regiones marco (FR).

Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen conjuntamente en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver, por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no se implican directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diferentes funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término “región hipervariable” cuando se usa en la presente, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable en general comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” residuos 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). En algunas modalidades, “CDR” significa una región determinante de complementariedad de un anticuerpo como se define en Lefranc, MP *et al.*, IMGT, the International ImMunoGeneTics database, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Los residuos de “región marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable/CDR como se define en la presente.

Las designaciones de CDR de ejemplo se muestran en la presente; sin embargo, un experto en la técnica entenderá que varias definiciones de las CDR se usan comúnmente, incluida la definición de Kabat (ver Zhao *et al.* “A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.” *Mol Immunol.* 2010;47:694–700), que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente usada. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural (Chothia *et al.* “Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.” *Nature.* 1989; 342:877–883). Las definiciones alternativas de CDR de interés incluyen, sin limitación, aquellas descritas por Honegger, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool.” *J Mol Biol.* 2001;309:657–670; Ofra *et al.* “Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-

cell epitopes.” *J Immunol.* 2008;181:6230–6235; Almagro “Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires.” *J Mol Recognit.* 2004;17:132–143; y Padlan et al. “Identification of specificity-determining residues in antibodies.” *Faseb J.* 1995;9:133–139., cada una de las cuales se incorpora específicamente en la presente por referencia.

Los términos “anticuerpo solo de cadena pesada” y “anticuerpo de cadena pesada” se usan indistintamente en la presente y se refieren, en el sentido más amplio, a anticuerpos, o una o más porciones de un anticuerpo, por ejemplo, uno o más brazos de un anticuerpo, que carecen de la cadena ligera de un anticuerpo convencional (es decir, un “anticuerpo de cadena pesada” puede consistir en una porción aislada de un anticuerpo o un formato de anticuerpo diferente de un anticuerpo convencional que carece de una cadena ligera). Los términos incluyen específicamente, sin limitación, anticuerpos homodiméricos que comprenden el dominio de unión a antígeno VH y los dominios constantes CH2 y CH3, en la ausencia del dominio CH1; variantes funcionales (de unión a antígeno) de estos anticuerpos, variantes VH solubles, Ig-NAR que comprende un homodímero de un dominio variable (V-NAR) y cinco dominios constantes tipo C (C-NAR) y fragmentos funcionales de los mismos; y anticuerpos de dominio individual solubles (por ejemplo, UniDabs®). En una modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno de región variable compuesto de marco 1, CDR1, marco 2, CDR2, marco 3, CDR3 y marco 4. En otra modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y dominios CH2 y CH3. En otra modalidad, un anticuerpo solo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH2. En una modalidad adicional, un anticuerpo solo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH3. También se incluyen en la presente anticuerpos solo de cadena pesada en los cuales el dominio CH2 y/o CH3 está truncado. En una modalidad adicional, una cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4) pero sin región bisagra. Un anticuerpo solo de cadena pesada puede estar en la forma de un dímero, en el cual dos cadenas pesadas se unen por disulfuro o de otro modo, covalentemente o no covalentemente, unidas entre sí. El anticuerpo solo de cadena pesada puede pertenecer a la subclase de IgG, pero también se incluyen en la presente anticuerpos que pertenecen a otras subclases, tal como subclase IgM, IgA, IgD e IgE. En una modalidad particular, un anticuerpo de cadena pesada puede pertenecer al subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, por ejemplo, el subtipo IgG1 o IgG4. En una modalidad, el anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1 o IgG4,

en donde uno o más de los dominios CH se modifican para alterar una función efectora del anticuerpo. En una modalidad, un anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG4, en donde uno o más de los dominios CH se modifican para alterar una función efectora del anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1, en donde uno o más de los dominios CH se modifican para alterar una función efectora del anticuerpo. Las modificaciones de los dominios CH que alteran la función efectora se describen adicionalmente en la presente. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos de cadena pesada se describen, por ejemplo, en WO2018/039180, la divulgación de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, los anticuerpos solo de cadena pesada descritos en la presente se usan como un dominio de unión (direccionamiento) de un receptor de antígeno quimérico (CAR). La definición incluye específicamente anticuerpos solo de cadena pesada humana producidos por ratas transgénicas de inmunoglobulina humana (por ejemplo, UniRat®), tal como, por ejemplo, UniAbs®. Las regiones variables (VH) de UniAbs® se llaman UniDabs® y son bloques de construcción versátiles que se pueden enlazar a regiones Fc o albúmina sérica para el desarrollo de productos terapéuticos novedosos con multiespecificidad, potencia incrementada y semivida prolongada. Puesto que los UniAbs® homodiméricos carecen de una cadena ligera y, por lo tanto, de un dominio VL, el antígeno se reconoce por un dominio individual, es decir, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada (VH o VHH).

Una “cadena de anticuerpo intacta”, como se usa en la presente, es una que comprende una región variable de longitud completa y una región constante de longitud completa (Fc). Un anticuerpo “convencional” intacto comprende una cadena ligera intacta y una cadena pesada intacta, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, bisagra, CH2 y CH3 para IgG secretada. Otros isotipos, tal como IgM o IgA pueden tener diferentes dominios CH. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y disminución de forma regulada de receptores de superficie celular. Las variantes de región constante incluyen aquellas que alteran el perfil efector, unión a receptores Fc y similares.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del Fc (dominio constante) de sus cadenas pesadas, los anticuerpos y diferentes proteínas de unión a antígeno se pueden proporcionar como diferentes clases. Hay cinco clases principales de regiones Fc de cadena pesada: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de Fc que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se pueden referenciar como α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. Las formas de Ig incluyen modificaciones de bisagra o formas sin bisagra. Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos, llamados κ (kappa) y λ (lambda), con base en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Los anticuerpos de acuerdo con modalidades de la divulgación pueden comprender secuencias de cadena ligera kappa o secuencias de cadena ligera lambda.

Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos no limitantes de funciones efectoras incluyen unión a C1q; CDC; unión a receptor Fc; ADCC; ADCP; disminución de forma regulada de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B), etc. Estas funciones efectoras en general requieren que la región Fc interactúe con un receptor, por ejemplo, los receptores Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB y el receptor FcRn de baja afinidad; y se pueden valorar usando diferentes ensayos conocidos en la técnica. Un Fc “muerto” o “silenciado” es uno que se ha mutado para retener la actividad con respecto a, por ejemplo, prolongar la semivida en suero, pero que no activa un receptor Fc de alta afinidad, o que tiene una afinidad reducida por un receptor Fc.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen, por ejemplo, una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes que se presentan de manera natural de las mismas.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, por ejemplo, una o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más) sustituciones de aminoácidos. De manera ilustrativa, en algunas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa

o con la región Fc de un polipéptido de origen, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido de origen. En algunas modalidades, la región Fc variante en la presente poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido de origen, por ejemplo, al menos aproximadamente 85 % de homología con la misma, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 % de homología con la misma, por ejemplo, al menos aproximadamente 99 % de homología con la misma.

Como se usa en la presente, “alteraciones de heterodimerización” se refiere a alteraciones en las cadenas A y B de una región Fc (es decir, las dos cadenas que comprenden la región Fc, en donde una cadena se refiere en la presente como la cadena “A” y la otra se refiere en la presente como la cadena “B”) que facilitan la formación de regiones Fc heterodiméricas, es decir, regiones Fc en las cuales la cadena A y la cadena B de la región Fc no tienen secuencias de aminoácidos idénticas. En algunas modalidades, las alteraciones de heterodimerización pueden ser asimétricas, es decir, una cadena A que tiene una cierta alteración puede emparejarse con una cadena B que tiene una alteración diferente. Estas alteraciones facilitan la heterodimerización y desfavorecen la homodimerización. Si se han formado heterodímeros u homodímeros se puede valorar, por ejemplo, por diferencias de tamaño como se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida en situaciones donde una cadena de polipéptido es un Fc ficticio y la otra es un scFv-Fc. Un ejemplo no limitante de estas alteraciones de heterodimerización emparejadas son las llamadas sustituciones de “botón y ojales”. Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 7,695,936 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0078385. Como se usa en la presente, una región Fc que comprende un par de sustituciones de botones y ojales, comprende una sustitución en la cadena A y otra en la cadena B. Por ejemplo, se ha encontrado que las siguientes sustituciones de botones y ojales en las cadenas A y B de una región Fc de IgG1 incrementan la formación de heterodímeros en comparación con la encontrada con cadenas A y B no modificadas y se pueden emplear en modalidades no limitantes de esta divulgación: 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; y 9) T366W en un polipéptido del Fc y T366S, L368A e Y407V en el otro. De manera alternativa o además de estas alteraciones, las sustituciones que crean nuevos

puentes de disulfuro pueden facilitar la formación de heterodímeros. Ver, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0078385. Estas alteraciones en una región Fc de IgG1 incluyen, pero no se limitan a, las siguientes sustituciones: Y349C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E356C en la otra; Y349C en una cadena de polipéptido Fc y E357C en la otra; L351C en una cadena de polipéptido Fc y S354C en la otra; T394C en una cadena de polipéptido Fc y E397C en la otra; o D399C en una cadena de polipéptido Fc y K392C en la otra. Adicionalmente o de manera alternativa, las sustituciones que cambian la carga de uno o más residuos, por ejemplo, en la interfase CH3-CH3, pueden mejorar la formación de heterodímeros, como se describe, por ejemplo, en WO 2009/089004, que se incorpora por referencia en la presente. Estas sustituciones se refieren en la presente como “sustituciones de pares de carga”, y una región Fc que comprende un par de sustituciones de pares de carga comprende una sustitución en la cadena A y una sustitución diferente en la cadena B. Los ejemplos no limitantes de sustituciones de pares de carga incluyen lo siguiente: 1) K409D o K409E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 2) K392D o K392E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 3) K439D o K439E en una cadena más E356K o E356R en la otra; y 4) K370D o K370E en una cadena más E357K o E357R en la otra. Además, las sustituciones R355D, R355E, K360D o K360R en ambas cadenas pueden estabilizar heterodímeros cuando se usan con otras alteraciones de heterodimerización. Las sustituciones de pares de carga específicos se pueden usar ya sea solas o con otras sustituciones de pares de carga. Los ejemplos específicos de pares individuales de sustituciones de pares de carga y combinaciones de los mismos incluyen lo siguiente: 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; y 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra. Se puede usar cualquiera de estas alteraciones de heterodimerización en polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes como se describe en la presente.

En algunas modalidades no limitantes, las secuencias Fc variantes pueden incluir tres sustituciones de aminoácidos en la región CH2 para reducir la unión de FcγRI en las posiciones 234, 235 y 237 de índice de EU (ver Duncan et al., (1988) *Nature* 332:563). Dos sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a C1q de complemento en las posiciones 330 y 331 de índice de EU reducen la fijación de complemento (ver Tao et al., *J. Exp. Med.* 178:661 (1993) y Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991)). La sustitución en residuos de IgG1 o IgG2 humana en las posiciones 233-236 y residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reduce en gran medida ADCC y CDC (ver, por ejemplo, Armour KL. et al., 1999 *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24; y Shields R.L. et al., 2001. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604). La secuencia de aminoácidos Fc de IgG4 humana (UniProtKB No. P01861) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 76. La IgG1 silenciada se describe, por ejemplo, en Boesch, A.W., et al., "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions." *MAbs*, 2014. 6(4): p. 915-27, la divulgación de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Son posibles otras variantes de Fc, incluida, sin limitación, una en la cual se elimina una región capaz de formar un enlace de disulfuro, o en la cual se eliminan ciertos residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una Fc nativa, o se adiciona un residuo de metionina a la misma. Por lo tanto, en algunas modalidades, una o más porciones Fc de un anticuerpo pueden comprender una o más mutaciones en la región bisagra para eliminar el enlace de disulfuro. En aun otra modalidad, la región bisagra de un Fc se puede remover por completo. En aun otra modalidad, un anticuerpo puede comprender una variante de Fc.

Además, se puede construir una variante de Fc para remover o reducir sustancialmente las funciones efectoras por sustitución (mutación), delección o adición de residuos de aminoácidos para efectuar la unión a complemento o la unión a receptor Fc. Por ejemplo, y no a manera de limitación, una delección puede presentarse en un sitio de unión a complemento, tal como un sitio de unión a C1q. Las técnicas para preparar estos derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina se divulgan en la publicación de patente internacional No. WO 97/34631 y WO 96/32478. Además, el dominio Fc se puede modificar por fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen, pero no se limitan a, aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración de EU (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 6,737,056). En algunas modalidades, las regiones Fc variantes con función efectora reducida comprenden sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327 de acuerdo con la numeración de EU, incluido el llamado mutante Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina de acuerdo con la numeración de EU (es decir,

D265A y N297A de acuerdo con la numeración de EU) (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 7,332,581). En algunas modalidades, la región Fc variante con función efectora reducida comprende las siguientes dos sustituciones de aminoácidos: D265A y N297A.

En algunas modalidades, la función efectora se reduce a través de una mutación en una
 5 región constante que elimina la glicosilación, por ejemplo, una “mutación sin efector”. En algunas modalidades, la mutación sin efector es una mutación N297A o DANA (D265A+N297A) en la región CH2. Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-6604 (2001). En algunas modalidades, la mutación sin efector es una mutación N297G o DANG (D265A+N297G) en la región CH2. En algunas modalidades, la región Fc variante carece de glicosilación en N297, por ejemplo, la
 10 región Fc variante es una región Fc variante que carece de glicosilación en N297 como se describe en la publicación de patente internacional No. WO 2014/153063, que se incorpora por referencia en la presente. De manera alternativa, las mutaciones adicionales que dan por resultado una función efectora reducida o eliminada incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). De manera alternativa, la función efectora se puede reducir o eliminar a través de técnicas de
 15 producción, tal como la expresión en células hospedadoras que no se glicosilan (por ejemplo, *E. coli*) o en células hospedadoras que dan por resultado un patrón de glicosilación alterado que es inefectivo o menos efectivo para promover la función efectora (por ejemplo, Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473 (2003)).

En algunas modalidades, la prolina en la posición 329 (numeración de EU) (P329) de
 20 una región Fc humana tipo silvestre se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido suficientemente grande para destruir la intercalación de prolina dentro de la interfase de receptor Fc/Fcγ, que se forma entre el P329 del Fc y los residuos de triptófano W87 y W110 de FcγRIII (Sondermann et al., *Nature* 406, 267-273 (20 Jul. 2000)). En algunas modalidades adicionales, al menos una sustitución de aminoácidos adicional en la región
 25 variante Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En algunas modalidades, la al menos una sustitución de aminoácidos adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana, todo de acuerdo con la numeración de EU (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 8,969,526, que se incorpora por referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, la región Fc variante tiene P329 de la región Fc de IgG humana
 30 sustituida con glicina, en donde la región Fc variante comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana, y en donde los residuos se numeran de acuerdo con la numeración de EU (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 8,969,526). En algunas

modalidades, la región Fc variante que comprende las sustituciones P329G, L234A y L235A (numeración de EU) exhibe una afinidad reducida por el FcγRIIIA y FcγRIIA humanos.

En algunas modalidades, la región Fc variante comprende una mutación triple: una sustitución de aminoácido en la posición P329, una mutación L234A y L235A de acuerdo con la numeración de EU (P329/LALA) (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 8,969,526).
5 En algunas modalidades, la región Fc variante comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: P329G, L234A y L235A de acuerdo con la numeración de EU.

En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366W, que se puede referir
10 opcionalmente en la presente como una secuencia de botón CH3 de IgG4. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana variante que comprende una mutación T366S, una mutación L368A y una mutación Y407V, que se pueden referir opcionalmente en la presente como una secuencia de ojal CH3 de IgG4. Las mutaciones CH3 de IgG4 descritas en la presente se pueden utilizar de cualquier manera
15 adecuada para colocar un “botón” en una primera región constante de cadena pesada de un primer monómero en un dímero de anticuerpo, y un “ojal” en una segunda región constante de cadena pesada de un segundo monómero en un dímero de anticuerpo, facilitando de este modo el emparejamiento adecuado (heterodimerización) del par deseado de subunidades de polipéptido de cadena pesada en el anticuerpo.

En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A y una mutación T366W (botón).
20 En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG4 humana variante que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A, una mutación T366S, una mutación L368A y una mutación Y407V (ojal).
25

El término “anticuerpo que comprende región Fc” se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante la purificación del
30 anticuerpo o por modificación recombinante del ácido nucleico que codifica para el anticuerpo. Por consiguiente, un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un anticuerpo con o sin K447.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos que comprenden una región variable solo de cadena pesada en una configuración monovalente o bivalente. Como se usa
35 en la presente, el término “configuración monovalente”, como se usa con referencia a un dominio

de región variable solo de cadena pesada, significa que solo está presente un dominio de región variable solo de cadena pesada, que tiene un sitio de unión individual. Por el contrario, el término “configuración bivalente” como se usa con referencia a un dominio de región variable solo de cadena pesada significa que dos dominios de región variable solo de cadena pesada están presentes (cada uno que tiene un sitio de unión individual), y se conectan por una secuencia ligadora. Los ejemplos no limitantes de secuencias ligadoras se analizan adicionalmente en la presente e incluyen, sin limitación, secuencias ligadoras GS de diferentes longitudes. Cuando una región variable solo de cadena pesada está en una configuración bivalente, cada uno de los dos dominios de región variable solo de cadena pesada puede unirse al mismo antígeno, o a diferentes antígenos (por ejemplo, a diferentes epítomos en la misma proteína; a dos proteínas diferentes, etc.). Sin embargo, a menos que se señale específicamente de otro modo, se entiende que una región variable solo de cadena pesada indicada como que está en una “configuración bivalente” contiene dos dominios de región variable solo de cadena pesada idénticos, conectados por una secuencia ligadora, en donde cada uno de los dos dominios de región variable solo de cadena pesada idénticos se une al mismo antígeno diana.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos que tienen configuraciones multiespecíficas, que incluyen, sin limitación, configuraciones biespecíficas, triespecíficas, etc. Se conoce una gran variedad de métodos y configuraciones de proteínas y se usan en anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAB), anticuerpos triespecíficos, etc.

Se han desarrollado diferentes métodos para la producción de anticuerpos artificiales multivalentes por la fusión recombinante de dominios variables de dos o más anticuerpos. En algunas modalidades, un primer y un segundo dominio de unión a antígeno en un polipéptido se conectan por un ligador de polipéptido. Un ejemplo no limitante de este ligador de polipéptido es un ligador GS, que tiene una secuencia de aminoácidos de cuatro residuos de glicina, seguida de un residuo de serina, y en donde la secuencia se repite n veces, donde n es un número entero que varía de 1 a aproximadamente 10 (SEQ ID NO: 68), tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Los ejemplos no limitantes de estos ligadores incluyen GGGGS (SEQ ID NO: 49) ($n = 1$) y GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50) ($n = 2$). También se pueden usar otros ligadores adecuados, y se describen, por ejemplo, en Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 October 15; 65(10): 1357-69, la divulgación de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

El término “molécula tipo anticuerpo de tres cadenas” o “TCA” se usa en la presente para referirse a moléculas tipo anticuerpo que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en tres subunidades de polipéptido, dos de las cuales comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo monoclonal, o fragmentos de unión a antígeno funcionales de estas cadenas de anticuerpo, que comprenden

una región de unión a antígeno y al menos un dominio CH. Este par de cadena pesada/cadena ligera tiene especificidad de unión para un primer antígeno. La tercera subunidad de polipéptido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una porción Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en la ausencia de un dominio CH1, y uno o más dominios de unión a antígeno (por ejemplo, dos dominios de unión a antígeno) que se une a un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno, donde este dominio de unión se deriva de o tiene identidad de secuencia con la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Las partes de esta región variable se pueden codificar por segmentos génicos V_H y/o V_L , segmentos génicos D y J_H , o segmentos génicos J_L . La región variable se puede codificar por segmentos génicos V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L o V_LJ_L reordenados.

Un compuesto de unión a TCA hace uso de un “anticuerpo solo de cadena pesada” o “anticuerpo de cadena pesada” o “polipéptido de cadena pesada” que, como se usa en la presente, significa un anticuerpo de cadena individual que comprende regiones constantes de cadena pesada CH2 y/o CH3 y/o CH4 pero sin dominio CH1. En una modalidad, el anticuerpo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y dominios CH2 y CH3. En otra modalidad, el anticuerpo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH2. En una modalidad adicional, el anticuerpo de cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región bisagra y un dominio CH3. También se incluyen en la presente anticuerpos de cadena pesada en los cuales el dominio CH2 y/o CH3 está truncado. En una modalidad adicional, la cadena pesada se compone de un dominio de unión a antígeno y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4) pero sin región bisagra. El anticuerpo solo de cadena pesada puede estar en la forma de un dímero, en el cual dos cadenas pesadas se unen por disulfuro o de otro modo covalentemente o no covalentemente unidas entre sí, y puede incluir opcionalmente una interfase asimétrica (por ejemplo, una interfase de botones en ojales (KiH)) entre uno o más de los dominios CH para facilitar el emparejamiento adecuado entre las cadenas de polipéptido. El anticuerpo de cadena pesada puede pertenecer a la subclase de IgG, pero también se incluyen en la presente anticuerpos que pertenecen a otras subclases, tal como subclase IgM, IgA, IgD e IgE. En una modalidad particular, el anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en particular el subtipo IgG1 o el subtipo IgG4. Los ejemplos no limitantes de un compuesto de unión a TCA se describen, por ejemplo, en WO2017/223111 y WO2018/052503, las divulgaciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos que comprenden una región variable solo de cadena pesada que se empareja con una región variable de cadena ligera (VL). En algunas modalidades, una región variable de cadena ligera que se empareja con una región variable solo de cadena pesada se refiere como una región variable de “cadena ligera fija”. En ciertas modalidades, un anticuerpo comprende dos regiones variables solo de cadena pesada, cada una de las cuales se empareja con una región variable de cadena ligera fija. En algunas modalidades, una secuencia de región variable de cadena ligera fija se conecta a una secuencia de región constante de cadena ligera para formar un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo de longitud completa. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende dos polipéptidos de cadena pesada de longitud completa y dos polipéptidos de cadena ligera de longitud completa. En ciertas modalidades, los polipéptidos de cadena pesada de longitud completa comprenden diferentes secuencias, en tanto que los polipéptidos de cadena ligera de longitud completa comprenden la misma secuencia (por ejemplo, los dos polipéptidos de cadena ligera de longitud completa son idénticos).

Los anticuerpos de cadena pesada constituyen aproximadamente una cuarta parte de los anticuerpos IgG producidos por los camélidos, por ejemplo, camellos y llamas (Hamers-Casterman C., et al. *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Estos anticuerpos se forman por dos cadenas pesadas pero están desprovistos de cadenas ligeras. Como consecuencia, la parte de unión a antígeno variable se refiere como el dominio VHH, y representa el sitio de unión a antígeno más pequeño que se presenta de manera natural, intacto, que es de solo alrededor de 120 aminoácidos de longitud (Desmyter, A., et al. *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Se pueden generar anticuerpos de cadena pesada con una alta especificidad y afinidad contra una variedad de antígenos a través de la inmunización (van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta*. 1431, 37-46 (1999)), y la porción VHH se puede clonar y expresar fácilmente en levadura (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Sus niveles de expresión, solubilidad y estabilidad son significativamente más altos que los de los fragmentos F(ab) o Fv clásicos (Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). También se ha mostrado que los tiburones tienen un dominio tipo VH individual en sus anticuerpos, denominado VNAR. (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003).)

Los términos “IL2” e “IL-2”, como se usan indistintamente en la presente, se refieren a interleucina-2, que es una molécula de proteína de señalización de citocina de 15.5 a 16 kDa que regula la actividad de ciertas células inmunitarias por la unión a complejos de receptores de IL2 expresados por linfocitos. El término “IL2” incluye una proteína IL2 de cualquier especie animal humana y no humana, y específicamente incluye IL2 humana así como IL2 de mamíferos

no humanos. La secuencia de IL-2 humana (UniProtKB No. P60568) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 41. El término "IL2 humana", como se usa en la presente, incluye cualquier variante, isoforma y homólogos de especies de IL2 humana, independientemente de su fuente o modo de preparación. Por lo tanto, "IL2 humana" incluye IL2 humana expresada de
5 manera natural por células e IL2 expresada en células transfectadas con el gen de IL2 humana.

Los términos "IL2R", "IL-2R", "receptor de IL2" y "receptor de IL-2", como se usan indistintamente en la presente, se refieren en general al complejo de receptor de IL2, que se compone de tres subunidades o cadenas de polipéptidos, a las que se hace referencia como la cadena alfa, A o α , la cadena beta, B o β , y la cadena gamma, G o γ . El término "IL2R" incluye
10 cualquier proteína IL2R o cualquier subunidad del complejo de receptor de IL2, de cualquier especie animal humana y no humana, y específicamente incluye IL2R humana así como IL2R de mamíferos no humanos. El término "IL2R humano", como se usa en la presente, incluye cualquier variante, isoforma y homólogos de especies de IL2R humana, independientemente de su fuente o modo de preparación. Por lo tanto, "IL2R humano" incluye IL2R humana expresada
15 de manera natural por células e IL2R expresada en células transfectadas con el gen de IL2R humana.

El término "IL2RA" también se refiere como CD25, y la secuencia de IL2RA humana (UniProtKB No. P01589) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 38.

El término "IL2RB" también se refiere como CD122, y la secuencia de IL2RB humana
20 (UniProtKB No. P14784) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 39.

El término "IL2RG" IL-2RG también se refiere como CD132, y la secuencia de IL2RG humana (UniProtKB No. P31785) se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 40.

Los términos "anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2R", "anticuerpo solo de cadena pesada de IL2R", "anticuerpo de cadena pesada anti-IL2R" y "anticuerpo de cadena pesada de
25 IL2R" se usan en la presente indistintamente para referirse a un anticuerpo solo de cadena pesada como se definió anteriormente en la presente, que se une inmunoespecíficamente a IL2R, incluido IL2R humano, como se definió anteriormente en la presente. La definición incluye, sin limitación, anticuerpos de cadena pesada humana producidos por animales transgénicos, tal como ratas transgénicas o ratones transgénicos que expresan inmunoglobulina humana,
30 incluidas UniRats® que producen anticuerpos UniAb® anti-IL2R humanos, como se definió anteriormente en la presente.

El término "agonista", como se usa en la presente, se refiere a una molécula que provoca un incremento en una función o actividad en comparación con la misma función o actividad en la ausencia de la molécula. Por lo tanto, un "agonista" de una vía de señalización es una
35 molécula cuya presencia provoca un incremento en una función o actividad de la vía de

señalización. El término “agonizar”, como se usa en la presente, se refiere a provocar un incremento en una función o actividad. En algunas modalidades, la función agonista de un anticuerpo se puede determinar usando un ensayo descrito en la presente.

5 El término “antagonista”, como se usa en la presente, se refiere a una molécula que provoca una disminución en una función o actividad en comparación con la misma función o actividad en la ausencia de la molécula. Por lo tanto, un “antagonista” de una vía de señalización es una molécula cuya presencia provoca una disminución en una función o actividad de la vía de señalización. El término “antagonizar”, como se usa en la presente, se refiere a provocar una disminución en una función o actividad.

10 “Por ciento (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir separaciones, si es necesario, para lograr el máximo por ciento de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna
15 sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diferentes maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando software de computadora públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros
20 apropiados para alinear secuencias, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para propósitos en la presente, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de computadora de comparación de secuencia ALIGN-2.

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un
25 componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas modalidades, el anticuerpo se purificará (1) a más de 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, por ejemplo, más de 99 % en peso, (2) a un grado suficiente
30 para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna por el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, por ejemplo, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin
35 embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos un paso de purificación.

Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos tienen más de una especificidad de unión. El término “multiespecífico” incluye específicamente “biespecífico” y “triespecífico”, así como afinidades de unión específicas independientes de orden superior, tal como especificidad poliepitópica de orden superior, así como anticuerpos tetravalentes y fragmentos de anticuerpo. Los términos “anticuerpo multiespecífico”, “anticuerpo solo de cadena pesada multiespecífico”, “anticuerpo de cadena pesada multiespecífico” y “UniAb® multiespecífico” se usan en la presente en el sentido más amplio y cubren todos los anticuerpos con más de una especificidad de unión. Los anticuerpos anti-IL2R de cadena pesada multiespecíficos de la presente divulgación incluyen específicamente anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a dos o más epítomos no superpuestos en una proteína IL2R, tal como una proteína IL2RA, IL2RB y/o IL2RG humana. Los anticuerpos anti-IL2R de cadena pesada multiespecíficos de la presente divulgación también incluyen específicamente anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítomo en una proteína IL2R, tal como IL2RB humana, y a un epítomo en una proteína diferente, tal como, por ejemplo, una proteína IL2RG, tal como IL2RG humana.

Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos monoespecíficos, que tienen una especificidad de unión. Los anticuerpos monoespecíficos incluyen específicamente anticuerpos que comprenden una especificidad de unión individual, así como anticuerpos que comprenden más de una unidad de unión que tiene la misma especificidad de unión. Los términos “anticuerpo monoespecífico”, “anticuerpo solo de cadena pesada monoespecífico”, “anticuerpo de cadena pesada monoespecífico” y “UniAb® monoespecífico” se usan en la presente en el sentido más amplio y cubren todos los anticuerpos con una especificidad de unión. Los anticuerpos anti-IL2R de cadena pesada monoespecíficos de la presente divulgación incluyen específicamente anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítomo en una proteína IL2R, tal como una proteína IL2R humana, o subunidad de la misma (por ejemplo, una proteína IL2RA, IL2RB o IL2RG humana). Los anticuerpos anti-IL2R de cadena pesada monoespecíficos de la presente divulgación también incluyen específicamente anticuerpos que tienen más de una unidad de unión (por ejemplo, anticuerpos multivalentes) que se unen inmuno-específicamente a un epítomo en una proteína IL2R, tal como IL2R humana. Por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico de acuerdo con modalidades de la divulgación puede incluir una región variable de cadena pesada que comprende dos dominios de unión a antígeno, en donde cada dominio de unión a antígeno se une al mismo epítomo en una proteína IL2R (es decir, una proteína IL2RA, IL2RB o IL2RG).

Un “epítomo” es el sitio en la superficie de una molécula de antígeno al cual se une una molécula de anticuerpo individual. En general, un antígeno tiene varios o muchos epítomos

diferentes y reacciona con muchos anticuerpos diferentes. El término incluye específicamente epítopos lineales y epítopos conformacionales.

“Mapeo de epítopos” es el proceso de identificación de los sitios de unión, o epítopos, de anticuerpos en sus antígenos diana. Los epítopos de anticuerpo pueden ser epítopos lineales o epítopos conformacionales. Los epítopos lineales se forman por una secuencia continua de aminoácidos en una proteína. Los epítopos conformacionales se forman de aminoácidos que son discontinuos en la secuencia de proteína, pero que se unen tras el plegamiento de la proteína en su estructura tridimensional.

“Especificidad poliepitópica” se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en la o las mismas o diferentes dianas. Como se señaló anteriormente, la presente divulgación incluye específicamente anticuerpos de cadena pesada anti-IL2R con especificidades poliepitópicas, es decir, anticuerpos de cadena pesada anti-IL2R que se unen a uno o más epítopos no superpuestos en una primera proteína IL2R, tal como una IL2RB humana; y anticuerpos de cadena pesada anti-IL2R que se unen a uno o más epítopos en una primera proteína IL2R (por ejemplo, una proteína IL2RB) y a un epítipo en una proteína IL2R diferente, tal como, por ejemplo, una proteína IL2RG. El término “epítopos no superpuestos” o “epítopos no competitivos” de un antígeno se define en la presente para significar uno o más epítopos que se reconocen por un miembro de un par de anticuerpos específicos de antígeno pero no el otro miembro. Los pares de anticuerpos, o regiones de unión a antígeno que se dirigen al mismo antígeno en un anticuerpo multiespecífico, que reconocen epítopos no superpuestos, no compiten por la unión a ese antígeno y son capaces de unirse a ese antígeno simultáneamente.

Un anticuerpo se une “esencialmente al mismo epítipo” como un anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítopos idénticos o superpuestos estéricamente. Los métodos más ampliamente usados y rápidos para determinar si dos epítopos se unen a epítopos idénticos o superpuestos estéricamente son ensayos de competición, que se pueden configurar en todos los números de formatos diferentes, usando antígeno etiquetado o anticuerpo etiquetado. Usualmente, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pozos y la capacidad de los anticuerpos no etiquetados para bloquear la unión de los anticuerpos etiquetados se mide usando etiquetas radioactivas o enzimáticas.

El término “valente”, como se usa en la presente, se refiere a una cantidad específica de sitios de unión en una molécula de anticuerpo.

Un anticuerpo “monovalente” tiene un sitio de unión. Por lo tanto, un anticuerpo monovalente también es monoespecífico.

Un anticuerpo “multivalente” tiene dos o más sitios de unión. Por lo tanto, los términos “bivalente”, “trivalente” y “tetraivalente” se refieren a la presencia de dos sitios de unión, tres sitios de unión y cuatro sitios de unión, respectivamente. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la divulgación es al menos bivalente y puede ser trivalente, tetraivalente o de otro modo multivalente. Un anticuerpo bivalente de acuerdo con modalidades de la divulgación puede tener dos sitios de unión al mismo epítipo (es decir, bivalente, monoparatópico) o a dos epítipos diferentes (es decir, bivalente, biparatópico).

Se conoce una gran variedad de métodos y configuraciones de proteínas y se usan para la preparación de anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAB), anticuerpos triespecíficos y similares.

El término “anticuerpo humano”, se usa en la presente para incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos en la presente pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*. El término “anticuerpo humano” incluye específicamente anticuerpos solo de cadena pesada que tienen secuencias de región variable de cadena pesada humana, producidas por animales transgénicos, tal como ratas o ratones transgénicos, en particular UniAbs® producidos por UniRats®, como se definió anteriormente.

Por un “anticuerpo quimérico” o una “inmunoglobulina quimérica” se quiere decir una molécula de inmunoglobulina que comprende secuencias de aminoácidos de al menos dos loci de Ig diferentes, por ejemplo, un anticuerpo transgénico que comprende una porción codificada por un locus de Ig humano y una porción codificada por un locus de Ig de rata. Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos transgénicos con regiones Fc no humanas o regiones Fc artificiales e idiotipos humanos. Estas inmunoglobulinas se pueden aislar de animales de la divulgación que se han modificado para producir estos anticuerpos quiméricos.

Como se usa en la presente, el término “célula efectora” se refiere a una célula inmunitaria que se implica en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas modalidades, una célula efectora tal como una célula asesina natural es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por ejemplo, los monocitos y macrófagos, que expresan FcR, se implican en la aniquilación específica de células diana y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o se unen a células que

presentan antígenos. En algunas modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o célula diana.

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan receptores tal como receptores de células T o FcR y realizan funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en la presente.

El término “célula inmunitaria” se usa en la presente en el sentido más amplio, incluido, sin limitación, células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tal como células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tal como neutrófilos, granulocitos, células cebadas y basófilos.

Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; disminución de forma regulada de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de Estados Unidos No. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). De manera alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede valorar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

“Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en la presencia del complemento. La vía de activación de complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) vuelto complejo con un antígeno cognado. Para valorar la activación de complemento, un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), se puede realizar.

“Afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión individual de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en la presente, “afinidad de unión” se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y en general se puede representar por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por métodos comunes conocidos en la técnica. Los anticuerpos de baja afinidad en general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, en tanto que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos.

Como se usa en la presente, la “Kd” o “valor de Kd” se refiere a una constante de disociación determinada por interferometría de biocapa, usando un instrumento Octet QK384 (Fortebio Inc., Menlo Park, CA) en modo cinético. Por ejemplo, los sensores de Fc anti-ratón se cargan con antígeno fusionado con Fc de ratón y entonces se sumergen en pozos que contienen anticuerpos para medir las tasas de asociación dependientes de concentración (kon). Las tasas de disociación de anticuerpos (koff) se miden en el paso final, donde los sensores se sumergen en pozos que contienen amortiguador solamente. La Kd es la relación de koff/kon. (Para detalles adicionales ver, Concepcion, J, et al., *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(8), 791-800, 2009).

Los términos “tratamiento”, “que trata” y similares se usan en la presente para significar en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o de manera parcial una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se usa en la presente cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se presente en un sujeto, que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. El agente terapéutico se puede administrar antes, durante o después del inicio de

la enfermedad o lesión. El tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos indeseables del paciente, es de particular interés. Este tratamiento se realiza deseablemente antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. La terapia de sujeto se puede administrar durante la etapa sintomática de la enfermedad y en algunos casos, después de la etapa sintomática de la enfermedad.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se propone para una cantidad de principio activo que es necesaria para impartir beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente efectiva” es una cantidad que induce, mejora o de otro modo provoca una mejora en los síntomas patológicos, progresión de enfermedad o condiciones fisiológicas asociadas con una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

El término “mediado por activación de la señalización de IL2R en células inmunitarias” se refiere ampliamente a cualquier enfermedad o trastorno en el cual la vía de señalización de IL2/IL2R se asocia con o se implica con uno o más procesos patológicos que son característicos de la enfermedad o trastorno. Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple), cáncer, enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis) o enfermedades o trastornos asociados con señalización mediada por IL-2 deficiente, proliferación de células T deficiente o disfunción de células T.

Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente en la presente para referirse a un mamífero que se valora para el tratamiento y/o que se está tratando. En una modalidad, el mamífero es un humano. Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” abarcan, sin limitación, individuos que tienen cáncer, individuos con enfermedades autoinmunitarias, con infecciones por patógenos y similares. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para la enfermedad humana, por ejemplo, ratón, rata, etc.

El término “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que se encuentra en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administraría la formulación. Estas formulaciones son estériles. Los excipientes “farmacéuticamente aceptables” (por ejemplo, vehículos, aditivos) son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del principio activo empleado.

Una formulación “estéril” es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas. Una formulación “congelada” es una a una temperatura por debajo de 0 °C.

Una formulación “estable” es una en la cual la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. En algunas modalidades, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica después del almacenamiento. El período de almacenamiento se selecciona en general con base en la vida útil propuesta de la formulación. Diferentes técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), a manera de ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar cualitativamente y/o cuantitativamente en una variedad de formas diferentes, incluida la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, al medir la turbidez y/o por inspección visual); al valorar la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico, enfoque isoeléctrico capilar de imagen (icIEF) o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencia amino-terminal o carboxi-terminal; análisis de espectrometría de masas; análisis de SDS-PAGE para comparar anticuerpo reducido e intacto; análisis de mapa de péptidos (por ejemplo, tríptico o LYS-C); evaluar la actividad biológica o función de unión a antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede implicar uno o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de región bisagra), formación de succinimida, cisteína o cisteínas no emparejadas, extensión de extremo N- terminal, procesamiento de extremo C-terminal, diferencias de glicosilación, etc.

Anticuerpos anti-IL2R

La presente divulgación proporciona diferentes familias de anticuerpos que se unen a IL2R humano. Los aspectos de la divulgación incluyen familias de anticuerpos estrechamente relacionadas cuyos miembros se unen a una subunidad o cadena de IL2R particular, por ejemplo, que se unen a IL2RB o IL2RG, o una combinación de lo mismo.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende secuencias de CDR que tienen las siguientes fórmulas de secuencia. Una X indica un aminoácido variable, que puede, en algunas modalidades, ser el aminoácido específico listado más adelante:

CDR1 (IL2RB_F09)

G G S I S S X1 W (SEQ ID NO: 26)

donde X1 es D o N;

CDR2 (IL2RB_F09)

I X2 H S G S T (SEQ ID NO: 27)

donde X2 es D o S; y

CDR3 (IL2RB_F09)

X3 R G X4 W E L X5 D A F D I (SEQ ID NO: 28)

5 donde:

X3 es G o A;

X4 es S o Q; y

X5 es S o T.

10 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende cualquier combinación de secuencias de CDR1 y CDR2 y CDR3 que comprenden las fórmulas de secuencia de SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente. Los anticuerpos de esta familia se pueden referir en la presente como anticuerpos IL2RB_F09.

15 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende secuencias de CDR que tienen las siguientes fórmulas de secuencia. Una X indica un aminoácido variable, que puede, en algunas modalidades, ser el aminoácido específico listado más adelante:

CDR1 (IL2RB_F18)

G F T F S X1 Y G (SEQ ID NO: 29)

donde X1 es S o T;

CDR2 (IL2RB_F18)

20 I S Y D G S N X2 (SEQ ID NO: 30)

donde X2 es K o R; y

CDR3 (IL2RB_F18)

A R D L D Y D X3 L T G D P V G G F D I (SEQ ID NO: 31)

donde X3 es V o I.

25 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende cualquier combinación de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las fórmulas de secuencia de SEQ ID NO: 29, 30 y 31, respectivamente. Los anticuerpos de esta familia se pueden referir en la presente como anticuerpos IL2RB_F18.

30 Los anticuerpos de acuerdo con modalidades de la divulgación que se unen a IL2RB pueden comprender un conjunto de secuencias de CDR como se define en la presente y se ejemplifica por las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada proporcionadas expuestas en la tabla 1, y las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) expuestas en la tabla 2. Estos anticuerpos proporcionan varios beneficios que contribuyen a la utilidad como uno o más agentes clínicamente terapéuticos. Los anticuerpos incluyen miembros con un

35

intervalo de afinidades de unión, que permite la selección de una secuencia específica con una afinidad de unión deseada.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR únicas de anticuerpo de cadena pesada anti-IL2RB

5	ID de clon No.	ID de familia No.	CDR1	CDR2	CDR3
	387205	IL2RB_F09C	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	GRGSWELSDAFDI (SEQ ID NO: 7)
10	387172	IL2RB_F09G	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	ARGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 8)
	387111	IL2RB_F09K	GGSISSSNW (SEQ ID NO: 2)	ISHSGST (SEQ ID NO: 5)	GRGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 9)
15	388252	IL2RB_F18E	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 3)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 6)	ARDLDYDVLTDGDPVGGFDI (SEQ ID NO: 10)

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada anti-IL2RB

	ID de clon No.	ID de familia No.	Secuencia VH
20	387205	IL2RB_F09C	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSDWWSWVRQ PPGKGLEWIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCGRGSWELSDAFDIRGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
25	387172	IL2RB_F09G	QVQLQESGPGLVKSSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWSWVRQ PPGKGLEWIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCARGSWELTDAFDIRGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 12)
30	387111	IL2RB_F09K	QVQLQESSPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNWWSWVRQ PPGKGLEWIGEISHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLR LSSVTAADTAVYFCGRGSWELTDAFDIRGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)
35	388252	IL2RB_F18E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKEREWAVISYDGSNKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYL EMNSLRAEDTAVYYCARDLDYDVLTDGDPVGGFDI WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 14)

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende secuencias de CDR que tienen las siguientes fórmulas de secuencia. Una X indica un aminoácido variable, que puede, en algunas modalidades, ser el aminoácido específico listado más adelante:

CDR1 (IL2RG_F16)

5 G F X1 X2 X3 X4 Y Y (SEQ ID NO: 32)

donde:

X1 es T o I;

X2 es F o V;

X3 es S, N o G; y

10 X4 es D o N;

CDR2 (IL2RG_F16)

I S X5 S G X6 X7 I (SEQ ID NO: 33)

donde:

X5 es S o N;

15 X6 es D, S, G o N; y

X7 es T o I; y

CDR3 (IL2RG_F16)

ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20).

20 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende cualquier combinación de secuencias de CDR1 y CDR2 y CDR3 que comprenden las fórmulas de secuencia de SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente. Los anticuerpos de esta familia se pueden referir en la presente como anticuerpos IL2RG_F16.

25 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de CDR1 que comprende GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15), una secuencia de CDR2 (IL2RG_F18) que comprende ISSSGTTT (SEQ ID NO: 19) y una secuencia de CDR3 (IL2RG_F18) que comprende ARGAAVAPGFDS (SEQ ID NO: 21). Los anticuerpos de esta familia se pueden referir en la presente como anticuerpos IL2RG_F18.

30 Los anticuerpos de acuerdo con modalidades de la divulgación que se unen a IL2RG comprenden un conjunto de secuencias de CDR como se define en la presente y se ejemplifica por las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada proporcionadas expuestas en la tabla 3, y las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) expuestas en la tabla 4. Esta familia de anticuerpos proporciona varios beneficios que contribuyen a la utilidad como uno o más agentes clínicamente terapéuticos. Los anticuerpos incluyen miembros con un intervalo de afinidades de unión, que permite la selección de una secuencia específica con una afinidad
35 de unión deseada.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo de cadena pesada anti-IL2RG

ID de clon No.	ID de familia No.	CDR1	CDR2	CDR3
363256	IL2RG_F16A	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGDTI (SEQ ID NO: 17)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
363544	IL2RG_F16B	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGSTI (SEQ ID NO: 18)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
388582	IL2RG_F16C	GFTFNDYY (SEQ ID NO: 16)	ISSSGSTI (SEQ ID NO: 18)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
363435	IL2RG_F18A	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGTTT (SEQ ID NO: 19)	ARGAAVAPGFDS (SEQ ID NO: 21)

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de región variable de anticuerpo de cadena pesada anti-IL2RG

ID de clon No.	ID de familia No.	Secuencia VH
363256	IL2RG_F16A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSSISSSGDTIYYADSVQGRFTLSRDNAENSLFLQM NSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 22)
363544	IL2RG_F16B	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 23)
388582	IL2RG_F16C	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNDYYMSWIRQAP GKGLEWVSHISSSGSTIYYADSVKGRFTVSRDNANNNSLYLQM HSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 24)
363435	IL2RG_F18A	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWLRQAP GKELEWVSHISSSGTTTYYADSVGRFTITRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGAAVAPGFDSRGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 25)

Un anticuerpo adecuado se puede seleccionar de aquellos proporcionados en la presente para desarrollo y uso terapéutico u otro, incluido, sin limitación, uso como un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico.

La determinación de la afinidad por una proteína candidata se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica, tal como mediciones de Biacore. Los miembros de las familias de anticuerpos descritas en la presente pueden tener una afinidad por IL2R con una Kd de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-11} , incluido sin limitación: de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-10} ; de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-9} ; de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-8} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-11} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-10} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-9} ; de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} ; de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-10} ; o cualquier valor dentro de estos intervalos.

La selección de afinidad se puede confirmar con una valoración biológica para modular, por ejemplo, agonizar, una actividad biológica de IL2R, incluidos ensayos *in vitro*, modelos preclínicos y ensayos clínicos, así como valoración de toxicidad potencial.

Los miembros de las familias de anticuerpos descritas en la presente tienen reactividad cruzada con la proteína IL2R de macaco *Cynomolgus*, que facilita el uso de macaco *Cynomolgus* como modelo animal para validar, por ejemplo, mecanismo de acción, farmacocinética, toxicología y otros atributos de los anticuerpos descritos en la presente.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de IL2R en la presente comprenden un dominio VH, que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco de VH humano. Las secuencias de CDR se pueden situar, como ejemplo, en la región de alrededor de los residuos de aminoácidos 26-33; 51-58; y 97-116 para CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de región variable de ejemplo proporcionadas expuestas en SEQ ID NO: 11-14 y 22-25. Se entenderá por un experto en la técnica que las secuencias de CDR pueden estar en diferentes posiciones si se selecciona una secuencia marco diferente, aunque en general el orden de las secuencias seguirá siendo el mismo.

En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RB comprende una secuencia de CDR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-3. En una modalidad particular, la secuencia de CDR1 comprende SEQ ID NO: 1. En una modalidad particular, la secuencia de CDR1 comprende SEQ ID NO: 2. En una modalidad particular, la secuencia de CDR1 comprende SEQ ID NO: 3.

En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RB comprende una secuencia de CDR2 de cualquiera de SEQ ID NO: 4-6. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 4. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 5. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 6.

En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RB comprende una secuencia de CDR3 de cualquiera de SEQ ID NO: 7-10. En una modalidad particular, la secuencia de CDR3 comprende SEQ ID NO: 7. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ

ID NO: 8. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 9. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 10.

En una modalidad adicional, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2RB comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7.

En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8.

En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9.

En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10.

En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 11-14 (tabla 2).

En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 11. En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12. En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13. En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, una secuencia de CDR en un anticuerpo anti-IL2RB de la divulgación comprende una o dos sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 o conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en cualquiera de SEQ ID NO: 1-10 (tabla 1).

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) en el cual la secuencia de CDR3 tiene una identidad de secuencia mayor que o igual a 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % a nivel de aminoácidos con una secuencia de CDR3 de cualquiera de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR3 se proporcionan en la tabla 1, y se une a IL2RB.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) en el cual el conjunto completo de las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) tiene

una identidad de secuencia mayor que o igual a ochenta y cinco por ciento (85 %) (por ejemplo, $\geq 90 \%$, $\geq 95 \%$, $\geq 98 \%$, $\geq 99 \%$) a nivel de aminoácidos con las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR se proporcionan en la tabla 1, y se une a IL2RB.

5 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende una secuencia de región variable de cadena pesada con al menos aproximadamente 80 % de identidad, al menos 85 % de identidad, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad, al menos 98 % de identidad o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 11-14 (mostrado en la tabla 2), y se une a IL2RB.

10 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se describe en la presente, emparejada con una secuencia de cadena ligera fija. En algunas modalidades, la cadena ligera fija comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 44, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 45 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 46, en un marco de VL humano. En conjunto, la región VH anti-IL2RB y la región variable de cadena ligera fija tienen afinidad de unión por IL2RB. En algunas
15 modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad a la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47. En
20 algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende además una secuencia de región constante de cadena ligera (CL). En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RB es un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se describe
25 en la presente, que no se empareja con una secuencia de cadena ligera.

En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de CDR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 15-16. En una modalidad particular, la secuencia de CDR1 comprende SEQ ID NO: 15. En una modalidad particular, la secuencia de CDR1 comprende SEQ ID NO: 16.

30 En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de CDR2 de cualquiera de SEQ ID NO: 17-19. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 17. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 18. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 19.

35

En una modalidad particular, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de CDR3 de cualquiera de SEQ ID NO: 20-21. En una modalidad particular, la secuencia de CDR3 comprende SEQ ID NO: 20. En una modalidad particular, la secuencia de CDR2 comprende SEQ ID NO: 21.

5 En una modalidad adicional, un anticuerpo solo de cadena pesada anti-IL2RG comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

 En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RG comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y la secuencia de CDR3
10 de SEQ ID NO: 20.

 En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RG comprende la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

 En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RG comprende la secuencia de
15 CDR1 de SEQ ID NO: 15; la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19; y la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

 En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RG comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22-25 (tabla 4).

20 En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RG comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22. En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 23. En aun una modalidad adicional, un anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24. En aun una modalidad adicional, un
25 anticuerpo anti-IL2RB comprende la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25.

 En algunas modalidades, una secuencia de CDR en un anticuerpo anti-IL2RG de la divulgación comprende una o dos sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 o conjunto de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en cualquiera
30 de SEQ ID NO: 15-21 (tabla 3).

 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) en el cual la secuencia de CDR3 tiene una identidad de secuencia mayor que o igual a 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % a nivel de aminoácidos con una secuencia de CDR3 de cualquiera de los anticuerpos cuyas
35 secuencias de CDR3 se proporcionan en la tabla 3, y se une a IL2RG.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) en el cual el conjunto completo de las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) tiene una identidad de secuencia mayor que o igual a ochenta y cinco por ciento (85 %) (por ejemplo, $\geq 90 \%$, $\geq 95 \%$, $\geq 98 \%$, $\geq 99 \%$) a nivel de aminoácidos con las CDR 1, 2 y 3 (combinadas) de los anticuerpos cuyas secuencias de CDR se proporcionan en la tabla 3, y se une a IL2RG.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de región variable de cadena pesada con al menos aproximadamente 80 % de identidad, al menos 85 % de identidad, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad, al menos 98 % de identidad o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22-25 (mostrado en la tabla 4), y se une a IL2RG.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se describe en la presente, emparejada con una secuencia de cadena ligera fija. En algunas modalidades, la cadena ligera fija comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 44, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 45 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 46, en un marco de VL humano. En conjunto, la región VH anti-IL2RG y la región variable de cadena ligera fija tienen afinidad de unión por IL2RG. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad a la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende además una secuencia de región constante de cadena ligera (CL). En algunas modalidades, una cadena ligera fija comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-IL2RG es un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se describe en la presente, que no se empareja con una secuencia de cadena ligera.

Anticuerpos multiespecíficos

Los aspectos de la divulgación incluyen anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos, que pueden tener cualquiera de las configuraciones analizadas en la presente, incluido, sin limitación, un anticuerpo de cadena pesada bivalente, biespecífico que comprende dos subunidades de polipéptido de cadena pesada no idénticas que se asocian entre sí mediante una interfase asimétrica (por ejemplo, botones en ojales (KiH)). En ciertas modalidades, un anticuerpo de cadena pesada biespecífico bivalente puede comprender dos subunidades de polipéptido de cadena pesada no idénticas que se asocian entre sí mediante

una interfase asimétrica, y opcionalmente puede incluir además dos subunidades de polipéptido de cadena ligera fija idénticas, cada una de las cuales se asocia con una de las dos subunidades de polipéptido de cadena pesada.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende al menos una región variable de cadena pesada que se une a una primera subunidad de IL2R y al menos una región variable de cadena pesada que se une a una segunda subunidad de IL2R. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende al menos una región variable de cadena pesada que se une a IL2RB y al menos una región variable de cadena pesada que se une a IL2RG. En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende además una porción Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en la ausencia de un dominio CH1.

Diferentes formatos de anticuerpos multiespecíficos están dentro del ámbito de la divulgación, incluido, sin limitación, polipéptidos de simple individual, polipéptidos de dos cadenas, polipéptidos de tres cadenas, polipéptidos de cuatro cadenas y múltiplos de los mismos. Los anticuerpos multiespecíficos en la presente incluyen específicamente aquellos que se unen a IL2RB e IL2RG.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende una primera región variable que comprende un miembro de la familia IL2RB_F09, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 27 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 28, y una segunda región variable que comprende un miembro de la familia IL2RG_F16, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 32, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende una primera región variable que comprende un miembro de la familia IL2RB_F09, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 27 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 28, y una segunda región variable que comprende un miembro de la familia IL2RG_F18, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende una primera región variable que comprende un miembro de la familia IL2RB_F18, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 29, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 30 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 31, y una segunda región variable que comprende un miembro de la familia IL2RG_F16, que comprende una secuencia

de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 32, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende una primera región variable que comprende un miembro de la familia IL2RB_F18, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 29, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 30 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 31, y una segunda región variable que comprende un miembro de la familia IL2RG_F18, que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 7, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 2, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 9, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 3, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 10, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una

secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 20.

- 5 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 8, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 15, una secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 21.

La tabla 5 proporciona un resumen de diferentes combinaciones de CDR de anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos de acuerdo con modalidades de la divulgación.

Tabla 5. Anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos, combinaciones de secuencias de CDR

Combinación de ID de familia No.	CDR1	CDR2	CDR3
IL2RB_F09C **	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	GRGSWELSDAFDI (SEQ ID NO: 7)
IL2RG_F16A	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGDTI (SEQ ID NO: 17)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
IL2RB_F09G **	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	ARGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 8)
IL2RG_F16B	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGSTI (SEQ ID NO: 18)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
IL2RB_F09K **	GGSISSSNW (SEQ ID NO: 2)	ISHSGST (SEQ ID NO: 5)	GRGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 9)
IL2RG_F16B	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGSTI (SEQ ID NO: 18)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
IL2RB_F18E **	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 3)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 6)	ARLDYDVLTDGPVGGFDI (SEQ ID NO: 10)
IL2RG_F16A	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGDTI (SEQ ID NO: 17)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
IL2RB_F09G **	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	ARGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 8)

Combinación de ID de familia No.	CDR1	CDR2	CDR3
IL2RG_F16C	GFTFNDYY (SEQ ID NO: 16)	ISSSGSTI (SEQ ID NO: 18)	ARGDAVSITGDY (SEQ ID NO: 20)
IL2RB_F09G **	GGSISSSDW (SEQ ID NO: 1)	IDHSGST (SEQ ID NO: 4)	ARGSWELTDAFDI (SEQ ID NO: 8)
IL2RG_F18A	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 15)	ISSSGTTT (SEQ ID NO: 19)	ARGAAVAPGFDS (SEQ ID NO: 21)

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 11, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región variable que se une a IL2RB, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, y una segunda región variable que se une a IL2RG, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25.

La tabla 6 proporciona un resumen de diferentes combinaciones de regiones variables de cadena pesada de anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos de acuerdo con modalidades de la divulgación.

Tabla 6. Anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos, combinaciones de secuencias de VH

5	Combinación de ID de familia No.	Secuencias VH
10	IL2RB_F09C ** IL2RG_F16A	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSDWWSWVRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCG RGSWELSDAFDIRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11) QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SSISSSGDTIYYADSVQGRFTLSRDNAENSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR GDAVSITGDYRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
15	IL2RB_F09G ** IL2RG_F16B	QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWSWVRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCA RGSWELTDAFDIRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12) QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GDAVSITGDYRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)
20	IL2RB_F09K ** IL2RG_F16B	QVQLQESSPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEW IGEISHSGSTNYPNPSLKSRTISVDKSKNQFSLRLSSVTAADTAVYFCGR GSWELTDAFDIRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13) QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GDAVSITGDYRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)
25	IL2RB_F18E ** IL2RG_F16A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKEREW VAVISYDGSNKYYTDSVKGRTISRDNANKNTLYLEMNSLRAEDTAVYYCA RDLDYDVLTDGPVGGFDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14) QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SSISSSGDTIYYADSVQGRFTLSRDNAENSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR GDAVSITGDYRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
30	IL2RB_F09G ** IL2RG_F16C	QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWSWVRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCA RGSWELTDAFDIRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12)
35		

Combinación de ID de familia No.	Secuencias VH
5	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNDYYMSWIRQAPGKGLEWV SHISSSGSTIYYADSVKGRFTVSRDNANNSLYLQMHSRAEDTAVYYCA RGDAVSITGDYRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
10	IL2RB_F09G ** IL2RG_F18A QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCTVSGGSISSDWWWSVRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTSVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCA RGSWELTDAFDIRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12)
	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWLRQAPGKELEWV SHISSSGTTTYYADSVETRFTITRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GAAVAPGFDSSRGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico incluye un primer y un segundo polipéptido, es decir, una primera y una segunda subunidad de polipéptido, en donde cada polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de cadena pesada. En algunas modalidades, cada uno del primer y segundo polipéptido incluye además una región bisagra, o al menos una porción de una región bisagra, que puede facilitar la formación de al menos un enlace de disulfuro entre el primer y segundo polipéptidos. En algunas modalidades, cada uno del primer y segundo polipéptido incluye además al menos un dominio de región constante de cadena pesada (CH), tal como un dominio CH2 y/o un dominio CH3 y/o un dominio CH4. En ciertas modalidades, el dominio CH carece de un dominio CH1. El dominio de unión a antígeno de cada uno del primer y segundo polipéptidos puede incorporar cualquiera de las secuencias de CDR y/o secuencias de región variable descritas en la presente a fin de impartir capacidad de unión a antígeno en el anticuerpo multiespecífico. Como tal, en ciertas modalidades, cada subunidad de polipéptido en un anticuerpo multiespecífico puede incluir un dominio de unión a antígeno que se une a una subunidad o cadena de IL2R diferente (por ejemplo, IL2RB e IL2RG).

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende un dominio Fc de IgG4 humana variante que comprende una primera secuencia de región constante de cadena pesada que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A y una mutación T366W (botón), y una segunda secuencia de región constante de cadena pesada que comprende una mutación S228P, una mutación F234A, una mutación L235A, una mutación T366S, una mutación L368A y una mutación Y407V (ojal). Esta variante, o dominio Fc de IgG4 modificado evita el intercambio de Fab no deseado, reduce la función efectora del anticuerpo y

también facilita la heterodimerización de las subunidades de polipéptido de cadena pesada para formar el anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, biespecífico).

Los componentes de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente (es decir, secuencias de CDR, secuencias de región variable y secuencias de dominio Fc (por ejemplo, secuencias de dominio bisagra, CH2 y CH3) se pueden combinar de diferentes maneras para generar anticuerpos multiespecíficos que se unen a IL2R, por ejemplo, a IL2RB e IL2RG, y que tienen propiedades beneficiosas, por ejemplo, actividad de función efectora reducida, actividad agonista de IL2R incrementada, etc.

La tabla 7 proporciona las secuencias de secuencias de región Fc de IgG1 e IgG4 humana, así como versiones de estas secuencias que incorporan mutaciones (variantes) adicionales que imparten propiedades deseadas adicionales.

Tabla 7. Secuencias de región Fc de IgG1 e IgG4 humana y variantes de las mismas

Nombre de polipéptido	Secuencia de aminoácidos
IgG1 humana (UniProt No. P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)
IgG4 humana (UniProt No. P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQT YTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD SGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 43)

Nombre de polipéptido	Secuencia de aminoácidos
5 IgG1 humana con mutaciones de silenciamiento (región Fc)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)
15 IgG4 humana con mutaciones de silenciamiento (región Fc)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 52)
20 Región bisagra de IgG4 humana (tipo silvestre)	ESKYGPPCPSCPA (SEQ ID NO: 54)
25 Región bisagra de IgG4 humana (S228P)	ESKYGPPCP <u>P</u> CPA (SEQ ID NO: 55)
30 Secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana (tipo silvestre)	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVDVDSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 56)
35 Secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana (F234A, L235A)	APE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVDVDSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 57)

Nombre de polipéptido	Secuencia de aminoácidos
5 Secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana (tipo silvestre)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 58)
10 Secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana (botón, T366W)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 59)
15 Secuencia de dominio CH3 de IgG4 humana (ojal, T366S, L368A, Y407V)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>S</u> <u>C</u> <u>A</u> VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY <u>S</u> RLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 60)

15 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61.

20 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 62, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63.

25 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 64, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 65.

30 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 66, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67.

35 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 69.

ID NO: 66, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67.

5 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 34, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35.

10 En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende una primera subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RB, en donde la primera subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36, y una segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada que comprende una región variable que se une a IL2RG, en donde la segunda subunidad de polipéptido de cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37.

15 La tabla 8 proporciona un resumen de diferentes combinaciones de secuencias de subunidades de polipéptido de cadena pesada de anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos de acuerdo con modalidades de la divulgación.

20

25

30

35

Tabla 8. Anticuerpos IL2RB x IL2RG biespecíficos, combinaciones de secuencias de polipéptidos de longitud completa

5	Combinación de ID de familia No.	Nombre de polipéptido	Secuencias de longitud completa
10	Ojal IL2RB_F09C **	Ojal de IgG4 IL2RB_F09C	QVQLQESGPGGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSDWWWS WVRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLMSRVTISVD KSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCGRGSWELSDAFDIR GQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 53)
15		Botón de IgG4 IL2RG_F16A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYYMSWI RQAPGKGLEWVSSISSGDTIYYADSVQGRFTLSRDN AENSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQ GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 61)
20	Botón IL2RG_F16A		
25			
30			
35			

5

10

15

20

25

30

35

Combinación de ID de familia No.	Nombre de polipéptido	Secuencias de longitud completa
Ojal IL2RB_F09G **	Ojal de IgG4 IL2RB_F09G	QVQLQESGPGLVKSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWS WVRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSLMSRVTISVD KSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARGSWELTDAFDIR GQGTTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 62)
Botón IL2RG_F16B	Botón de IgG4 IL2RG_F16B	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWI RQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQG TLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 63)

5

10

15

20

25

30

35

Combinación de ID de familia No.	Nombre de polipéptido	Secuencias de longitud completa
Ojal IL2RB_F09K ** Botón IL2RG_F16B	Ojal de IgG4 IL2RB_F09K	QVQLQESSPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNWWS WVRQPPGKGLEWIGEISHSGSTNYNPSLKSRTISVD KSKNQFSLRLSSVTAADTAVYFCGRGSWELTDAFDIR GQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 64)
	Botón de IgG4 IL2RG_F16B	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWI RQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQG TLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 65)

Combinación de ID de familia No.	Nombre de polipéptido	Secuencias de longitud completa
5 Ojal IL2RB_F18E **	Ojal de IgG4 IL2RB_F18E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKEREWVAVISYDGSNKYYTDSVKGRFTISR NSKNTLYLEMNSLRAEDTAVYYCARDLDYDVLTDGPV GGFDIWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRITVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 66)
15 Botón IL2RG_F16A	Botón de IgG4 IL2RG_F16A	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWI RQAPGKGLEWVSSISSSGDTIYYADSVQGRFTLSRD AENSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQ GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT TPVLDSGDSFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 67)
25 Ojal IL2RB_F09G ** Botón IL2RG_F16C	Ojal de IgG4 IL2RB_F09G	QVQLQESGPGLVKSSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWS WVRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYPNLSMRVTISVD KSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARGSWELTDAFDIR GQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 34)

Combinación de ID de familia No.	Nombre de polipéptido	Secuencias de longitud completa
5	Botón de IgG4 IL2RG_F16C	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNDYYMSWI RQAPGKGLEWVSHISSSGSTIYYADSVKGRFTVSRDN ANNSLYLQMHSRLRAEDTAVYYCARGDAVSITGDYRGQ GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 35)
15	Ojal de IgG4 IL2RB_F09G	QVQLQESGPGLVKSSSETLSLTCTVSGGSISSSDWWS WVRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYPNPSLMSRVTISVD KSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARGSWELTDAFDIR GQGTTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLVSRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 36)
25	Botón de IgG4 IL2RG_F18A	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSW LRQAPGKELEWVSHISSSGTTTTYYADSVGRFTITRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAAVAPGFDSRG QGTTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 37)

Las secuencias adicionales referidas en la presente se proporcionan en las tablas 9 y 10 para referencia.

Tabla 9. Secuencias adicionales

	Nombre de proteína	UniProt KB No.	Secuencia de aminoácidos
5	IL2RA humana	P01589	MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQ CQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQ ASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGE EKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTT EYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI (SEQ ID NO: 38)
10			
15	IL2RB humana	P14784	MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSR ANISCVWSQD GALQDTSCQVHAWPD RRRWNQTCELLPVS QASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAI QDFKPFENLR LMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFE RHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQ YEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPW LGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDP SKFFSQLSSEHGGDVQKWLS SFPSSSFSPGGLAPEISPL EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYF FFHLPDALIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSP QPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAP GGSGAGEERMPPSLQERVPRDWD PQPLGPPTPGVPDLV DFQPPPELV LREAGEEVPDAGPREGV SFPWSRPPGQGEF RALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTH LV (SEQ ID NO: 39)
20			
25			
30	IL2RG humana	P31785	MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFL TTMPDLSLSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQP TNLT LHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIH LYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLH KLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSV DYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWS HPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWL ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQP DYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPC YTLKPET (SEQ ID NO: 40)
35			

5

Nombre de proteína	UniProt KB No.	Secuencia de aminoácidos
IL2 humana	P60568	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 41)

Tabla 10. Secuencias adicionales

10

15

20

Nombre de proteína	Secuencia de aminoácidos
Cadena ligera fija, secuencia de CDR1	QSVSSN (SEQ ID NO: 44)
Cadena ligera fija, secuencia de CDR2	GAS (SEQ ID NO: 45)
Cadena ligera fija, secuencia de CDR3	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 46)
Cadena ligera fija, secuencia VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQY NNWPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)
Cadena ligera fija, secuencia de longitud completa (VL + CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQY NNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 48)

Internalización celular

25

30

35

En algunas modalidades, los anticuerpos de la divulgación, una vez unidos a una diana de unión (por ejemplo, IL2R), se internalizan en las células, donde la internalización es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 110 %, al menos aproximadamente 120 %, al menos aproximadamente 130 %, al menos aproximadamente 140 %, al menos aproximadamente 150 %, al menos aproximadamente 160 %, al menos aproximadamente 170 %, al menos aproximadamente 180 %, al menos aproximadamente 190 % o al menos aproximadamente 200 % o más, en comparación con uno o más anticuerpos de control que no se internalizan. En algunas

modalidades, los aspectos de los métodos descritos en la presente implican internalizar un anticuerpo como se describe en la presente dentro de una célula para lograr un efecto deseado, por ejemplo, para actuar como un agonista de IL2R.

Los resultados de internalización celular se proporcionan en la figura 7, paneles A-B. El panel A representa la internalización de los UniAbs® anti-IL2R β/γ indicados por células T CD8⁺ de PBMC humanas, como una función del tiempo. El panel B representa estos datos en formato tabular. Los niveles de superficie de UniAb® se detectaron por citometría de flujo y se reportaron con respecto a las células que no se habían permitido internalizar. Las semividas observadas variaron de 0.27 horas a 0.81 horas. Como se observa aquí, la internalización dependió potencialmente parcialmente del brazo anti-IL2RG específico del anticuerpo biespecífico, ya que las moléculas que comprenden la secuencia de unión a IL2RG_F16B se internalizaron más rápido y en mayor grado que las moléculas que contienen diferentes secuencias de unión anti-IL2RG.

Preparación de anticuerpos anti-IL2R

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, los anticuerpos en la presente se producen por animales transgénicos, incluidos ratones y ratas transgénicos, por ejemplo, ratas transgénicas, en las cuales los genes de inmunoglobulina endógenos se inactivan o desactivan. En algunas modalidades, los anticuerpos de cadena pesada en la presente se producen en un UniRat®. UniRat® tienen sus genes de inmunoglobulina endógena silenciados y usan un translocus de cadena pesada de inmunoglobulina humana para expresar un repertorio diverso naturalmente optimizado de HCAb completamente humanos. En tanto que los loci de inmunoglobulina endógena en ratas se pueden inactivar o silenciar usando una variedad de tecnologías, en UniRat® se usó la tecnología de (endo)nucleasa de dedo de zinc (ZNF) para inactivar el locus J de cadena pesada de rata endógena, locus C κ de cadena ligera y locus C λ de cadena ligera. Las construcciones de ZNF para microinyección en ovocitos pueden producir líneas inactivadas por IgH e IgL (KO). Para detalles, ver, por ejemplo, Geurts et al., 2009, *Science* 325:433. La caracterización de ratas inactivadas de cadena pesada de Ig se ha reportado por Menoret et al., 2010, *Eur. J. Immunol.* 40:2932-2941. Las ventajas de la tecnología ZNF son que la unión de extremos no homólogos para silenciar un gen o locus mediante delecciones de hasta varios kb también puede proporcionar un sitio diana para la integración homóloga (Cui et al., 2011, *Nat Biotechnol* 29:64-67). Los anticuerpos de cadena pesada humana producidos en UniRat® se llaman UniAbs® y pueden unirse a epítomos que no pueden ser atacados con anticuerpos convencionales. Su alta especificidad, afinidad y pequeño tamaño los hacen ideales para aplicaciones mono y poliespecíficas.

Además de UniAbs®, se incluyen específicamente en la presente anticuerpos solo de cadena pesada que carecen del marco VHH de camélido y mutaciones, y sus regiones VH funcionales. Estos anticuerpos solo de cadena pesada se pueden producir, por ejemplo, en ratas o ratones transgénicos que comprenden loci génicos solo de cadena pesada completamente humanos como se describe, por ejemplo, en WO2006/008548, pero también se pueden usar otros mamíferos transgénicos, tal como conejo, conejillo de indias y rata. Los anticuerpos solo de cadena pesada, incluidos sus fragmentos funcionales de VH o VHH, también se pueden producir por tecnología de ADN recombinante, por expresión del ácido nucleico codificador en un hospedador eucariota o procariota adecuado, incluido, por ejemplo, células de mamífero (por ejemplo, células CHO), *E. coli* o levadura.

Los dominios de anticuerpos solo de cadena pesada combinan las ventajas de los anticuerpos y fármacos de molécula pequeña: pueden ser mono- o multivalentes; tienen baja toxicidad; y son rentables de fabricar. Debido a su pequeño tamaño, estos dominios son fáciles de administrar, incluida la administración oral o tópica, se caracterizan por alta estabilidad, incluida la estabilidad gastrointestinal; y su semivida se puede adaptar al uso o indicación deseada. Además, los dominios VH y VHH de HCAb se pueden fabricar de una manera rentable.

En una modalidad particular, los anticuerpos de cadena pesada de la presente divulgación, incluidos UniAbs®, tienen el residuo de aminoácido nativo en la primera posición de la región FR4 (posición de aminoácido 101 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat), sustituido por otro residuo de aminoácido, que es capaz de alterar un parche hidrófobo expuesto a la superficie que comprende o se asocia con el residuo de aminoácido nativo en esa posición. Estos parches hidrófobos normalmente se entierran en la interfase con la región constante de cadena ligera de anticuerpo, pero se exponen a la superficie en HCAb y son, al menos parcialmente, para la agregación no deseada y la asociación de cadena ligera de HCAb. En algunas modalidades, el residuo de aminoácido sustituido se carga. En algunas modalidades, el residuo de aminoácido sustituido se carga positivamente, tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) o histidina (His, H), por ejemplo, arginina (R). En algunas modalidades, los anticuerpos solo de cadena pesada derivados de los animales transgénicos contienen una mutación de Trp a Arg en la posición 101. En algunas modalidades, los HCAb resultantes tienen alta afinidad de unión a antígeno y solubilidad bajo condiciones fisiológicas en la ausencia de agregación.

Como parte de la presente divulgación, se identificaron anticuerpos de cadena pesada anti-IL2R de IgG humana con secuencias únicas de animales UniRat® (UniAb®) que se unen a IL2R humana en ensayos de proteína ELISA y de unión a células. Las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) identificadas son positivas para la unión a proteína IL2R

humana y/o para la unión a células IL2R+, y todas son negativas para la unión a células que no expresan IL2R.

Los anticuerpos de cadena pesada que se unen a epítopos no superpuestos en una proteína IL2R, por ejemplo, UniAbs®, se pueden identificar por ensayos de unión de
 5 competición, tal como inmunoensayos ligados a enzimas (ensayos ELISA) o ensayos de unión competitiva por citometría de flujo. Por ejemplo, se puede usar competición entre anticuerpos conocidos que se unen al antígeno diana y el anticuerpo de interés. Al usar este enfoque, se puede dividir un conjunto de anticuerpos en aquellos que compiten con el anticuerpo de referencia y aquellos que no. Los anticuerpos no competitivos se identifican como unidos a un
 10 epítipo distinto que no se superpone con el epítipo unido por el anticuerpo de referencia. Frecuentemente, un anticuerpo se inmoviliza, el antígeno se une y un segundo anticuerpo etiquetado (por ejemplo, biotinilado) se prueba en un ensayo ELISA para la capacidad de unirse al antígeno capturado. Esto se puede realizar también al usar plataformas de resonancia de plasmones superficiales (SPR), incluido ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 y Biacore
 15 T200 (GE Healthcare Life Sciences), y el generador de imágenes MX96 SPR (Ibis technologies B.V.), así como en plataformas de interferometría de biocapa, tal como Octet Red384 y Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Para detalles adicionales, ver los ejemplos en la presente.

Habitualmente, un anticuerpo “compite” con un anticuerpo de referencia si provoca una reducción de aproximadamente 15-100 % en la unión del anticuerpo de referencia al antígeno
 20 diana, como se determina por técnicas estándar, tal como por los ensayos de unión de competición descritos anteriormente. En algunas modalidades, la unión competitiva se mide usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ensayo ELISA). En algunas modalidades, se inmoviliza un anticuerpo, se une el antígeno y se prueba un segundo anticuerpo etiquetado (por ejemplo, biotinilado) en un ensayo ELISA para la capacidad de unirse al antígeno capturado.
 25 Esto se puede realizar, por ejemplo, usando una plataforma de resonancia de plasmones superficiales (SPR), tal como, por ejemplo, ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 y Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences), y un generador de imágenes SPR MX96 (Ibis technologies B.V.), así como en plataformas de interferometría de biocapa, tal como Octet Red384 y Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). En algunas modalidades, la unión competitiva se mide
 30 usando un ensayo de unión competitiva de citometría de flujo.

En diferentes modalidades, la inhibición relativa es al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos
 35 al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos

aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o mayor.

Composiciones farmacéuticas

5 Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la presente divulgación en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Los portadores farmacéuticamente aceptables como se usan en la presente se ejemplifican, pero no se limitan a, adyuvantes, portadores sólidos, agua, amortiguadores u otros portadores usados en la técnica para retener componentes
10 terapéuticos o combinaciones de los mismos.

En una modalidad, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada (por ejemplo, UniAb®) que se une a IL2R. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada multiespecífico (incluido biespecífico) (por ejemplo, UniAb®) que se une a dos o más epítomos no superpuestos en una proteína IL2R
15 (por ejemplo, un primer epítomo en una primera cadena de polipéptido IL2R (por ejemplo, IL2RB) y un segundo epítomo en una segunda cadena de polipéptido IL2R (por ejemplo, IL2RG). En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo de cadena pesada multiespecífico (incluido biespecífico) (por ejemplo, UniAb®) que se une a IL2RB e IL2RG.

20 Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente divulgación se preparan para almacenamiento al mezclar proteínas que tienen el grado deseado de pureza con estabilizadores, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (ver, por ejemplo, Remington 's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), tal como en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores,
25 excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol bencílico o butílico; alquilparabenos tal como metil o
30 propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como
35 EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal

tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas Zn); y/o agentes tensioactivos no iónicos tal como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son estériles y sustancialmente isotónicas y se fabrican bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP). Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis para administración individual). La formulación depende de la vía de administración elegida. Los anticuerpos en la presente se pueden administrar por inyección o infusión intravenosa o de manera subcutánea. Para la administración por inyección, los anticuerpos de en a presente se pueden formular en soluciones acuosas, por ejemplo, en amortiguadores fisiológicamente compatibles para reducir la incomodidad en el sitio de inyección. La solución puede contener portadores, excipientes o estabilizadores como se analizó anteriormente. De manera alternativa, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Las formulaciones de anticuerpos se divulgan, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 9,034,324. Se pueden usar formulaciones similares para los anticuerpos de cadena pesada, incluidos UniAbs®, de la presente divulgación. Las formulaciones de anticuerpos subcutáneos se describen, por ejemplo, en US20160355591 y US20160166689.

Métodos de uso

Los anticuerpos anti-IL2R y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden usar para el tratamiento de enfermedades y condiciones que se median por la activación de la señalización de IL2R en células inmunitarias, tal como células efectoras inmunitarias, tal como células T efectoras y asesinas naturales (NK). En algunas modalidades, la enfermedad o condición puede ser una enfermedad infecciosa, un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple), un cáncer, una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, artritis), una enfermedad o trastorno asociado con señalización mediada por IL-2 deficiente, proliferación de células T deficiente o disfunción de células T.

En algunas modalidades, una enfermedad o trastorno es uno en el cual la señalización mediada por IL-2 incrementada es terapéutica para el paciente. En algunas modalidades, una enfermedad o trastorno se asocia con una respuesta de célula T deficiente, por ejemplo, una respuesta de célula T CD8+ deficiente.

En algunas modalidades, un tratamiento tiene como objetivo prevenir o tratar una enfermedad o trastorno al: incrementar el número de células T CD3+, incrementar el número de células T CD4+, incrementar el número de células T CD8+, incrementar el número de células T efectoras CD8+ (por ejemplo, CTL), incrementar el número de células NK, incrementar la

relación de células T CD8+ a células T CD4+, disminuir la proporción de Treg o cualquier combinación de lo mismo.

En algunas modalidades, una enfermedad o trastorno puede manifestarse como una infección, o como una incapacidad para montar una respuesta inmunitaria efectiva contra una
5 infección. La infección puede ser crónica, persistente, latente o lenta, y puede ser el resultado de una infección bacteriana, viral, fúngica o parasitaria. Como tal, el tratamiento se puede proporcionar a pacientes que tienen una infección bacteriana, viral o fúngica. Los ejemplos no limitantes de infecciones bacterianas incluyen infección con *Helicobacter pylori*. Los ejemplos no limitantes de infecciones virales incluyen infección con EBV, VIH, hepatitis B o hepatitis C.

10 En algunas modalidades, una enfermedad o trastorno se puede asociar con un cáncer, tal como, por ejemplo, escape inmunitario tumoral. Muchos tumores humanos expresan antígenos asociados a tumores reconocidos por las células T y capaces de inducir una respuesta inmunitaria. Los cánceres también se pueden tratar cuando no hay indicación de un trastorno disfuncional de células T, pero el uso de un anticuerpo descrito en la presente
15 promueve una respuesta inmunitaria efectiva.

En algunas modalidades, un tratamiento tiene como objetivo la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con señalización mediada por IL-2 deficiente y/o reducida. Como tal, los anticuerpos descritos en la presente se pueden usar para formular composiciones farmacéuticas o medicamentos, y los sujetos se pueden tratar profilácticamente contra el
20 desarrollo de un estado de enfermedad. Esto puede tener lugar antes del inicio de los síntomas del estado de enfermedad, y/o el tratamiento se puede administrar a sujetos que se considera que tienen un mayor riesgo de la enfermedad o trastorno.

En ciertas modalidades, los métodos en la presente implican inducir la activación de células efectoras inmunitarias sin activar preferentemente células T reguladoras (Treg). Sin
25 limitarse a la teoría, los inventores han descubierto que los anticuerpos multiespecíficos que se dirigen simultáneamente tanto a las subunidades beta como gamma del receptor de IL2 para inducir la activación (es decir, actuar como agonistas) de la señalización de IL2R en células efectoras inmunitarias humanas sin activar preferentemente las Treg, cambiando el equilibrio a la activación del efector T y las células NK, conducen a mejores resultados de tratamiento en
30 enfermedades y trastornos que se median por la activación de la señalización de IL2R.

Por consiguiente, los aspectos de la divulgación incluyen métodos de tratamiento en donde la respuesta inmunitaria de un sujeto se refuerza o ayuda por la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del uno o más de los anticuerpos descritos en la presente. En algunas modalidades, los métodos implican administrar un anticuerpo descrito en la presente
35 para lograr una respuesta inmunitaria que destruye células cancerosas. En ciertas modalidades,

los anticuerpos descritos en la presente actúan como agonistas de la vía de señalización de IL2R para lograr estos resultados. Los métodos de acuerdo con modalidades de la divulgación también incluyen terapia combinada, en donde a un sujeto se le administra un anticuerpo como se describe en la presente, junto con otro curso de terapia, por ejemplo, un régimen de quimioterapia.

En un aspecto, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, biespecífico) como se describe en la presente, que tiene actividad agonista para la vía de señalización de IL2R, se usa para tratar cáncer. Los cánceres que son susceptibles a este tratamiento incluyen, pero no se limitan a, cánceres avanzados o metastásicos. En algunas modalidades, un cáncer es un cáncer de tumor sólido. Los cánceres de tumores sólidos de acuerdo con las modalidades de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, sarcoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de próstata metastásico resistente a castración.

Los aspectos de la divulgación también incluyen métodos para estimular la señalización de IL2R en una célula inmunitaria, en donde los métodos implican poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo como se describe en la presente (por ejemplo, con un anticuerpo biespecífico agonista como se describe en la presente). En ciertas modalidades, los métodos implican estimular un complejo de receptor dimérico IL2RB/IL2RG en una célula inmunitaria al poner en contacto la célula inmunitaria con un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, biespecífico) que se une tanto a IL2RB como a IL2RG, y actúa como un agonista del complejo de IL2R. Cualquiera de una variedad de células inmunitarias que expresan IL2R se puede implicar en los presentes métodos, incluido, pero no limitado a: Células T CD4+, células T CD8+ y células asesinas naturales (NK).

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente divulgación para el tratamiento de la enfermedad varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía tal como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio tal como conejos, ratones, ratas, etc. y similares. Las dosis de tratamiento se pueden ajustar para optimizar la seguridad y eficacia.

Los niveles de dosis se pueden determinar fácilmente por el médico experto, y se pueden modificar como se requiera, por ejemplo, como se requiera para modificar la respuesta de un sujeto a la terapia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los

materiales portadores para producir una forma de dosis individual varía dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. Las formas de dosis unitarias en general contienen entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un principio activo.

5 En algunas modalidades, la dosis terapéutica del agente puede variar de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo
10 implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente divulgación usualmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica al medir los niveles sanguíneos de la entidad terapéutica en el paciente. De manera alternativa, las entidades terapéuticas de la presente divulgación se pueden administrar como una formulación de
15 liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la semivida del polipéptido en el paciente.

Habitualmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Las composiciones
20 farmacéuticas en la presente son adecuadas para administración intravenosa o subcutánea, directamente o después de la reconstitución de composiciones sólidas (por ejemplo, liofilizadas). La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tal como polilactida, poliglicolida o copolímero para mejorar el efecto adyuvante, como se analizó anteriormente. Langer, *Science* 249: 1527, 1990 y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:
25 97-119, 1997. Los agentes de esta divulgación se pueden administrar en la forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del principio activo. Las composiciones farmacéuticas en general se formulan como estériles, sustancialmente isotónicas y en pleno cumplimiento con todas las regulaciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) de la Administración de
30 Alimentos y Fármacos de Estados Unidos.

La toxicidad de los anticuerpos y estructuras de anticuerpos descritos en la presente se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, al determinar la LD50 (la dosis letal para 50 % de la población) o la LD100 (la dosis letal para 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico
35 y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo de

células y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis que no es tóxico para uso en humanos. En algunas modalidades, la dosis de los anticuerpos descritos en la presente se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este
 5 intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosis se pueden elegir por el médico en función de la condición del paciente.

Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente ablativo disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un
 10 portador acuoso. Se puede usar una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina amortiguada y similares. Estas soluciones son estériles y en general libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas
 15 tal como agentes amortiguadores y de ajuste de pH, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente con base en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración
 20 seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

También dentro del alcance de la divulgación están kits que comprenden los agentes activos y formulaciones de los mismos, de la divulgación e instrucciones de uso. El kit puede
 25 contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, etc. Los kits habitualmente incluyen una etiqueta que indica el uso propuesto del contenido del kit. El término "etiqueta", como se usa en la presente, incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con un kit, o que de otro modo acompaña a un kit

Ahora que se describen completamente las modalidades de ejemplo, será evidente para
 30 un experto en la técnica que se pueden realizar diferentes cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación.

EJEMPLOS

Materiales y métodos:

Nombres de construcción de anticuerpos

La siguiente tabla (tabla 11) proporciona nomenclatura abreviada para seis construcciones de anticuerpos biespecíficos evaluadas en la presente:

Tabla 11. Nomenclatura abreviada

5	Nombre abreviado	Nombre de secuencia
	BsAb-1	IL2RB_F09C**IL2RG_F16A
	BsAb-2	IL2RB_F09G**IL2RG_F16B
	BsAb-3	IL2RB_F09G**IL2RG_F16C
	BsAb-4	IL2RB_F09G**IL2RG_F18A
	BsAb-5	IL2RB_F09K**IL2RG_F16B
10	BsAb-6	IL2RB_F18E**IL2RG_F16A

Inmunizaciones, secuenciación de próxima generación, análisis de clonotipos y clonación

Métodos esencialmente como se describen en Harris et al. *Front Immunol.* 2018 Apr 24; 9:889(60). En resumen, los animales UniRat se inmunizaron usando adyuvantes estándar (Complete Freund's o Titermax/Ribi) junto con antígenos de proteína recombinante en un protocolo de 48 días o inmunizaciones de ADN. Para las inmunizaciones de proteínas, los refuerzos consistieron en 10 µg de proteína recombinante inyectada en cada pata de cada animal con el adyuvante apropiado. En el caso de inmunizaciones de ADN, se revestieron partículas de oro con vectores que contienen ADNc del antígeno diana, que posteriormente se administraron de manera subcutánea cada 7 días, usando una pistola génica. Las muestras de plasma se recolectaron después de la inmunización para valorar los títulos de suero contra el antígeno por ELISA.

Después de aproximadamente 7 semanas (antígeno de proteína) o 10 semanas (antígeno de ADN) de inmunización, se cosecharon los ganglios linfáticos de drenaje y se aisló el ARN total. Las secuencias de cadena pesada de Ig se amplificaron usando síntesis de ADNc de primera hebra y RACE 5' por PCR, siguiendo métodos similares a aquellos descritos previamente en Harris et al. *Front Immunol.* 2018 Apr 24; 9:889 y entonces se purificaron por extracción en gel.

La secuenciación de próxima generación se completó usando la plataforma MiSeq (Illumina) con 2 x 300 lecturas de extremo emparejado. Para permitir la multiplexación de muestras, se adicionaron etiquetas de indexación por extensión de cebador. Aproximadamente 100,000 lecturas emparejadas cubrieron cada muestra, y se descartaron aquellas que mostraron una alineación de menos de 20 nucleótidos con un locus de Ig humana. Las lecturas directas e inversas combinadas de las regiones VH se tradujeron en marcos de lectura abiertos y regiones marco y CDR identificadas por IGBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Se determinaron clonotipos (definidos por secuencias de proteína CDR3 con al menos 80 % de

similitud de secuencia) para muestras usando agrupamiento aglomerativo. Los clonotipos de CDR3 se clasificaron por el por ciento de lecturas totales en una muestra definida por ese clonotipo. Aquellos con la mayor abundancia se priorizaron para la clonación de alto rendimiento en un vector de expresión que contiene una región Fc de IgG1 humana con delección de CH1 y se validaron mediante secuenciación de Sanger. Los plásmidos se transformaron en *E. coli* cultivada en medio de cultivo LB y entonces se purificaron para permitir la transfección transitoria de células HEK 293 en formato de 96 pozos. Después de varios días de expresión, se cosecharon sobrenadantes que contienen anticuerpo y se aclararon por centrifugación.

ELISA de alto rendimiento

Los métodos son esencialmente como se describen en Harris et al. *Front Immunol.* 2018 Apr 24; 9:889. En resumen, las proteínas recombinantes se revistieron durante la noche a 4 °C en placas de 96 pozos usando amortiguador de carbonato-bicarbonato BupH (IL-2R β humana, Acrobiosystems; IL-2R β de cynomolgus, Sino Biological). Las placas entonces se lavaron con TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05 %, pH 7.6) y se bloquearon con amortiguador de bloqueo (TBST con leche en polvo al 1 %). Los sobrenadantes de HEK 293 que contienen anticuerpos se diluyeron 1:100 en amortiguador de bloqueo y se adicionaron a placas revestidas con antígeno. La detección de anticuerpos unidos se logró usando un anticuerpo secundario anti-Ig humana etiquetado con HRP junto con sustrato quimioluminiscente.

La luminiscencia se cuantificó (SpectraMax i3X, Molecular devices) y la señal para cada pozo se normalizó al dividir por la luminiscencia de fondo promedio de los pozos revestidos con antígeno que se habían incubado con sobrenadante de células HEK 293 no transfectadas.

Líneas de células y PBMC

Las células M07e se obtuvieron de DSMZ y se cultivaron en medio RPMI que contiene suero bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y 10 ng/ml de rhGM-CSF. Las células HSC-F se obtuvieron de The Nonhuman Primate Reagent Resource y se cultivaron en medio RPMI complementado con FBS al 20 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y β -mercaptoetanol 55 μ M. 293-F se obtuvieron de Gibco y se cultivaron de acuerdo con sus recomendaciones.

Para crear líneas de células estables que expresan IL-2R β humana o IL-2R β de cynomolgus, las construcciones de expresión portaron el ADNc de longitud completa para el antígeno y un casete de selección de NeoR. Cada construcción de expresión entonces se linealizó y se usó para electroporar células CHO. Tres días después de la transfección, las células se sometieron a selección durante 3-6 semanas usando tratamientos con Geneticina. Al final del período de selección, todas las líneas de células no transfectadas y de control negativo

se aniquilaron, en tanto que todas las mezclas transfectadas mostraron recrecimiento como se esperaba para los grupos transfectados de manera exitosa. Entonces se ensayaron cuatro mezclas de cada diana por citometría de flujo para unión a un anticuerpo de control positivo. El medio de cultivo para las células CHO fue medio EX-CELL® 325 PF CHO que contiene L-glutamina 8 mM, 0.1 µg/l de IGF-1, FBS dializado al 5 %, 0.45 mg/ml de geneticina y 0.45 mg/ml de higromicina. Las células se cultivaron en suspensión y se mantuvieron a una concentración entre 0.5×10^6 /ml a 2×10^6 /ml.

Las PBMC humanas se aislaron internamente de paquetes de leucaféresis frescos (StemCell) por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll® Paque Premium (GE Healthcare Life Sciences).

Unión celular por citometría de flujo

Todos los lavados y diluciones de células, anticuerpos y reactivos se realizaron usando amortiguador de flujo (1X PBS, BSA al 1 %, NaN₃ al 0.1 %, pH 7.4). La tinción se realizó en una placa de 96 pozos de fondo redondo (Corning) sembrada a 100,000 células/pozo y todas las incubaciones se realizaron a 4 °C o en hielo. Para los exámenes primarios y secundarios, las células se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos de prueba pre-diluidos (análisis secundario y curvas de dosis) o sobrenadantes de HEK 293 diluidos 1:5 que contienen anticuerpos (para exámenes primarios y análisis de diversidad) en un volumen total de 50 µl. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de amortiguador de flujo. Las células entonces se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo de detección (F(ab')₂ de cabra anti-IgG-PE humana, Southern Biotech) a 0.625 µg/ml en amortiguador de flujo. Después de 2 lavados más, las células se resuspendieron en un volumen final de 150 µl de amortiguador de flujo. Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCelesta o Guava easyCyte 8-HT. Se recolectaron al menos 3000 eventos y se graficó la intensidad de fluorescencia media geométrica de PE como veces sobre el fondo (células incubadas solo con anticuerpo de detección secundario). En algunos exámenes secundarios que implican PBMC de cynomolgus o humanas, se incluyó un anticuerpo CD4 adicional (BioLegend) y/o anticuerpo CD8 (BioLegend) para caracterizar adicionalmente la unión celular.

Detección de pSTAT5 por citometría de flujo

Para la detección de pSTAT5 por citometría de flujo, se prepararon PBMC a partir de sangre entera congelada (cynomolgus) o LeukoPak congelado (humano). Las células se descongelaron, se lavaron dos veces con medio RPMI completo y se resuspendieron a 5×10^6 células/ml. Entonces se transfirieron 100 µl/pozo de estas células a una placa estéril de 96 pozos de fondo redondo (Corning) y se selló con un AeraSeal® (Excel Scientific). La placa entonces se incubó a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 hora. Después de la incubación, se adicionaron 100

5 µl de anticuerpos pre-diluidos (o variante de IL-2 / IL-2) a los pozos apropiados. Se usó una
 concentración final de IL-2 10 nM (R&D Systems) en los pozos de control para asegurar pSTAT5
 detectable. La placa entonces se volvió a sellar y se regresó a la incubadora durante 1 hora
 adicional. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con
 10 PBS pre-enfriado a 4 °C. Entonces, las células se bloquearon con TruStain FcX de humano
 (BioLegend) y entonces se tiñeron posteriormente durante 30 minutos con tinte de viabilidad
 fijable (Invitrogen) y anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, CD25 y/o CD56. Después de la tinción,
 las células se centrifugaron de nuevo y se lavaron dos veces con PBS pre-enfriado. Las células
 entonces se fijaron con la adición de 200 µl/pozo de amortiguador de fijación (BioLegend) y se
 15 incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la fijación, las células se
 centrifugaron y se lavaron dos veces con amortiguador de flujo (1X PBS, BSA al 1 %, NaN₃ al
 0.1 %, pH 7.4). Después, las células se permeabilizaron por resuspensión en 200 µl/pozo de
 amortiguador True-Phos (BioLegend) pre-enfriado a -20 °C y se transfirieron a un congelador a
 -20 °C durante la noche. A la mañana siguiente, las células se centrifugaron, se lavaron dos
 20 veces con amortiguador de flujo y posteriormente se tiñeron durante 30 minutos con anti-
 pSTAT5 (BD Biosciences). Después de dos lavados adicionales, las células se resuspendieron
 en 125 µl/pozo de amortiguador de flujo y se adquirieron en un BD FACSCelesta.

Detección de Ki67 por citometría de flujo

25 Para la detección de Ki67 por citometría de flujo, las PBMC humanas congeladas
 (previamente aisladas internamente de un LeukoPak) se descongelaron y se dejaron reposar
 durante la noche en medio RPMI completo a 1×10^6 células/ml. La mañana del ensayo, las
 PBMC se lavaron con RPMI completo y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml. Entonces, a cada
 pozo de una placa estéril de 96 pozos, se adicionaron 100 µl de PBMC, 50 µl de 0.16X
 ImmunoCult (StemCellTech) y 50 µl de anticuerpo diluido o rhIL-2 (R&D Systems). 0.5X
 30 ImmunoCult se usó para controles de tinción para asegurar la señal detectable de Ki67 y CD25
 para compensación. La placa entonces se cubrió y se incubó a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después
 de 3 días, el medio se refrescó con 100 µl/pozo del anticuerpo de concentración correspondiente
 e ImmunoCult y entonces se regresó a la incubadora. Después de 3 días más (6 días en total),
 las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS pre-enfriado a 4 °C. Entonces, las
 35 células se bloquearon con TruStain FcX de humano (BioLegend) y entonces se tiñeron
 posteriormente durante 30 minutos con tinte de viabilidad fijable (Invitrogen) y anticuerpos contra
 CD3, CD4, CD8, CD25 y/o CD56. Después de la tinción, las células se centrifugaron de nuevo
 y se lavaron dos veces con PBS pre-enfriado. Las células entonces se fijaron y permeabilizaron
 durante 1 hora con 200 µl/pozo de FoxP3/solución de trabajo de amortiguador de tinción de
 factor de transcripción (Invitrogen). Después de la permeabilización, las células se centrifugaron,

se lavaron dos veces con amortiguador de permeabilización y posteriormente se tiñeron durante 30 minutos con anti-FoxP3 (BioLegend) y anti-Ki67 (BioLegend). Después de dos lavados adicionales, las células se resuspendieron en 125 µl/pozo de amortiguador de flujo y se adquirieron en un BD FACSCelesta.

5 Ensayo de liberación de citocinas de sangre entera

La secreción de citocinas se detectó usando sangre entera humana fresca (heparinizada) obtenida de AllCells. El siguiente método se adaptó de B. Wolf et al. *Cytokine* 60 (2012) 828–837(61). Se adicionaron 12.5 µl de artículo de prueba concentrado 20X (diluido en 1X PBS) a cada pozo de una placa de fondo redondo estéril de 96 pozos. A esto, se adicionaron 237.5 µl de sangre entera humana fresca a cada pozo con pipeteo mínimo para reducir la activación no específica. La placa entonces se cubrió y se incubó a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. A la mañana siguiente, la placa se centrifugó a 1800 x g durante 10 minutos y entonces se transfirieron 50 µl de suero a una microplaca de 96 pozos. El suero se probó inmediatamente por MSD (# K15010K-1o una placa U-Plex personalizada) o se congeló a -80 °C para pruebas posteriores.

Evaluación de farmacocinética de ratón (PK)

La PK de BsAb-1 y BsAb-2 se evaluó cada una en 6 ratones BALB/c machos después de una inyección individual en la vena de la cola de 1 mg/kg (n = 3 * 6 grupos, Aragen Biosciences, Morgan Hill, CA). Las muestras de suero se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados durante el transcurso de 14 días después de la dosis.

La PK de BsAb-5 se evaluó en dos grupos de nueve ratones BALB/c hembras después de una inyección individual en la vena de la cola de 1 mg/kg o 10 mg/kg (9 ratones por grupo de dosificación, CrownBio, San Diego, CA). Las muestras de suero se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados durante el transcurso de 14 días después de la dosis.

25 Estudio de GVHD acelerada en ratones

Cada ratón NSG inmunocomprometido (8-9 semanas de edad de Charles River, Francia) se irradió con 1.5 Gy el día -1 del estudio. Los ratones se dividieron en 4 grupos (n = 5) y se llevaron a cabo 2 experimentos independientes usando 2 donantes de PBMC diferentes. En el día 0 del estudio, cada ratón se transfirió de forma adoptiva IV con 20 millones de PBMC humanas de uno de los 2 donantes y cada ratón se trató ya sea con control de vehículo (100 µl), 22 µg de rhIL-2 (350,000 UI/ratones, Proleukin, Novartis) diariamente, 1 mg/kg de BsAb-1 dos veces por semana o 1 mg/kg de BsAb-2 dos veces por semana. La GVHD se valoró al medir la pérdida de peso con el paso del tiempo en todos los animales. Se les aplicó eutanasia a los animales cuando se observó una pérdida de peso corporal de 20 %.

En el segundo experimento, los ratones NSG (8-9 semanas de edad de Charles River, Francia) se irradiaron con 1.5 Gy el día -1 del estudio. Los ratones se dividieron en 4 grupos y se llevaron a cabo 2 experimentos independientes usando 2 donantes de PBMC diferentes. En el día 0 del estudio, cada ratón se transfirió de manera adoptiva IV con 20 millones de PBMC humanas etiquetadas con CFSE de uno de los 2 donantes y cada ratón se trató ya sea con control de vehículo (100 µl) (n = 7), 22 µg de rhIL-2 (350,000 UI/ratones) diariamente (n = 6), 1 mg/kg de BsAb-1 dos veces por semana (n = 6) o 1 mg/kg de BsAb-2 dos veces por semana (n = 6). Todos los animales se sacrificaron el día 5 del estudio.

La inmunofenotipificación de las PBMC injertadas por citometría de flujo se realizó en suspensiones de células individuales preparadas a partir del bazo de ratón el día del sacrificio. El método de detección fue en gran medida el mismo que el método anterior para la detección de Ki67 por citometría de flujo, pero con diferentes paneles de anticuerpos para distinguir mejor las PBMC humanas de las células hospedadoras. Las células se tiñeron en superficie con CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD16, CD19 y/o CD69 anti-humano. Después de la fijación y permeabilización, algunas de las células se tiñeron con FoxP3 anti-humano. Las entonces muestras se recolectaron en un citómetro de flujo y se analizaron usando el software de análisis FlowJo.

Para BsAb-5, se transfirieron 10 millones de PBMC en lugar de 20 millones, y los ratones se dividieron en 3 grupos.

Estudio de farmacodinámica de Cynomolgus (PD)

Los perfiles de PD de BsAb-1 y BsAb-2 se evaluaron en doce monos cynomolgus sin tratamiento previo de 2-4 años después de una dosis individual IV (bolo lento) de 0.03, 0.1 o 0.3 mg/kg. Cada grupo de tratamiento contuvo 1 mono cynomolgus macho y 1 hembra (Charles River Lab, EUA, Reno, NV). Las muestras de sangre se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados durante 21 días después de la dosificación para los análisis de hematología, química de suero, citocinas y criterios de valoración de PD. Después de la finalización de estudio, los animales del estudio se regresaron a la colonia general. Todos los procedimientos se aprobaron por CRL IACUC y se realizaron de conformidad con la Ley de Bienestar Animal, la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y la Oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio.

Inmunofenotipificación de sangre de Cynomolgus

Una porción de la sangre de cada punto de tiempo recolectado se usó para inmunofenotipificación y cuantificación por citometría de flujo. El método para la detección de Ki67 por citometría de flujo fue en gran medida el mismo que se describió anteriormente, pero con un panel diferente de anticuerpos cino-reactivos. Las células se tiñeron en superficie con

anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, CD20, CD25 y CD159a. Después de la fijación y permeabilización, las células se tiñeron con anticuerpos contra FoxP3 y Ki67. Las entonces muestras se recolectaron en un citómetro de flujo y se analizaron usando el software de análisis FlowJo.

- 5 Simultáneamente, una porción de cada muestra de sangre se transfirió a tubos BD TruCount y se tiñó con CD45 para la cuantificación en tiempo real de los conteos absolutos de células de sangre periférica. Los porcentajes de subconjuntos de células del análisis de sangre anterior se aplicaron a los números totales de células del tubo TruCount correspondiente.

ELISA de *algG4*

- 10 Las concentraciones en suero de BsAb-1 y BsAb-2 en suero de ratón se determinaron usando un ELISA de captura de antígeno. Todos los lavados y diluciones se realizaron con TBS-T recién elaborado (Accuris). Se debe asumir que todos los volúmenes son de 100 µl/pozo, excepto para revestimiento, el bloqueo y lavado, que son de 200 µl/pozo. La noche anterior al ensayo, las placas de fondo plano Nunc MaxiSorp® (Invitrogen) se revistieron con proteína
- 15 IL2Ry humana recombinante diluida a 1 µg/ml en amortiguador de carbonato-bicarbonato (Thermo Scientific) y se dejaron a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 5 veces y entonces se bloquearon con BSA al 1 % durante 30 minutos. Las placas se lavaron una vez y entonces se adicionaron múltiples diluciones de las muestras de suero, junto con un estándar de referencia. Las existencias de concentración conocida para BsAb-1 y BsAb-2 se usaron para
- 20 hacer la curva estándar. Después de 1 hora a temperatura ambiente, la placa se lavó 8 veces y entonces se adicionó IgG4-Fc anti-humana biotinilada (MABTECH) diluida a 3 µg/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante otros 30 minutos y entonces se lavaron de nuevo 8 veces. Después, las placas se incubaron durante 30 minutos con HRP-estreptavidina (Thermo Scientific) diluida 1:4000. Después de 8 lavados adicionales, las placas se incubaron en la
- 25 oscuridad durante 6 minutos con 1-Step Ultra TMB (Thermo Scientific) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se valoró a 450 nm y 570 nm.

Purificación y expresión de proteínas

- 30 Los UniAb monoespecíficos se expresaron en células ExpiCHO siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFisher A29133, Protocolo estándar). Los sobrenadantes clarificados se cosecharon el día 7 y se purificaron usando perlas magnéticas de proteína A, usando la plataforma KingFisher Flex (ThermoFisher). Los anticuerpos se eluyeron en citrato 0.1 M, NaCl 0.1 M, glicerol al 10 %, sacarosa al 10 %, pH 3.5.

- 35 Para expresar UniAb biespecíficos, las células ExpiCHO se transfectaron con dos vectores de expresión (vectores de botón y ojal, los vectores de botón contienen etiqueta His C-

terminal) y se expresaron en las células ExpiCHO de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el protocolo de título alto. Los sobrenadantes clarificados se cosecharon y los anticuerpos se purificaron por IMAC (Ni Sepharose® Excel, Cytiva Life Sciences), usando un gradiente de imidazol para elución. Las fracciones que contienen UniAb biespecíficos de IL-2R β y se mezclaron, concentraron y purificaron adicionalmente en intercambio catiónico para remover cualquier impureza relacionada con el producto (columna Mono S® 10/100 GL (Cytiva Life Sciences)). Todos los anticuerpos se analizaron por SEC-UPLC y SDS-PAGE para confirmar su tamaño y pureza.

La secuencia de IL-2R γ de cynomolgus se obtuvo de Uniprot.org (ID de acceso UniProt: G7Q2Z6) y el dominio extracelular (aa Met1-Asn254) se clonó en un vector patentado que contiene la secuencia guía endógena y una etiqueta His C-terminal. El reactivo de IL-2R γ se expresó en células ExpiCHO, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (protocolo de título alto, ThermoFisher). Las células se cosecharon el día 8 y el sobrenadante se corrió en SDS-PAGE (NuPAGE 4-12 % Bis Tris Gel) para verificar la expresión de proteína diana. La cosecha clarificada se purificó por IMAC usando resina Ni-Sepharose Excel (Cytiva Life Sciences), usando un gradiente de imidazol para elución. Los picos se mezclaron y cuantificaron usando QiaXpert (Qiagen).

La clonación, expresión y purificación de la proteína IL-2 mutante (T3A, F42A, Y45A, L72G, C125A) se completó en Lake Pharma. Se adicionó una etiqueta His C-terminal para permitir la purificación por IMAC usando procedimientos estándar y elución con un gradiente de imidazol.

Mediciones de constante de disociación basadas en octetos

Todas las mediciones de constante de disociación se realizaron en un instrumento Octet Qk384 (ForteBio), en microplacas de 96 pozos a 25 °C usando sensores de captura de Fc de IgG anti-humana (AHC, 18-5005) con una velocidad de agitación de 1000 rpm. Para la determinación de constante de disociación, los anticuerpos se cargaron en los sensores AHC a 5 μ g/ml. Después de una línea base corta en amortiguador cinético (Tween20 al 0.02 %, BSA al 0.1 %, azida de sodio al 0.05 %, 1X PBS). Las mediciones de constante de disociación se realizaron para lo siguiente: IL-2R β humana (AcroBiosystems), IL-2R γ humana (Sino Biological), IL-2R β de cynomolgus (Sino Biological), IL-2R γ de cynomolgus (expresada y purificada internamente usando el sistema de expresión ExpiCHO seguido de purificación de etiqueta His Ni-NTA), IL-2R γ de ratón (Sino Biological), IL-2R β de ratón (Sino Biological), IL-2R α humana (Sino Biological), IL-4R (Sino Biological), IL-7R (Sino Biological), IL-9R (R&D Systems) e IL-21R (Sino Biological). Los siguientes anticuerpos se usaron como controles positivos para verificar la unión a diana y calidad de reactivo: IL-9R anti-humano (R&D Systems), IL-21R anti-humano

(R&D Systems), IL-7R anti-humano (R&D Systems) y IL-4Ra anti-humano (R&D Systems). Los sensores cargados entonces se sumergieron en pozos que contienen antígeno a una concentración de 100 nM para el paso de asociación. La disociación se monitoreó en amortiguador cinético. Las superficies de captura se regeneraron durante 60 s. Se usó el software de análisis de datos ForteBio para ajustar los datos a un modelo de unión 1:1 para extraer una constante de asociación y constante de disociación.

Mediciones de cinética basadas en octetos

Todos los experimentos de medición de cinética se realizaron en un instrumento ForteBio Octet Qk384 usando sensores de captura de Fc anti-humano (AHC, 18-5005). Los UniAb biespecíficos y los antígenos se diluyeron a concentraciones finales en amortiguador cinético (Tween20 al 0.02 %, BSA al 0.1 %, azida de sodio al 0.05 %, 1X PBS). Las mediciones de cinética fueron contra los siguientes antígenos: IL-2RB humana (AcroBiosystems), IL-2RG humana (AcroBiosystems), IL-2RB de cynomolgus (Sino Biological), IL-2RG de cynomolgus (expresada y purificada internamente usando el sistema de expresión ExpiCHO seguido de purificación de etiqueta his Ni-NTA). Los anticuerpos se cargaron en los sensores de AHC a 5 µg/ml para una carga máxima. Después de una línea base corta en amortiguador Kinetics, los sensores se expusieron a una serie de concentraciones de analito (7.8 nM a 500 nM) para el paso de asociación y se usó la resta de fondo para corregir el desplazamiento de sensor. La disociación se monitoreó en amortiguador cinético. Las superficies de captura se regeneraron durante 60 s. Todos los experimentos se realizaron con agitación a 1000 rpm. Se usó el software de análisis de datos ForteBio para ajustar los datos a un modelo de unión 1:1 para extraer una constante de asociación y constante de disociación. La KD se calculó usando la relación kd/ka. Los datos de cinética para seis construcciones de anticuerpos biespecíficos se proporcionan en la **figura 1**.

Ensayo de caracterización biofísica (T_m , Tagg)

T_m y Tagg se midieron en la plataforma UNcle. En resumen, se cargaron 9 µl de cada muestra por duplicado en un Uni (casete UNcle) y se corrieron con una rampa térmica de 20 °C a 70 °C a una velocidad constante de 1 °C/min. El software UNcle Analysis 3.1, se usó para calcular la T_m de cada muestra usando la primera derivada de la media baricéntrica (BCM) de la intensidad de fluorescencia. La Tagg para cada muestra se calculó usando la intensidad de luz dispersada a 266 nm.

Caracterización de estabilidad y esfuerzo térmico

Las moléculas de UniAb biespecíficos se concentraron a 10 mg/ml en citrato 20 mM y NaCl 0.1 M pH 6.2. La presencia de especies de alto y bajo peso molecular (%HMW y %LMW)

se determinó antes y después del esfuerzo por temperatura durante 1 mes a 2-8 °C y 37 °C por SEC en un ThermoFisher UltiMate® 3000 UPLC analítico.

Ejemplo 1: Identificación de combinaciones de anticuerpos biespecíficos de IL-2R β y con actividad agonista

5 La activación del complejo de receptor de IL-2 desencadena una cascada de señalización que da por resultado la fosforilación de STAT5 (pSTAT5), translocación de dímeros de pSTAT5 al núcleo y transcripción de genes regulados por STAT5 (M. Rickert, et al., *Science* 308, 1477–1480 (2005); G. C. Sim, et al., *Cytokine Growth F R* 25, 377–390 (2014)). Como ensayo primario para determinar si los anticuerpos biespecíficos que se dirigen a las subunidades beta y gamma de IL-2R pueden inducir la activación de la señalización de IL-2R, se combinaron 5 brazos de unión anti-IL-2R β de familias de CDR3 únicas y 5 brazos de unión anti-IL-2R γ de familias de CDR3 únicas para hacer 25 UniAb biespecíficos para llevar a cabo un examen completo de actividad agonista. Los UniAb biespecíficos se expresaron en un Fc de IgG4 humana silenciada y estabilizada (dominio CH1 eliminado) usando tecnología de botones en ocales para facilitar la formación de heterodímeros de cadena pesada, con una VH anti-IL-2R γ individual en el brazo de botón y una VH anti-IL-2R β individual en el brazo de ojal (J. B. B. Ridgway et al., *Protein Eng Des Sel* 9, 617-621 (1996); S. M. Canfield, et al., *J Exp Medicine* 173, 1483-1491 (1991); D. Xu et al., *Cell Immunol* 200, 16-26 (2000); J. W. Bloom et al., *Protein Sci* 6, 407-415 (1997); M. P. Reddy et al., *J Immunol* 164, 1925-1933 (2000); A. M. Merchant et al., *Nat Biotechnol* 16, 677-681 (1998)).

Se usó un ensayo de citometría de fosfo-flujo para medir y comparar la fosforilación de STAT5 por las 25 combinaciones de UniAb IL-2R β y en comparación con rhIL-2 en células T CD8+ humanas. No se observó fosforilación de STAT5 con ninguno de los UniAb monoespecíficos anti-IL-2R β o anti-IL-2R γ . De manera similar, tampoco se observó fosforilación de STAT5 cuando los UniAb monoespecíficos anti-IL-2R β y anti-IL-2R γ se probaron como una mezcla en el ensayo de pSTAT5 (**figura 2**, panel B). En contraste, los UniAb biespecíficos con un brazo anti-IL-2R β y un brazo anti-IL-2R γ exhibieron niveles variables de actividad agonista, resumidos en la **figura 2**, panel A. Curiosamente, la capacidad de inducir la fosforilación de la actividad agonista de STAT5 parecía altamente dependiente del brazo anti-IL-2R β presente en la combinación biespecífica, en tanto que el grado de agonismo parecía ser dependiente del brazo anti-IL-2R γ . Los datos de control se muestran en la **figura 2**, panel C.

Para identificar anticuerpos con un mayor intervalo de actividad agonista, se inició un examen de diversidad secundario para examinar otras secuencias VH únicas en 3 de las 4 familias de clonotipos de CDR3 principales identificadas en el examen biespecífico para la actividad de STAT5. Estas secuencias VH adicionales se seleccionaron de las familias de

clonotipos de CDR3 guía y contienen variación de secuencia en CDR1, CDR2 y regiones marco. En total, 157 miembros adicionales de familia única se sometieron a una segunda ronda de montaje de genes de alto rendimiento, expresión y se valoraron para unión a células que expresan IL-2R. Para IL-2R β , se identificaron 33 miembros adicionales de familia IL-2R β F09 y 22 miembros adicionales de familia IL-2R β F18 que se unieron a células IL-2R β humanas y de cynomolgus en el examen de diversidad. Se identificaron otros 29 miembros de familia IL-2R γ F16 que se unieron a la proteína recombinante IL-2R γ humana y de cynomolgus y en células en el examen de diversidad. Este conjunto grande y diverso de nuevos UniAb de unión a IL-2R permitió esfuerzos posteriores para identificar un conjunto de combinaciones biespecíficas de IL-2R $\beta\gamma$ guía con un intervalo de actividad funcional.

Ejemplo 2: Caracterización *in vitro* de UniAb biespecíficos de IL-2R $\beta\gamma$

Con base en los resultados del examen de unión primaria y secundaria, así como la fosforilación de STAT5 observada en el examen de todos los UniAb biespecíficos, se seleccionaron 6 moléculas de UniAb biespecíficas de IL-2R $\beta\gamma$ para una caracterización *in vitro* adicional. Los 6 UniAb biespecíficos de IL-2R $\beta\gamma$ se unieron de manera eficiente a células T tanto humanas como de cynomolgus con un intervalo de valores de EC50 (**figura 3**). Ninguno de los 6 UniAb biespecíficos se unió a otros compañeros de cadena gamma comunes (IL-4R, IL-7R, IL-9R o IL-21R) o IL-2R α por análisis de constante de disociación de octeto.

La capacidad de los UniAb biespecíficos de IL-2R $\beta\gamma$ para estimular la señalización de IL-2R en células T CD4+, T CD8+ y NK humanas se confirmó por un incremento dependiente de dosis de la fosforilación de STAT5 en comparación con rhIL-2 y una variante de rhIL-2 que contiene mutaciones (F42A, Y45A, L72G) que se ha mostrado que alteran la unión a IL-2R α en tanto que retienen la capacidad de unirse y activar el receptor de IL-2R $\beta\gamma$ de afinidad intermedia (**figura 4**, paneles A-C) (C. Klein et al., *Oncoimmunology* 6:3 e1277306 (2017)). En células T CD8+, los UniAb biespecíficos exhiben un intervalo de valores de EC50 en el ensayo de pSTAT5, con múltiples construcciones (BsAb-1, BsAb-3, BsAb-4) que muestran actividad casi equivalente con rhIL-2 y la variante de rhIL-2 (**figura 4**, panel A). Sin embargo, esto está en marcado contraste con el nivel de pSTAT5 en células reguladoras T CD4+CD25+FoxP3+, donde los UniAb biespecíficos muestran una potencia significativamente menor en comparación con rhIL-2 en células que expresan altos niveles de IL-2R α (**figura 4**, paneles C-D). Por lo tanto, los UniAb biespecíficos de IL-2R $\beta\gamma$ evitan la activación preferencial de T-reg, que es un criterio funcional clave para estas moléculas. También se confirmó que los 6 UniAb biespecíficos activan la señalización de IL-2R en células T de cynomolgus, estableciendo a los monos cynomolgus como un modelo de primate no humano adecuado en estudios posteriores (**figura 4**, panel E).

Para comparar adicionalmente la actividad funcional entre los 6 UniAb biespecíficos y rhIL-2, se realizó un ensayo de proliferación celular. En respuesta al tratamiento con los UniAb agonistas de IL-2R biespecíficos, o los controles de citocinas de IL-2, las células efectoras inmunitarias (células T y NK derivadas de PBMC de donantes sanos) demostraron proliferación dependiente de dosis (**figura 5**, paneles A-D). En tanto que se observó un intervalo de potencias en la proliferación de células T CD8+ y células NK en PBMC tratadas con los UniAb biespecíficos de IL-2Rβγ, varios (BsAb-1, BsAb-3, BsAb-4) mostraron inducción de proliferación a niveles similares a rhIL-2 y la variante de control de rhIL-2, en tanto que todas las moléculas lograron niveles similares de proliferación máxima (**figura 5**, paneles A-B). Por el contrario, rhIL-2 fue más activa que los UniAb agonistas biespecíficos y el control de variante de rhIL-2 en células CD4+ (incluidas T-reg) (**figura 5**, paneles C-D).

Los perfiles de liberación de citocinas de los UniAb agonistas de IL-2R biespecíficos en comparación con rhIL-2 se valoraron en un ensayo de sangre entera humana *ex vivo*. Después de una incubación de 24 horas en la presencia de los UniAb biespecíficos de IL-2Rβγ o rhIL-2, se observó un incremento dependiente de dosis en IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-8 para todos los artículos de prueba (**figura 6**, paneles A-D). Dos de los UniAb biespecíficos (BsAb-3 y BsAb-4) indujeron niveles de citocinas (concentración máxima o EC50) a o por arriba de la de rhIL-2 en todas las citocinas probadas, pero los cuatro niveles restantes indujeron niveles más bajos que el control de citocinas.

En resumen, se identificaron seis anticuerpos biespecíficos de IL-2Rβγ con un intervalo de actividad agonista. BsAb-1 demuestra actividad agonista a un nivel similar al observado con rhIL-2 en células efectoras inmunitarias medidas por fosforilación de STAT5 y en el ensayo de proliferación. En contraste, en los mismos ensayos *in vitro*, BsAb-2 muestra potencia reducida en comparación con rhIL-2 y BsAb-1. Ambos anticuerpos mostraron baja agregación medida por SEC, tuvieron temperaturas de fusión favorables y fueron estables a 37 °C durante un mes (**figura 9**). Estos resultados combinados con los perfiles de liberación de citocinas favorables de BsAb-1 y BsAb-2 condujeron a la selección de estos dos anticuerpos biespecíficos para caracterización adicional *in vivo*.

Ejemplo 3: Caracterización *in vivo* de UniAb biespecíficos de IL-2Rβγ BsAb-1 y BsAb-2

Antes de llevar a cabo estudios funcionales *in vivo*, se midieron la estabilidad *in vivo* y la farmacocinética de los anticuerpos biespecíficos en ratones. La semivida de 5-7 días observada de cada anticuerpo biespecífico es consistente con la semivida de un anticuerpo de IgG4 humano en ratones (**figura 8**, panel A) (R. Deng et al., *Mabs* 3, 61-66 (2011)). Para valorar la actividad funcional *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos, se usó un modelo de gráfica acelerada versus enfermedad de hospedador (GVHD) para comparar la actividad funcional de

BsAb-1, BsAb-2 y rhIL-2 (**figura 10**, paneles A-C). En el primer experimento, los ratones NSG irradiados se injertaron con PBMC humanas y los ratones se trataron posteriormente con vehículo, rhIL-2 diariamente o uno de los dos anticuerpos agonistas biespecíficos dos veces por semana hasta el sacrificio. Como se esperaba, los animales tratados con el control de vehículo mostraron inicio de GVHD, medido por pérdida de peso corporal, alrededor del día 20 y se sacrificaron con una pérdida de peso corporal de 20 % en aproximadamente el día 35. En contraste, los anticuerpos agonistas de IL-2R β γ biespecíficos (BsAb-1, BsAb-2) así como los animales tratados con rhIL-2 exhibieron inicio de GVHD en aproximadamente el día 8 y se sacrificaron con una pérdida de peso corporal de 20 % entre los días 9 y 13, que indica una aceleración de GVHD en comparación con el control de vehículo, consistente con la activación mejorada de células efectoras inmunitarias en ratones tratados (**figura 10**, panel B).

Se llevó a cabo un segundo estudio para medir directamente la capacidad de BsAb-1 y BsAb-2 para estimular la proliferación de células efectoras inmunitarias *in vivo*. Similar al primer experimento, los ratones NSG irradiados se injertaron con PBMC humanas que se etiquetaron con CFSE y se trataron con vehículo, rhIL-2, BsAb-1 o BsAb-2. Después del día 5 de tratamiento, se cosecharon los bazo y se comparó la proliferación de células T CD8⁺ y T CD4⁺ entre los 4 grupos de tratamiento al medir la tinción de CFSE en las diferentes poblaciones de linfocitos. BsAb-1 y BsAb-2 mostraron células T CD8⁺ significativamente más proliferantes en comparación con rhIL-2 y el control de vehículo (**figura 10**, panel C). Las células T CD4⁺ se expandieron en menor medida; sin embargo, se observó un incremento significativo en células T CD4⁺ proliferantes en ratones tratados con BsAb-2 en comparación con el control de vehículo.

Un aspecto importante de la evaluación preclínica de los agonistas de anticuerpos biespecíficos fue establecer a los monos cynomolgus como un modelo *in vivo* apropiado para medir la farmacodinámica de las moléculas. Para determinar la equivalencia funcional de humano y de cynomolgus, se confirmó que los anticuerpos biespecíficos activan la señalización de pSTAT5 *ex vivo* en células T primarias de cynomolgus a un nivel similar al observado en células T humanas primarias (**figura 4**, paneles C y E). Después de establecer la equivalencia funcional entre humanos y cynomolgus, se llevó a cabo un estudio de cynomolgus no BPL para investigar adicionalmente la actividad de BsAb-1 y BsAb-2 *in vivo* en un modelo de primate no humano. Los dos anticuerpos agonistas biespecíficos se administraron a monos cynomolgus en grupos de 2 que recibieron una dosis individual intravenosa (bolo lento) de 0.03, 0.1 o 0.3 mg/kg de BsAb-1 o BsAb-2. En todas las dosis con ambas moléculas, se observó una expansión marcada de células NK y T CD8⁺ periféricas (**figura 11**). Después de una caída transitoria inicial en el número de linfocitos, las células T, NK CD8⁺ y, en menor grado, las células T CD4⁺, mostraron una proliferación y expansión dependiente de dosis en la sangre, alcanzando un pico

alrededor del día 4-7 antes de volver a los niveles de línea base alrededor del día 14 (**figura 11**, paneles A-C, F-H). Es importante destacar que no se observó una expansión pronunciada de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+, consistente con los anticuerpos agonistas biespecíficos que evitan la activación preferencial del receptor de IL-2 trimérico (**figura 11**, paneles D, I). Este efecto se confirmó adicionalmente por la relación de células T CD8+:CD4+ que se sesgó a favor del subconjunto de células T CD8+ (**figura 11**, panel K). Además, los anticuerpos agonistas de IL-2Rβγ se toleraron bien en los monos en todos los niveles de dosis probados, sin indicación de síndrome de fuga vascular u otras toxicidades manifiestas.

Ejemplo 4: Caracterización *in vivo* de UniAb biespecífico de IL-2Rβγ BsAb-5

Antes de llevar a cabo estudios funcionales *in vivo*, se midieron la estabilidad *in vivo* y la farmacocinética de los anticuerpos biespecíficos en ratones a dos niveles de dosis: 1 mg/kg y 10 mg/kg. La semivida de 5 días observada de BsAb-5 (IL2RB_F09K* *IL2RG_F16B) es consistente con la semivida de un anticuerpo de IgG4 humano en ratones (**figura 12**, paneles A y B) (R. Deng et al., *Mabs* 3, 61-66 (2011)). Para valorar la actividad funcional *in vivo* del anticuerpo biespecífico, se usó un modelo de gráfica acelerada versus enfermedad de hospedador (GVHD) para comparar la actividad funcional de BsAb-5 y rhIL-2 (**figuras 13-14**). En el primer experimento, los ratones NSG irradiados se injertaron con PBMC humanas y los ratones se trataron posteriormente con vehículo, rhIL-2 diariamente o BsAb-5 dos veces por semana hasta el sacrificio. Como se esperaba, los animales tratados con el control de vehículo mostraron inicio de GVHD, medido por pérdida de peso corporal, alrededor del día 20 y se sacrificaron con una pérdida de peso corporal de 20 % en aproximadamente el día 35. En contraste, los animales tratados con BsAb-5, así como los animales tratados con rhIL-2 exhibieron inicio de GVHD en aproximadamente el día 8 y se sacrificaron con una pérdida de peso corporal de 20 % entre los días 9 y 13, que indica una aceleración de GVHD en comparación con el control de vehículo, consistente con la activación mejorada de células efectoras inmunitarias en ratones tratados (**figura 14**).

Se llevó a cabo un segundo estudio para medir directamente la capacidad de BsAb-5 para estimular la proliferación de células efectoras inmunitarias *in vivo*. Similar al primer experimento, los ratones NSG irradiados se injertaron con PBMC humanas que se etiquetaron con CPD450 y se trataron con vehículo, rhIL-2 o BsAb-5. Después del día 5 de tratamiento, se cosecharon los bazo y se comparó la proliferación de células T CD8+, células T CD4+ y células NK entre los 3 grupos de tratamiento al medir las diluciones de CPD450 en las diferentes poblaciones. En los tres tipos de células medidas, BsAb-5 indujo una proliferación significativamente mayor que rhIL-2 o el control de vehículo (**figura 15**, paneles A-C).

Un aspecto importante de la evaluación preclínica de los agonistas de anticuerpos biespecíficos fue establecer a los monos cynomolgus como un modelo *in vivo* apropiado para medir la farmacodinámica de las moléculas. Para determinar la equivalencia funcional de humano y de cynomolgus, se confirmó que los anticuerpos biespecíficos activan la señalización de pSTAT5 *ex vivo* en células T primarias de cynomolgus a un nivel similar al observado en células T humanas primarias (**figura 4**, paneles C y E). Después de establecer la equivalencia funcional entre humanos y cynomolgus, se llevó a cabo un estudio de cynomolgus no BPL para investigar adicionalmente la actividad de BsAb-5 *in vivo* en un modelo de primate no humano. Se administró BsAb-5 a monos cynomolgus en una dosis individual intravenosa (bolo lento) de 0.1, 0.3 o 0.5 mg/kg. Los monos se dosificaron en grupos de 2 para los dos primeros niveles de dosis, y en un grupo de 4 para el nivel de dosis de 0.5 mg/kg. En todos los niveles de dosis, se observó una expansión marcada de células T CD8+, NK y T NK, periféricas (**figura 16**, paneles A-F). Después de una caída transitoria inicial en el número de linfocitos, las células T CD8+, NK, T NK, y en menor grado, las células T CD4+, mostraron una proliferación y expansión dependiente de dosis en la sangre, alcanzando un pico alrededor del día 4-7 antes de volver a los niveles de línea base alrededor del día 14 (**figura 16**, paneles A-H). Es importante destacar que no se observó una expansión preferencial de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+, consistente con los anticuerpos agonistas biespecíficos que evitan la activación preferencial del receptor de IL-2 trimérico (**figura 16**, paneles A-J). Además, las células B, que sirven como un control negativo útil debido a su falta de expresión del receptor de IL-2, no proliferaron en respuesta a BsAb-5 (**figura 16**, paneles K-L). Además, los anticuerpos agonistas de IL-2R β se toleraron bien en los monos hasta 0.5 mg/kg, sin indicación de síndrome de fuga vascular u otras toxicidades manifiestas.

En tanto que en la presente se han mostrado y descrito modalidades de ejemplos no limitantes de la presente divulgación, será obvio para aquellos expertos en la técnica que estas modalidades se proporcionan a manera de ejemplo solamente. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones ahora se presentarán a aquellos expertos en la técnica sin apartarse de la divulgación. Se debe entender que se pueden emplear diferentes alternativas a las modalidades de la divulgación descritas en la presente al practicar la divulgación. Se propone que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la divulgación y que por lo tanto se cubran los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.